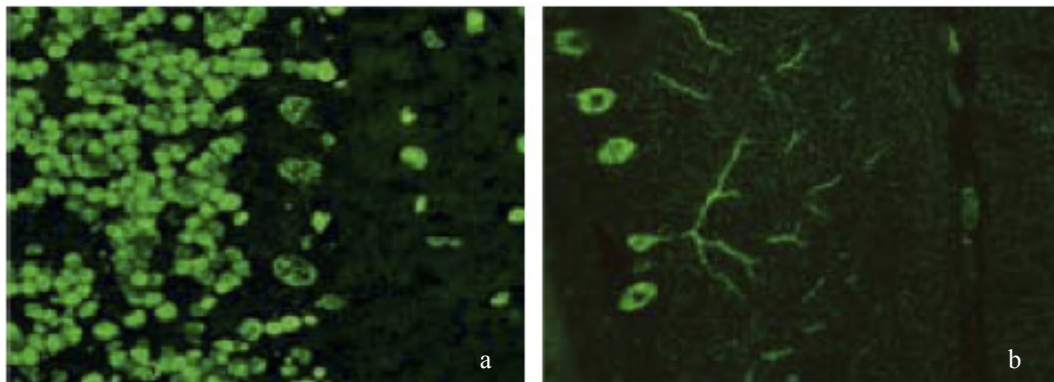


**Die Identifizierung und Charakterisierung
neuer Autoantikörper
beim kindlichen
Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom**



**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
beim Fachbereich für Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen**

- a)** anti-Hu-Antikörper (auch ANNA1): Granuläre Fluoreszenz nahezu aller Neuronkerne des Kleinhirns
- b)** PCA-2-Antikörper: Färbung des Zytoplasmas und der Dendriten der Purkinjezellen

Quelle Titelbilder: Wandinger KP (2008), Paraneoplastische Neurologische Syndrome – Klinik und Labordiagnostik. Immunologie, Fachbeiträge, MTA Dialog

Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Biochemie, Fachbereich Medizin
Neurologische Klinik, Fachbereich Medizin

**Die Identifizierung und Charakterisierung
neuer Autoantikörper
beim kindlichen
Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat)**

vorgelegt von

Dipl.-Biologin Antje Kirsten

aus
Gießen

April, 2009

Die vorliegende Arbeit wurde über eine Kooperation der Neurologischen Klinik am Institut für Biochemie des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael U. Martin

Institut für Immunologie,
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: PD Dr. med. Franz Blaes

Neurologische Klinik
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

3. Prüfer: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Institut für Biochemie
Fachbereich Medizin
Justus-Liebig-Universität Gießen

Prüfungsdatum: 29.05.2009

Meinem Vati
und meiner Familie
gewidmet

Inhaltsverzeichnis	Seite
A Zusammenfassung	1
B Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS)	5
1.1.1 Neuroblastom	6
1.1.1.1 Tumor-Stadien	7
1.1.1.2 Symptomatik	7
1.1.1.3 Diagnostik	8
1.1.1.4 Therapie	8
1.1.1.5 Prognose	9
1.2 Paraneoplastische Neurologische Syndrome (PNS)	10
1.3 Autoimmunität	12
1.3.1 Kreuzreaktionen zwischen Gehirn und Immunsystem	14
1.3.2 Tumorimmunität	15
1.4 Pathogenese im OMS	16
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	20
2. Material	21
2.1 Patienten	21
2.2 Bakterienstämme	22
2.3 Plasmide	22
2.4 Kulturmedien	23
2.4.1 Bakterienkultur-Medien und Agarplatten	23
2.4.2 Medienzusätze	24
2.5 Zelllinien	25
2.6 Oligonukleotide (metabion)	25
2.7 Geräte, Chemikalien und Enzyme	27
2.7.1 Geräte und spezielle Artikel	27
2.7.2 Chemikalien	28
2.7.3 spezielle Chemikalien und Lösungen	28
2.7.4 Molekularbiologische Kits	28
2.7.5 Größenstandards DNA/Protein	29
2.7.6 Enzyme	29
2.7.7 Antikörper	29
2.7.7.1 Primär-Antikörper	29
2.7.7.2 Sekundär-Antikörper	30

3. Methoden	31
3.1 Mikrobiologische Methoden	31
3.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	31
3.1.2 Plattenkulturen von <i>Escherichia coli</i>	31
3.1.3 Messung der optischen Dichte einer Kultur	31
3.1.4 Herstellung von Dauerkulturen	32
3.1.5 Transformation	32
3.1.5.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	32
3.1.5.2 Herstellung Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	32
3.1.5.3 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	33
3.1.6 Überexpression von Fremdproteinen in <i>E. coli</i>	34
3.1.6.1 pBAD/D-TOPO Expressionssystem	34
3.2 Screening einer cDNA-Bibliothek	35
3.2.1 Bakterienkulturen	35
3.2.2 Titerbestimmung der Phagenbank	35
3.2.3 Übertragung von Plaques auf eine Nitrozellulose-Membran	36
3.2.4 <i>Immunoscreening</i> mit dem <i>Replica</i> -Filter	37
3.2.5 Isolierung positiver Plaques	38
3.2.5.1 Herstellung kleiner <i>E. coli</i> /Phagenplatten	38
3.2.6 Umwandlung von λ TriplEx2-Klonen in pTriplEx2-Klone	38
3.2.7 Identifizierung positiver pTriplEx2-Klone	40
3.3 Zellkultur-technische Methoden	40
3.3.1 Kultivierung von Zellen und Herstellung von Subkulturen	40
3.3.2 Mediumwechsel	41
3.3.3 Einfrieren von Zellen – Kryokonservierung	42
3.3.4 Auftauen von Zellen	42
3.3.5 Bestimmung der Zellzahl	43
3.3.6 Zytotoxizitäts- <i>Assay</i>	43
3.3.6.1 LDH-Test	43
3.3.7 Migrations- <i>Assay</i>	44
3.3.8 Dendriten-Wachstum und Ausmessung der Dendritenlänge	46
3.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	47
3.4.1 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	47
3.4.1.1 Plasmid-Minipräparation nach <i>PeqLab</i>	48
3.4.2 RNA-Isolierung aus Zelllinien	48
3.4.3 RNA-Isolierung aus Zelllinien nach <i>Sigma</i>	49
3.4.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren	49
3.4.4.1 OD-Messung mittels Absorptionsspektrometrie	49
3.4.5 Biotinylierung isolierter Gesamt-RNA	49

3.4.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50
3.4.7	Reinigung von Nukleinsäure-Fragmenten nach einer PCR oder anderen enzymatischen Modifikationen	50
3.5	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren	51
3.5.1	Restriktion von DNA	51
3.5.2	Ligation von DNA	51
3.6	Molekularbiologische Methoden	52
3.6.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	52
3.6.2	RT-PCR	53
3.6.3	PCR-Schnelltest	54
3.6.4	Gelelektrophorese	55
3.6.4.1	Agarosegele	55
3.6.4.2	Färbung von Agarosegelen	56
3.6.4.3	SDS-Polyacrylamidgele für die SDS- <i>page</i>	56
3.6.4.4	Färben von SDS-Gelen	59
3.6.4.5	<i>Western</i> -Analyse von Proteinen (<i>Western Blot</i>)	59
3.6.4.5.1	<i>Blotten</i> von Polyacrylamidgelen	60
3.6.4.6	<i>Strippen</i> von <i>Western Blot</i> Membranen	62
3.6.4.7	<i>Line Blots</i>	62
3.6.4.8	<i>Dot Blot</i>	62
3.6.4.8.1	<i>Dot Blot</i> mit Proteinlösungen	63
3.6.4.8.2	<i>Dot Blot</i> mit Nukleinsäuren	64
3.6.4.9	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> – ELISA	65
3.7	Proteinanalytik	66
3.7.1	Zellaufschluss-Methoden	66
3.7.1.1	Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen	66
3.7.1.2	Trennung und Isolierung von Membran- und Zytoplasma- proteinen aus eukaryotischen Zellen	67
3.7.1.2.1	Biotinylierung von Membranproteinen adhärenter Zellen	67
3.7.1.2.2	Biotin/Streptavidin <i>Pull Down Assay</i>	68
3.7.1.3	Proteinisolierung aus humanem Gewebe	69
3.7.1.4	Proteinisolierung aus einer Bakterienkultur	70
3.7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	70
3.8	Säulenchromatographische Methoden	71
3.8.1	Affinitätschromatographie	71
3.8.1.1	Metallchelatchromatographie	72
3.8.1.2	IgG-Isolierung aus Serum	73
3.8.2	Gelfiltration	74
3.8.2.1	Umpuffern von Proteinlösungen	74
3.9	Statistik	75

4. Ergebnisse	76
4.1 Identifizierung von Autoantikörpern im OMS	76
4.1.1 2D- <i>Western Blot</i> Analyse für die Identifizierung neuer Autoantigene in Neuroblastom-Zellen	76
4.1.2 2D- <i>Western Blot</i> Analyse für die Identifizierung von Autoantigenen in humanem Kleinhirn	78
4.2 α-Enolase als Autoantigen im OMS	82
4.2.1 <i>Line Blots</i> für die Identifizierung α -Enolase positiver OMS-Seren	82
4.2.2 <i>Line Blots</i> für die Identifizierung γ -Enolase positiver OMS-Seren	83
4.2.3 α -Enolase als RNA-bindendes Protein	84
4.2.4 Einfluss von RNA oder Plasminogen auf die Bindung von Autoantikörpern an α -Enolase	85
4.2.5 Expression von α -Enolase auf der Oberfläche von Neuroblastom-Zellen	88
4.2.6 Nachweis einer Kreuzreaktion von OMS-Seren mit bakterieller Enolase	90
4.2.7 LDH- <i>assay</i> mit IgG-Fractionen α -Enolase positiver OMS-Seren	92
4.3 RALDH1 als Autoantigen im OMS	94
4.3.1 Herstellung des rekombinanten Proteins RALDH1	94
4.3.1.1 Klonierung des Plasmids pNKH1/ <i>ALDH1A1</i>	94
4.3.1.2 Überexpression von RALDH1	95
4.3.1.3 Aufreinigung des <i>His-tag</i> Proteins RALDH1	98
4.3.1.4 Umpuffern der RALDH1-Proben	99
4.3.2 <i>Line Blots</i> für die Analyse RALDH1 positiver OMS-Seren	100
4.3.3 RALDH1 als RNA-bindendes Protein	101
4.3.3.1 Herstellung biotinylierter RNA	101
4.3.3.2 ELISA- <i>assay</i> mit RALDH1 und biotinylierter RNA	102
4.3.3.3 <i>Dot Blot</i> mit RALDH1 und biotinylierter RNA	103
4.3.4 Einfluss von RNA auf die Bindung von Autoantikörpern an RALDH1	104
4.3.5 Expression von RALDH1 in Neuroblastom-Zellen: RT-PCR	105
4.3.6 Expression von RALDH1 auf der Oberfläche von Neuroblastom-Zellen	108
4.4 Funktionelle Effekte von Autoantikörpern im OMS in Zusammenhang mit Retinolsäure	110
4.4.1 Wirkung von Retinolsäure auf die Differenzierung von Neuroblastom-Zellen	110
4.4.2 Dendriten-Wachstum : Retinolsäure-Behandlung	111

4.4.3	Dendriten-Wachstum unter dem Einfluss von Autoantikörpern aus OMS-Seren	113
4.4.4	Migrations- <i>Assay</i> mit SH-SY5Y-Zellen	114
4.4.5	Migrations- <i>Assay</i> unter dem Einfluss von Autoantikörpern	115
4.5	Screening einer cDNA-Bank mit OMS-Seren	117
4.5.1	Herstellung von Masterplatten	118
4.5.2	Herstellung von Plaque-Platten	119
4.5.3	Umwandlung von λ TriplEx2-Klonen in pTriplEx2-Klone	121
4.5.4	Kolonie-PCR mit positiven pTriplEx2-Klonen	121
4.5.5	Restriktionsverdau mit isolierten Plasmiden	122
4.5.6	Identifizierte Proteine	123
4.5.7	Positive Plaques gespottet	124
5.	Diskussion	127
5.1	OMS als Autoimmunkrankheit	127
5.2	Identifizierung neuer Autoantikörper beim OMS	129
5.2.1	α -Enolase als Autoantigen	130
5.2.2	Pathogene Effekte von Autoantikörpern	134
5.2.3	Retinaldehydrogenase 1 (RALDH1) als Autoantigen	135
5.3	OMS-Autoantigene als RNA-Bindungsproteine	137
5.4	Funktionelle Effekte von Autoantikörpern im OMS	139
5.5	Eine cDNA-Bank als Antigenquelle im OMS	141
6.	Anhang	145
6.1	Übersicht verwendeter Serum-Proben	145
6.2	Übersicht über identifizierte potentielle Antigene	148
6.3	Abkürzungen	152
7.	Literaturverzeichnis	155
	Lebenslauf	166
	Danksagung	168
	Erklärung	170

A Zusammenfassung

EINLEITUNG: Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS) ist eine seltene neurologische Erkrankung und kann sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen beobachtet werden. Die Symptomatik zeichnet sich durch Myoklonien, einen Opsoklonus, Ataxien und Entwicklungsstörungen aus. Neben einer idiopathischen Form und Intoxikationen tritt OMS in ca. 50% der Fälle als paraneoplastisches Syndrom, mit einer Tumorerkrankung assoziiert, auf. Beim kindlichen OMS ist dabei häufig ein Neuroblastom als zugrundeliegender Tumor zu beobachten. Klinische und pathologische Beobachtungen, welche die Identifizierung anti-neuronaler Antikörper im Serum von OMS-Patienten einschließen, lassen auf eine immunvermittelte Pathogenese schließen. Bis heute war aber die Identifizierung eines gemeinsamen Antigens nicht möglich. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von OMS-Seren auf das Vorhandensein neuer Autoantikörper gegen ein gemeinsames Antigen und mögliche funktionelle Effekte der Autoantikörper auf Neuroblastomzellen.

METHODEN: Für die Identifizierung anti-neuronaler Antikörper wurden 2D-*Western Blot* Analysen und eine Proteomanalyse, unter Verwendung von 4 OMS-Seren, durchgeführt. Daraufhin wurden 39 OMS-Seren auf Antikörper gegen neu identifizierte Antigene mittels des rekombinanten Proteins, über *Line Blots*, getestet. Seren von 41 gesunden Probanden und 13 Seren von NB-Patienten ohne ein Syndrom dienten dabei als Kontrollen. Über Bindungsstudien in Form eines ELISAs und der *Dot Blot* Technik wurden neue Antigene auf eine RNA-Bindung hin untersucht. Darüber hinaus haben wir mittels der *Dot Blot* Technik und *Western Blot* Analysen die Bindung von OMS-Autoantikörpern an bakterielle Proteine, im speziellen an α -Enolase, untersucht. Die Untersuchung möglicher funktioneller Effekte auf Neuroblastomzellen erfolgte über einen *Migrations-Assay* und die Ausmessung dendritischer Fortsätze. Unter Verwendung unbehandelter und RA-behandelter Zellen wurden diese dafür zusätzlich mit isolierten OMS-IgG-Fractionen und entsprechenden Kontroll-IgGs behandelt. Weiterhin sollte das *Screenen* einer cDNA-Bank als alternative Methode zu den 2D-Gelen Aufschluss über weitere potentielle Autoantigene geben.

ERGEBNISSE: Über die 2D-*Western Blot* Analyse konnten zwei neue Antigene im OMS identifiziert werden: α -Enolase und Retinaldehydhydrogenase 1 (RALDH1). Gegen α -Enolase gerichtete Autoantikörper wurden in 7/31 (22,6%) OMS-Seren, aber nur in 1/13 NB-Patienten und keinem Serum gesunder Probanden nachweisen ($p < 0.05$). Dabei

waren die Autoantikörper spezifisch gegen α -Enolase gerichtet. Antikörper gegen die neuronal spezifische γ -Enolase konnten in keinem der getesteten OMS-Seren detektiert werden. Eine in diesem Zusammenhang mit anti- α -Enolase Antikörpern untersuchte Bindung an das auch in Bakterien exprimierte Protein und eine dadurch mögliche bakterielle Infektion als Auslöser eines OMS konnte nicht bestätigt werden. Für das zweite Antigen RALDH1, als Schlüsselenzym der Retinolsäuresynthese, waren sogar 15/39 (39%) OMS-Patienten, aber nur 5/41 gesunde Kontrollen und 2/13 NB-Patienten serumpositiv für anti-RALDH1-Autoantikörper. Die Vermutung kreuzreaktiver Antikörper gegen onconeuronale Antigene in der Pathogenese eines OMS bestätigte sich dabei in einem Nachweis beider Proteine in Neuroblastomzellen und Kleinhirngewebe. Darüber hinaus wurden die neu identifizierten Autoantikörper überwiegend in OMS-Patienten assoziiert mit einem Neuroblastom nachgewiesen, wodurch das Ergebnis kreuzreaktiver Antikörper beim OMS zusätzlich untermauert wurde. In Verbindung mit einem paraneoplastischen OMS beschriebene Antigene, wie Hu oder Nova 1/2, besitzen die Eigenschaft RNA zu binden. Auch für die hier identifizierten Antigene α -Enolase und RALDH1 konnte eine bis dahin unbekannte Bindung an RNA nachgewiesen werden, wobei sich für α -Enolase eine stärkere Affinität zu RNA zeigte, im Vergleich zu RALDH1. Die Untersuchung funktioneller Effekte von OMS-Autoantikörpern auf Neuroblastomzellen in vitro hat gezeigt, dass diese migrieren und dieser Effekt sowie ein Dendritenwachstum durch eine RA-Behandlung gesteigert werden können, die Zugabe isolierter OMS-IgG-Fractionen aber keinen Einfluss auf diese Funktionen der Zellen hat. Das *Screenen* einer *cerebellum* cDNA-Bibliothek stellte neben der durchgeführten 2D-Analyse eine zusätzliche Möglichkeit der Antigenidentifizierung dar. Unter Verwendung von OMS-Seren konnten sechs potentielle Antigene identifiziert werden, wovon sich die Na- α 1-Kanal- und GABA_A- α 1-Rezeptor-Untereinheiten als besonders vielversprechend erwiesen. Ob und in welcher Form diese neu identifizierten Proteine im OMS und der zugrundeliegenden Pathogenese eine Rolle spielen, gilt es in weiteren Untersuchungen zu klären.

DISKUSSION: Die Identifizierung neuer Autoantikörper in OMS-Seren bestätigt die Annahme kreuzreaktiver Antikörper gegen onconeuronale Proteine. Eine autoimmunvermittelte Pathogenese bei einem kindlichen OMS ist daher wahrscheinlich. Autoantikörper gegen Tumorantigene sowie neuronale Proteine gerichtet, wirken proapoptisch, hemmen die Proliferation von Neuroblastomzellen und schädigen so auch Bereiche des Kleinhirns.

B *Summary*

INTRODUCTION: Opsoclonus-myoclonus syndrome (OMS) is a rare neurological disorder affecting adults and children. It is characterised by the main symptoms of eye movement disturbances, muscle jerks, severe ataxia and behavioural disturbances. OMS can be caused by infections, toxins or metabolic disorders. However, as a paraneoplastic syndrome OMS in children it is almost exclusively associated with neuroblastoma unlike the adult OMS, which is mostly associated with small-cell lung or breast cancer. Since clinical and pathological observations including the detection of anti-neuronal autoantibodies OMS was suggested to be the result of an autoimmune disease. However, until now no common autoantigen could be identified. Therefore we investigated binding of OMS-associated autoantibodies to common antigens and their functional effects on neuroblastoma cells.

METHODS: To define antineuronal autoantibodies two-dimensional (2D) gel electrophoresis was performed using sera of 4 OMS-patients associated with a neuroblastoma. Additionally sera of 39 OMS patients were analysed by immunoblot (Line Blots) on purified proteins. Sera of 13 NB-patients without an underlying syndrome and healthy donors serve as controls. To further approach functional effects of autoantibodies on neuroblastoma cells following methods were used: measuring of neurite outgrowth, migration assay and LDH-assay. RNA-binding properties of identified autoantigens were determined using Dot Blot and ELISA-method. Surface expression of antigens was analysed by immunoblot after separation of the cytoplasmic and membrane fraction of cells. As an additional method for the detection of new autoantigens screening of a human cerebellum cDNA library was performed.

RESULTS: 2D-gel electrophoresis revealed two new autoantigens in OMS: α -enolase and RALDH1. Using Western Blot (Line Blots) with recombinant α -enolase 7/31 (22.6%) OMS-sera were identified to have autoantibodies against the protein in comparison to controls ($p < 0.05$). The observed reactivity was specifically directed on α -enolase. Antibodies against γ -enolase as neuron specific isoform were not detected in any OMS sera. Autoantibodies against RALDH1 were present in a significant higher percentage of patients with OMS (39%) than in controls (14.6%). Apart from known RNA-binding proteins (HuD) α -enolase and RALDH1 could be identified as new RNA-binding proteins. Furthermore the expression of both proteins on surface of neuroblastoma cells could not be determined. Functional effects of autoantibodies showed no significant

influence on migration ability and neurite outgrowth of neuroblastoma cells. Screening of a cerebellum cDNA library revealed two additional potential new autoantigens in OMS, GABA-A-receptor subunit (alpha 1) and Na-channel subunit.

DISCUSSION: The detection of anti-neuronal autoantibodies in sera of OMS-patients as well as the detection of both proteins in neuroblastoma cells and cerebellum indicates that opsoclonus-myoclonus syndrome is the result of an autoimmunopathogenesis with cross reacting autoantibodies against proteins in the tumor and neuronal cells.

1. Einleitung

1.1 Das Opsoklonus-Myoklonus Syndrom (OMS)

Das Opsoklonus-Myoklonus Syndrom (OMS) ist eine seltene neurologische Erkrankung und wurde 1962 erstmals durch Dr. M. Kinsbourne beschrieben (Kinsbourne 1962). Es kann sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen beobachtet werden. Hauptsymptome dieser Erkrankung sind neben einem Opsoklonus, Myoklonien und eine Ataxie. Als Opsoklonus bezeichnet man kurze, schnelle, unregelmäßige und unkontrollierte Bewegungen der Augen. Myoklonien sind rasche und unwillkürliche Zuckungen einzelner Muskeln oder Muskelgruppen. Neben den Extremitäten sind auch Mimik und Rumpfmuskulatur der Patienten betroffen. Ataxien sind Störungen der Koordination von Bewegungsabläufen. Eine Ataxie kann dabei so stark ausgeprägt sein, dass betroffene Kinder nicht mehr in der Lage sind, selbständig zu sitzen oder zu laufen (Deconinck et al. 2006). Neben den bereits beschriebenen Symptomen treten auch Schlaf-, Sprach-, Bewegungs- und Entwicklungsstörungen auf (Koh et al. 1994; Mitchell et al. 2002; Pranzatelli et al. 2005). Auf Grund dieser Symptome wird OMS in der Literatur auch als *Dancing Eye Syndrome*, *Opsoclonus-Myoclonus-Ataxia* (OMA) oder *Kinsbourne Syndrome* beschrieben.

Auslöser dieser Krankheit können Infektionen, Toxine oder Stoffwechselerkrankungen sein (Posner and Furneaux 1990; Darnell and Posner 2003). Intoxikationen, zum Beispiel durch Strychnin oder zu hohe Medikamentendosen (z.B. Lithium), sind mögliche Ursachen eines OMS (Cohen and Cohen 1974; Blain et al. 1982). Bei der idiopathischen Form dieser Erkrankung sind die Ursachen und der Auslöser spezifischer Symptome unbekannt (Bataller et al. 2003). In ca. 50% der kindlichen Fälle ist OMS als paraneoplastisches Syndrom (PNS) mit einer Tumorerkrankung assoziiert (Pranzatelli 1996). Bei betroffenen Kindern ist ein Neuroblastom der am häufigsten zugrundeliegende Tumor (Bray et al. 1969; Altman and Baehner 1976; Pranzatelli 1996; Rudnick et al. 2001). Umgekehrt konnte ein OMS bei 2 – 3% aller Kinder mit einem Neuroblastom beobachtet werden (Pranzatelli 1996; Russo et al. 1997; Rudnick et al. 2001). Klinische Studien zeigten, dass nach einer Vorstellung mit den beschriebenen Symptomen bei 76% der OMS-Patienten innerhalb von drei Monaten ein Neuroblastom diagnostiziert wurde (Rudnick et al. 2001). Ein paraneoplastisches OMS bei Erwachsenen, welches etwa 10% der OMS-Fälle umfasst, ist dagegen häufig mit einem kleinzelligen Lungen-

karzinom oder mit Brustkrebs verbunden (Pranzatelli 1996; Rudnick et al. 2001; Mitchell et al. 2002).

Das OMS als paraneoplastische oder idiopathische Form wird immunsuppressiv behandelt. Beim paraneoplastischen OMS folgen der oft nicht einfachen Tumordiagnose eine Resektion und möglicherweise eine Chemotherapie. Wurde ein Tumor diagnostiziert, welcher beim pädiatrischen OMS klein und selten metastasierend ist, verschiebt sich oft die immunsuppressive Behandlung der Patienten (Pranzatelli 1996).

Ein Rückgang akuter neurologischer Symptome konnte durch die Behandlung mit Steroiden, ACTH (adrenocorticotropes Hormon) und IVIg (intravenöse Immunglobuline) erreicht werden (Pranzatelli 1996). Dabei wird oft eine kombinierte Behandlung mit Steroiden und IVIg angewandt (Fisher et al. 1994). Die konventionelle Immuntherapie kann zu einer Besserung der Symptome führen, oft aber nicht zu ihrer kompletten Aufhebung. Langfristig können bei den Kindern Sprache- und Verhaltensstörungen zurückbleiben (Mitchell et al. 2002).

Das paraneoplastische Syndrom bei erwachsenen OMS-Patienten ist im Gegensatz zu dem bei Kindern beobachteten stärker progressiv und kann bis zum Tod führen (Pranzatelli 1996). Die Ursache dafür liegt meist in der Entwicklung einer generalisierten Enzephalitis (Posner and Furneaux 1990).

1.1.1 Neuroblastom

Ein Neuroblastom ist ein vom sympathischen Nervensystem ausgehender hochmaligner Tumor und wird besonders oft bei Kleinkindern diagnostiziert (Russo et al. 1997). Seine Zellen, sogenannte Neuroblasten, verbleiben in einem unreifen Stadium. Die Inzidenz ist dabei 1/5.000. Der Tumor kann in allen Bereichen des sympathischen Nervensystems entstehen, welches für Funktionen wie Blutdruck, Herzschlag und Verdauung verantwortlich ist. Ein Neuroblastom kommt in Bereichen der Wirbelsäule sowie dem Kopf, Hals und Nacken vor und ist entlang des zervikalen, thorakalen und abdominalen Krenzstrangs zu finden. Am häufigsten (50% der Fälle) ist ein Neuroblastom aber in der Nebenniere lokalisiert (Russo et al. 1997). Mit 7 – 8 % aller Krebserkrankungen bei Kindern- und Jugendlichen stellt das Neuroblastom die zweithäufigste Tumormart dar.

90% der erkrankten Kinder sind jünger als 5 Jahre. Das Durchschnittsalter einer Diagnose liegt bei 2 Jahren (Russo et al. 1997). Ein Neuroblastom kann aber auch bei

älteren Kindern und Jugendlichen auftreten. In Einzelfällen kommt es auch bei Erwachsenen vor. In mehr als 50% aller Fälle weist ein Neuroblastom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasenbildung auf. Diese können in regionalen und entfernten Lymphknoten, im Knochenmark und der Leber beobachtet werden und sind ein Kriterium für die Einteilung der Neuroblastomerkrankungen in verschiedene Stadien.

1.1.1.1 Tumor-Stadien

Die Einteilung einer Neuroblastomerkrankung in verschiedene Stadien erfolgt nach den INSS-Kriterien (*International Neuroblastoma Staging System*) (Hughes et al. 1974; Brodeur et al. 1993). Merkmale der einzelnen Stadien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Stadieneinteilung bei einem Neuroblastom nach INSS-Kriterien

Stadium 1	der Primärtumor ist lokal begrenzt und lässt sich chirurgisch komplett entfernen
Stadium 2a	der Primärtumor kann nicht komplett entfernt werden, infiltriert Umgebung, geht über die Wirbelsäule hinaus, kein Lymphknotenbefall in der Umgebung des Tumors
Stadium 2b	die Größenausdehnung geht über die Wirbelsäule hinaus, homolateraler Lymphknoten
Stadium 3	die Ausbreitung des Primärtumors geht über die Mittellinie hinaus, Lymphknoten sind befallen, operativ nicht komplett entfernbar
Stadium 4S	Sonderstadium; Primärtumor mit Metastasenbildung in Haut, Leber und/oder Knochenmark; Stadium bei Säuglingen im ersten Lebensjahr, relativ gute Prognose
Stadium 4	Generalisierung und Metastasierung des Tumors

1.1.1.2 Symptomatik

Die Symptome einer solchen Erkrankung sind von der Lage des Primärtumors abhängig und lassen sich in tumorbedingte und allgemeine Symptome einteilen.

Tumorbedingte Beschwerden sind z.B. ein tastbarer Knoten im Bauchraum, Atemprobleme, Bauch- und Rückenschmerzen, Darmprobleme sowie verdickte Halslymphknoten. Allgemeine Symptome äußern sich durch Blässe, Gewichtsverlust, Fieber und Durchfall. Zeigen sich diese Symptome bei einem betroffenen Patienten, sind verschiedene diagnostische Schritte notwendig.

1.1.1.3 Diagnostik

Eine Diagnose im Frühstadium erfolgt meist zufällig durch eine Sonographie oder auf Verdacht als Folge spezifischer Symptome. Über die bildgebende Diagnostik mittels Computertomographie (CT) und einer Kernspintomographie werden kleine Tumore diagnostiziert. Mit Hilfe eines Tumorscreenings können verschiedene Tumormarker untersucht werden. Ein Neuroblastom produziert Hormone und Signalstoffe, deren Abbauprodukte mit Hilfe eines Teststreifens nachgewiesen werden können. Vanillinmandelsäure als Abbauprodukt von Katecholaminen und Homovanillinsäure als Dopamin-Abbauprodukt werden dabei als Hauptmarker eingesetzt und können über den Urin und das Blut nachgewiesen werden. Als zusätzliche Marker können die neuronal spezifische Enolase (NSE) und Ferritin eingesetzt werden.

Die Entnahme von Gewebeproben gibt einen näheren Aufschluss über den Tumor. Histologische Untersuchungen und die Expression des Oncogens *n-myc* werden untersucht. Durch Knochenmarkpunktionen können mögliche Metastasen im Knochenmark diagnostiziert werden.

Bei einer bereits vorliegenden Metastasenbildung können der Primärtumor und Fernmetastasen mittels einer Szintigraphie untersucht und lokalisiert werden. Auf diese Weise lassen sich Metastasen im Knochenmark, den Knochen, Lymphknoten, der Leber und dem Gehirn nachweisen. Wenn auf Grund dieser diagnostischen Maßnahmen das Stadium und die Ausbreitung der Tumorerkrankung analysiert werden konnten, kann eine entsprechende Therapie begonnen werden.

1.1.1.4 Therapie

Therapeutische Maßnahmen sind stark abhängig vom Stadium des Tumors, dem Alter der betroffenen Person und dem Grad der Ausbreitung der Erkrankung.

Liegt der Tumor in Stadium 1 vor, ist eine vollständige chirurgische Entfernung des Tumors Hauptziel der Behandlung. Bei weiter fortgeschrittenen Stadien geht der Operation eine Chemotherapie voraus. Handelt es sich bei den Patienten um sogenannte Hochrisikopatienten, wird neben den genannten Therapien eine sogenannte Megatherapie angewandt. Diese erfolgt durch die Gabe besonders hoher Chemotherapiedosen.

Zeigt die Chemotherapie in einem festgelegten Zeitraum von ca. 5 Monaten keinen Erfolg, wird die Behandlung in Form einer Erhaltungstherapie fortgesetzt. Eine mögli-

cherweise notwendige Behandlung von Resttumoren nach einer Chemotherapie wird mit einer Strahlentherapie durchgeführt und basiert auf der Strahlensensibilität des Tumors. Abhängig von der Therapie, dem Tumorstadium und Alter der Patienten fällt dann die Prognose einer solchen Erkrankung aus.

1.1.1.5 Prognose

Die Prognose für Neuroblastom-Patienten wird in einer 5-Jahres-Überlebensrate angegeben und ist vom Tumorstadium abhängig. Für alle Stadien zusammen zeigt sich eine Überlebensrate von 55%. Betrachtet man die Stadien der Tumorerkrankungen im Einzelnen, zeigt sich für Stadium 1 und 2 eine 5-Jahres-Überlebensrate von 90%. Bei Stadium 3 sinkt diese Rate bereits auf 75% und liegt für Stadium IV bei weniger als 20%. Entscheidend ist auch die Expression des Tumormarkers *n-myc*. Kann eine Amplifikation dieses Oncogens im Tumorgewebe des betroffenen Patienten nachgewiesen werden, hat dies meist einen ungünstigen Krankheitsverlauf sowie eine hohe Rezidiv-Wahrscheinlichkeit zur Folge. Wenn *n-myc* im Tumor nicht nachgewiesen werden kann, liegt die Überlebensrate des Patienten bei 72%. Im Vergleich dazu sinkt sie bei einer *n-myc*-Amplifikation auf 31% (Seeger et al. 1985).

Im Gegensatz zu anderen Krebserkrankungen besteht bei einem Neuroblastom eine hohe Wahrscheinlichkeit der Spontanheilung. Diese liegt zum Beispiel für Stadium 2a bei 50% und für Stadium 4S sogar bei 80%.

Wenn die Neuroblastomerkrankung erfolgreich behandelt werden konnte, ist eine Nachsorge des Patienten von großer Bedeutung. Durch regelmäßige Kontrollen kann so ein Rezidiv ausgeschlossen und Spätfolgen auf Grund der Behandlungen diagnostiziert werden.

1.2 Paraneoplastische Neurologische Syndrome (PNS)

Ein Paraneoplastisch Neurologisches Syndrom (PNS) ist eine seltene tumorassoziierte Erkrankung des Nervensystems. Es tritt bei 1/10.000 Patienten mit einer Krebserkrankung auf (Darnell and Posner 2003; Honnorat and Antoine 2007). PNS werden als „*Remote Effects of cancer*“ bezeichnet und sind Erkrankung, welche anatomisch entfernt vom Tumor auftreten und nicht durch seine lokalen Effekte oder Metastasen sowie Infektionen verursacht werden (Posner and Furneaux 1990; Darnell and Posner 2003; Honnorat and Antoine 2007). Ein PNS tritt oft Wochen, Monate oder sogar Jahre vor einer Tumordiagnose auf, kann aber auch gleichzeitig mit dem Tumor auftreten oder ihm folgen (Darnell and Posner 2003; Honnorat and Antoine 2007).

Paraneoplastische Syndrome werden auf Grund der durch die Krankheit betroffenen Bereiche in Syndrome des Zentralnervensystems, des peripheren Nervensystems und neuromuskulärer Einheiten und Muskeln eingeteilt (Graus et al. 2004). Basierend auf dem Vorhandensein eines Tumors konnten diese Syndrome durch eine weitere Einteilung in „klassische“ und „nicht-klassische“ Syndrome differenziert werden (Graus et al. 2004; Honnorat and Antoine 2007). Klassische neurologische Syndrome, wie eine limbische Enzephalitis, eine sensorische Neuropathie oder ein Opsoklonus-Myoklonus, sind häufiger mit einer Tumorerkrankung assoziiert. Wurde ein entsprechendes klassisches neurologisches Syndrom diagnostiziert und ein zugrundeliegender Tumor identifiziert, kann die Diagnose eines definitiven PNS gestellt werden. Ebenso kann ein PNS als sicher angesehen werden, wenn ein klassisches Syndrom mit definierten antineuronalen Antikörpern assoziiert ist, ohne das bisher ein Tumor nachgewiesen werden konnte. Nicht-klassische neurologische Syndrome in Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung führen zur Diagnose eines mögliche PNS (Honnorat and Antoine 2007). Werden bei diesen Patienten aber zusätzlich antineuronale Autoantikörper gefunden, liegt ein sicheres PNS vor. Antineuronale Antikörper sind gegen gleiche Proteine in Tumorzellen und neuronalen Zellen gerichtet (Tabelle 2). Die in Tumorzellen und neuronalen Zellen exprimierten Antigene weisen keine Mutationen auf und werden aus noch unbekannter Ursache vom Immunsystem als fremd erkannt und angegriffen (Carpentier et al. 1998; Darnell and Posner 2003). Die Identifizierung von Autoantikörpern spielt eine entscheidende Rolle bei der Diagnose des zugrundeliegenden Tumors und deutet auf eine Autoimmunpathogenese hin (Keime-Guibert et al. 2000; Graus et al. 2004; Vernino et al. 2004).

Die Komplexizität des Krankheitsbildes zeigt sich darin, dass PNS zusammen mit onconeuralen Antikörpern auftreten können, aber auch Antikörper ohne ein neurologisches Syndrom nachgewiesen wurden, wobei in letzterem Fall die Titer der antineuronalen Antikörper um ein Vielfaches niedriger sind, als bei PNS-Patienten (Graus et al. 2004).

Tabelle 2: Übersicht antineuronaler/onconeuraler Antikörper in Verbindung mit einem paraneoplastisch neurologischen Syndrom und dem zugrundeliegenden Tumor. Die Bezeichnung der Antikörper erfolgte nach den Index-Patienten oder dem Antigen (Dalmau and Posner 1994; Darnell and Posner 2003).

ANNA – *anti-neuronal nuclear antibody*, CRMP5 – *Collapsin-response-mediated-protein 5*, PCA – Purkinjezell-Antikörper

Antikörper	Neurologisches Syndrom	Tumorart
anti-Hu (ANNA1)*	<ul style="list-style-type: none"> • Sensorische Neuropathie • Limbische Enzephalitis • paraneoplastische Kleinhirndegeneration 	<i>Small cell lung cancer</i> (SCLC)
anti-Yo (PCA1)*	<ul style="list-style-type: none"> • paraneoplastische Kleinhirndegeneration 	Ovarialkarzinom Mammakarzinom
anti-CV2 (CRMP5)*	<ul style="list-style-type: none"> • sensorische Neuropathie • limbische Enzephalitis • Encephalomyelitis • paraneoplastische Kleinhirndegeneration 	SCLC Thymom
anti-Ri (ANNA2)*	<ul style="list-style-type: none"> • Hirnstammenzephalitis 	Mammakarzinom SCLC
anti-Amphiphysin	<ul style="list-style-type: none"> • Stiff-person Syndrom • sensorische Neuropathie 	Mammakarzinom SCLC
anti-Ma2 (Ta)*	<ul style="list-style-type: none"> • limbische Enzephalitis 	Lungenkarzinom Hodenkarzinom
anti-Tr (PCA-Tr)*	<ul style="list-style-type: none"> • paraneoplastische Kleinhirndegeneration 	Hodgkin`s-Lymphom
anti-CAR	<ul style="list-style-type: none"> • Retinopathie 	Mammakarzinom SCLC
anti-ANNA 3	<ul style="list-style-type: none"> • paraneoplastische Neuropathie 	SCLC

* alternativ in der Literatur vorkommende Bezeichnung der Antikörper

1.3 Autoimmunität

Die Hauptfunktion des Immunsystems ist, den Organismus vor in der Umwelt befindlichen schädlichen Stoffen zu schützen. Über ein gut funktionierendes und vielschichtiges Abwehrsystem werden Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten sowie fremde Substanzen erkannt und entfernt. Das System erkennt aber auch entartete körpereigene Zellen wie Tumorzellen und zerstört diese. Dem unspezifischen oder auch angeborenen Abwehrsystem durch Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Neutrophile steht dabei eine Antigen-spezifische Immunabwehr gegenüber. Dieses auch als adaptive Immunabwehr bezeichnete System kann neben den Antigen-präsentierenden Zellen (APC) in zwei Gruppen eingeteilt werden, die zellvermittelte und die humorale Immunität. Die zellvermittelte Immunantwort umfasst Immunreaktionen, bei denen Antigen-spezifische T-Zellen eine zentrale Rolle spielen. T-Lymphozyten werden über Antigen-präsentierende Zellen aktiviert. Neben Antigenen werden für eine Aktivierung dieser Zellen verschiedene costimulierende Substanzen benötigt, um eine Immunantwort auszulösen. T-Zellen können aber auch auf direktem Weg durch sogenannte Superantigene aktiviert werden. Diese werden von den T-Zellen erkannt, ohne dass sie zu Peptiden degradiert werden und an MHC-Moleküle gebunden sind. Superantigene aktivieren 20-30% aller peripheren T-Zellen, zum Beispiel auch autoreaktive T-Zellen. Im Vergleich dazu werden weniger als 1% der T-Zellen durch konventionelle Antigene aktiviert.

T-Zellen können auf Grund spezieller Oberflächenmarker in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum Einen gibt es CD4⁺ T-Zellen, auch T-Helfer-Zellen, oder *helper/inducer* T-Zellen genannt, welche Peptide auf APC in Kombination mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II) erkennen. CD8⁺ T-Zellen erkennen als *cytotoxic/suppressor* T-Zellen intrazelluläre Peptide, welche in Verbindung mit MHC I auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden. Veränderungen im Verhältnis zwischen T-Helfer-Zellen und T-Suppressor-Zellen können zu Autoimmunität führen (Konzept Klonaler Balance) (Pranzatelli 1996).

Im Verlauf ihrer Entwicklung lernen T-Zellen, zwischen körpereigenen und Fremdproteinen zu unterscheiden. T-Zellen ohne Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen besitzen autoreaktives Potential und sind in der Lage, körpereigene Proteine zu erkennen. Um den Körper nicht zu schädigen, werden autoreaktive T-Zellen über den Vorgang der klonalen Deletion im Verlauf des Reifungsprozesses im Thymus entfernt. Während die-

ses Reifungsprozesses können allerdings nicht alle Antigene exprimiert und den T-Zellen präsentiert werden, um eine Selbst-Toleranz zu vermitteln (Pranzatelli 1996). Aus diesem Grund weisen einige T-Zellen Rezeptoren auf, welche in der Lage sind, organspezifische Selbst-Antigene oder ihre kryptischen Bestandteile zu erkennen (Pranzatelli 1996). Ob diese Selbst-Antigene eine Autoimmunreaktion auslösen, ist von der Konzentration des Antigens abhängig. In den meisten Fällen werden die Proteine in zu geringen Mengen im Körper exprimiert, um eine Immunantwort auszulösen.

Die humorale Immunantwort wird durch spezifische Antikörper, die von B-Zellen gebildet werden, vermittelt. B-Zellen können nach ihrer Aktivierung in zwei Gruppen eingeteilt werden: Plasmazellen als Antikörper sezernierende Zellen und Gedächtniszellen. Letztere dienen der Auslösung einer schnelleren Immunantwort bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen. Eine B-Zellaktivierung durch Antigene erfolgt unter Mithilfe von T-Zellen als Teil der zellulären Immunität. Antigene werden von Rezeptoren auf der Oberfläche naiver B-Zellen erkannt und gebunden. Über den Rezeptor in die Zelle geschleust, werden sie nach ihrem Abbau als MHC II/Peptid-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert. T-Zellen erkennen diesen Komplex, induzieren eine starke B-Zell-Proliferation und kontrollieren die Differenzierung sich klonal vermehrender Tochterzellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen. B-Zellen produzieren zu Beginn ihrer Differenzierung überwiegend IgM-Antikörper. Abhängig von den durch T-Zellen freigesetzten Cytokinen können sie aber im Verlauf der Differenzierung den Antikörperisotyp wechseln und sezernieren dann IgG-Antikörper, sowie in geringen Mengen IgA und IgE. B-Zellen können auch direkt, unabhängig von T-Zellen, durch ein Antigen aktiviert werden und Antikörper produzieren. Diese Proteine, auch als thymusunabhängige Antigene bezeichnet, sind Bestandteil bakterieller Erreger und lösen eine schnelle Immunantwort gegen den Erreger aus.

Im Verlauf der Embryonalentwicklung wird eine Untergruppe der B-Zellen gebildet. Mit dem Oberflächenprotein CD5 werden sie als CD5-B-Zellen oder B-1-Zellen bezeichnet. Sie sind in der Lage, allgemein verbreitete bakterielle und körpereigene Antigene zu erkennen. Auf Grund ihres geringen Rezeptorrepertoires haben sie eher Funktionen in der frühen, nichtadaptiven Phase einer Immunreaktion.

B-Zellen erkennen neben Krankheitserregern auch viele körpereigene Strukturen (Selbst-Antigene). Die auf diese Weise natürlich vorkommenden Autoantikörper sind multireaktiv (Sanz and Capra 1988). Autoantikörper gegen Zelloberflächenantigene wie Adhäsionsmoleküle oder Rezeptoren wirken pathogen und sind möglicherweise das

Ergebnis einer fehlerhaften Expansion natürlich vorkommender oder mutierter autoreaktiver Klone (Davidson et al. 1987; Sanz and Capra 1988). Autoantikörper können auch gegen Strukturen verschiedener Organe gerichtet sein, welche auf Grund anderer Ursachen zerstört wurden. Sie können auch Folge einer Organzerstörung sein. Virale Infektionen können die Bildung von Autoantikörpern induzieren, welche mit körpereigenen Proteinen kreuzreagieren (Zinkernagel 1993).

1.3.1 Kreuzreaktionen zwischen Gehirn und Immunsystem

Das Gehirn ist als immunologisch privilegierte Region durch die Blut-Hirn-Schranke vor Angriffen durch das Immunsystem geschützt. Nichtreaktive Lymphozyten, wie naive T-Zellen, sind nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Aktivierte T-Zellen hingegen können in Bereiche des Gehirns eindringen, verlassen diese aber wieder auf Grund einer fehlenden Stimulation durch Fremdproteine (Pranzatelli 1996).

Aktivierte B-Zellen können ebenfalls die Blut-Hirn-Schranke überwinden und lokal Antikörper produzieren (Pranzatelli 1996; Darnell and Posner 2003). Dadurch würde sich eine bei vielen paraneoplastischen Syndromen und anderen neurologischen Erkrankungen beobachtete intrathekale Produktion von Antikörpern gegen neuronale Proteine erklären (Furieux et al. 1990a; Pranzatelli 1996; Pranzatelli et al. 2004a; Pranzatelli et al. 2004b). Ein genauer Mechanismus wie aktivierte B-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, ist unbekannt (Pranzatelli 1996). MHC-Moleküle werden nur in geringem Maße auf der Oberfläche von Neuronen exprimiert und sollen so die Induktion einer Immunreaktion im Nervensystem vermeiden. Cytokine haben einen möglichen Einfluss auf zirkulierende Antikörper und sind an ihrem Eintritt in das Gehirn beteiligt (Rapoport et al. 1971; Morganti-Kossmann et al. 1992). Die normal im Liquor vorliegende IgG-Konzentration beträgt 0,2-0,4% der Plasmakonzentration (Pranzatelli 1996). Antigene können den immunprivilegierten Bereich zum Beispiel als Folge einer Verletzung verlassen, werden als fremd erkannt und treten mit T-Zellen in Wechselwirkung. Die Folge kann eine dauerhafte Immunreaktion gegen das Protein sein (Pranzatelli 1996).

1.3.2 Tumorimmunität

Wie bereits erwähnt, ist eine Aufgabe des Immunsystems die Identifizierung und Zerstörung entarteter Zellen, wobei T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen: der Tumor exprimiert Proteine, welche als Antigene wirksam sind und eine tumorspezifische T-Zellreaktion auslösen. An dieser zellulären Immunantwort sind dendritische Zellen, aber auch Makrophagen, cytotoxische T-Zellen und NK-Zellen beteiligt. Dendritische Zellen (DC) nehmen durch Makropinocytose extrazelluläre Antigene sowie apoptotische Tumorzellen auf. Durch Antigene aktiviert, wandern DC in periphere Lymphknoten und aktivieren über Peptid/MHC-Komplexe auf ihrer Oberfläche CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sowie B-Zellen (Darnell and Posner 2003; Albert and Darnell 2004). Cytotoxische T-Zellen können wiederum Tumorzellen abtöten und so das Wachstum des Tumors eingrenzen. Aktivierte B-Zellen reifen zu Plasmazellen heran und produzieren Antikörper gegen Tumorantigene, wodurch es auch zu einem eingeschränkten Tumorwachstum kommt (Darnell and Posner 2003). Von aktivierten T-Zellen abgegebene Cytokine aktivieren weitere an einer Immunantwort gegen den Tumor beteiligte Zellen. Eine Infiltration des Tumors durch Lymphozyten konnte bei verschiedenen Tumoren beobachtet werden (Darnell and Posner 2003; Pranzatelli et al. 2004a).

MHC I-Moleküle haben eine wichtige Funktion in Bezug auf das Tumorwachstum und eine Metastasierung. Verschiedene Tumore können einer Überwachung durch das Immunsystem entgehen, indem sie keine MHC I-Moleküle exprimieren und so nicht von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. In Neuroblastomen wurde die Expression von MHC I-Molekülen nachgewiesen (Dalmau et al. 1995). Im Vergleich dazu zeigten Neuroblastomzellen in Kultur eine geringe oder sogar fehlende Expression von MHC I (Lampson et al. 1983). Die fehlerhafte Expression von MHC II-Molekülen kann möglicherweise auch zu einer Autoimmunantwort führen (Collins et al. 1984).

Ein Neuroblastom ist in der Lage, Katecholamine zu produzieren. Diese können immunologische Funktionen wie die Lymphozyten Proliferation, zelluläre Migration und Antikörpersekretion beeinflussen und so zur Pathogenese im OMS beitragen (Pranzatelli 1996).

1.4 Pathogenese im OMS

Verschiedene Hinweise und Untersuchungen lassen darauf schließen, dass der Pathogenese im OMS ein immunologischer Mechanismus zu Grunde liegt. Patienten können erfolgreich mit ACTH (**adrenocorticotropes Hormon**) und Kortikosteroiden sowie anderen immunverändernden Arzneimitteln behandelt werden. Allgemein zeigte sich für Neuroblastom-Patienten in Verbindung mit einem OMS eine bessere Prognose in Bezug auf die Tumorerkrankung, als ohne das Syndrom (Altman and Baehner 1976; Mitchell and Snodgrass 1990; Koh et al. 1994; Rudnick et al. 2001).

Der Liquor betroffener Patienten weist oft eine Pleozytose und einen erhöhten IgG-Anteil auf (Darnell and Posner 2003). Bei OMS-Patienten mit einem Neuroblastom ist eine erhöhte Infiltration des Tumors durch inflammatorischen Zellen zu beobachten, im Speziellen T-Lymphozyten, B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Stephenson et al. 1976; Pranzatelli 1996; Darnell and Posner 2003; Pranzatelli et al. 2004a). Im Liquor wurden immunologische Veränderungen sowie ein Anstieg von IgG und IgM beobachtet (Pranzatelli 1996). Untersuchungen verschiedener Liquor- und Serumproben zeigten oligoklonale IgG Banden, welche nicht spezifisch waren, aber auf entzündliche Prozesse im Nervensystems hinwiesen (Kostulas et al. 1987).

In einer Studie wurde der Anstieg von $\gamma\delta$ -T-Zellen (2,7 fach) im Liquor von OMS-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen gemessen. Vermutlich sind $\gamma\delta$ -T-Zellen an der primären Immunantwort gegen den Tumor beteiligt und lösen weitere Immunreaktionen aus (Pranzatelli et al. 2004a). Zusätzlich wurde ein Anstieg (6,5 fach) CD19 positiver B-Zellen im Liquor von OMS-Patienten nachgewiesen. Ein Vergleich der Anteile CD19+ CD5+ und CD5 negativer B-Zellen im Blut zeigte interessanterweise keinen Unterschied zwischen OMS-Patienten und Kontrollgruppen (Pranzatelli et al. 2004b). Die Expansion von B-Zellen, welche in gesundem Liquor nur einen sehr geringen Anteil ausmachen, deutete auf eine intrathekale Antikörperproduktion hin (Furieux et al. 1990a; Pranzatelli et al. 2004a; Pranzatelli et al. 2004b).

Eine vorausgegangene Tumorbehandlung durch Resektion und Chemotherapie sowie die Behandlung über konventionelle Immuntherapien, wie die Gabe von Steroiden und ACTH, haben keinen Einfluss auf die beobachtete B-Zell Expansion (Pranzatelli et al. 2004b). Nach einer Tumorsektion konnten weiterhin immunologische Veränderungen im Liquor der Patienten beobachtet werden. Langfristig zeigten sich bei den Patienten Entwicklungsstörungen (Pranzatelli et al. 2004a). Eine aktuelle Studie über

die Wirkung konventioneller Immuntherapien ergab, dass ACTH oder Steroide im Vergleich zu intravenös verabreichten Immunglobulinen (IVIg) zu einer Senkung von BAFF im Liquor und Serum kindlicher OMS-Patienten führen (Pranzatelli et al. 2008). BAFF als *B-cell activating factor* spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Reifung von B-Zellen und ist als Serumbestandteil in vielen Autoimmunerkrankungen erhöht (Fabris et al. 2007; Pranzatelli et al. 2008). Eine mögliche Verbindung zwischen BAFF, der B-Zell Population und Autoantikörpern im Liquor von OMS-Patienten wurde jedoch noch nicht untersucht (Pranzatelli et al. 2008).

Untersuchungen von Gewebeproben beim kindlichen OMS sind begrenzt auf Grund guter Überlebenschancen betroffener Patienten (Pranzatelli 1996). Wenige Biopsien haben gezeigt, dass es im Krankheitsverlauf zu einem Verlust von Purkinje-Zellen und Körnerzellen mit begleitender Gliose kommt (Ziter et al. 1979; Tuchman et al. 1989). Läsionen im zentralen Bereich des Kleinhirns, ein Verlust von Purkinje-Zellen und eine bestehende Ataxie betroffener Patienten wiesen auf eine mögliche Störung im Kleinhirn und somit mögliche Lokalisation von OMS hin (Ziter et al. 1979; Tuchman et al. 1989; Clerico et al. 1993; Oguro et al. 1997). Diese klinischen und pathologischen Studien geben Hinweise darauf, dass einem OMS eine immun-vermittelte Pathogenese zugrunde liegt. Das schließt den Nachweis von Autoantikörpern im Serum von OMS-Patienten ein (Connolly et al. 1997). Autoantikörper gegen verschiedene neuronale Antigene wurden sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen mit einem paraneoplastischen OMS beobachtet (Connolly et al. 1997; Greenlee et al. 2001; Pranzatelli et al. 2002). Untersuchungen haben gezeigt, dass Autoantikörper an Oberflächenstrukturen von Neuroblastom- und Kleinhirnzellen binden, aber auch intrazelluläre Proteine erkennen (Blaes et al. 2005; Korfei et al. 2005; Beck et al. 2007). Diese Bindung von Oberflächenantigenen war auf neuronale Zellen beschränkt (Korfei et al. 2005). Zelloberflächenproteine, wie Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren, können durch Autoantikörper in ihrer Funktion gestört oder blockiert werden. Eine pathogene Wirkung von Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene war hingegen unwahrscheinlich (Pranzatelli 1996; Reichlin 1998). Eine Analyse funktioneller Effekte von Oberflächenantigen-erkennenden Antikörpern in OMS-Seren hat gezeigt, dass diese antiproliferativ und proapoptotisch auf Neuroblastomzellen wirken (Korfei et al. 2005).

Paraneoplastische Autoantikörper sind meist IgG, IgM und IgA Antikörper sind fast nie nachweisbar (Connolly et al. 1997; Greenlee et al. 2001). Untersuchungen der Subklassenverteilung von Autoantikörper in OMS-Patienten zeigten weiterhin, dass Anti-

körper gegen intrazelluläre und Oberflächenepitope überwiegend in die IgG3-Subklasse, weniger in die IgG1-Subklasse einzuordnen sind und so den Hinweis auf ein Protein als Antigen geben (Beck et al. 2007). Änderungen in der Gesamt-IgG3-Serumkonzentration konnten dabei nicht beobachtet werden (Beck et al. 2007). Bei Patienten mit Autoantikörpern gegen das Protein Hu war eine Antikörperreaktion hingegen auf IgG1-Antikörper begrenzt (Greenlee et al. 2001).

Identifizierte Autoantikörper können Antigene auf der Oberfläche von Pathogenen oder Tumorzellen erkennen, welche Sequenzhomologien zu körpereigene Proteine aufweisen und so kreuzreagieren (Molekulares Mimikry) (Pranzatelli 1996).

Autoantikörper gegen das Protein Hu wurden bei Erwachsenen mit einem paraneoplastischen Syndrom assoziiert mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom beschrieben, konnten aber auch bei OMS-Kindern mit einem zugrundeliegenden Neuroblastom nachgewiesen werden (Dalmau et al. 1990; Dalmau et al. 1991; Fisher et al. 1994; Korfei et al. 2005). Anti-Hu Antikörper, auch als ANNA1-Antikörper bezeichnet (*anti-neuronal nuclear antibody*), binden an Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem. Proteine der Hu-Familie (HuC, HuD, Hel-N1) werden im Kern differenzierter, reifer Neuronen exprimiert, aber auch in Neuroblastomzellen, Zellen des Nebennierenmarks und Bronchialzellen (Marusich et al. 1994). Als RNA-bindende Proteine sind sie in an Prozessen der mRNA-Regulation, dem mRNA-Transport und ihrer Stabilität beteiligt (Perrone-Bizzozero and Bolognani 2002). Untersuchtes Neuroblastom-Gewebe war zu 75% positiv für Hu-Proteine, dagegen konnten Antikörper gegen Hu im Serum von nur 4% der Patienten nachgewiesen werden (Dalmau et al. 1995).

Im Serum von Kindern mit einem OMS konnten Autoantikörper gegen das 210 kDa große Neurofilamentprotein nachgewiesen werden (Noetzel et al. 1987). Allerdings wurden diese Autoantikörper aber auch in Verbindung mit anderen neurologischen Erkrankungen und in gesunden Kontrollen beobachtet (Stefansson et al. 1985).

Autoantikörper gegen zytoplasmatische Antigene zerebellärer Purkinje-Zellen sowie Strukturen peripherer Nerven konnten im Serum von OMS-Patienten identifiziert werden (Cawley et al. 1984; Connolly et al. 1997). *Western Blot* Analysen zeigten ein charakteristisches Muster in der Bindung verschiedener neuronaler Antigene, welches nicht für die verwendeten Kontrollseren beobachtet werden konnte (Connolly et al. 1997).

Unter Verwendung einer Hirnstamm-cDNA Bibliothek wurden neue Antigene im OMS identifiziert. Resultierend aus der Analyse konnten diese in drei Gruppen eingeteilt werden: Proteine der postsynaptischen Einheit; Proteine, welche mit Nukleinsäuren

interagieren und ubiquitär exprimierte Proteine mit teilweise unbekannter Funktion. Neben den bekannten Antigenen HuC und HuD wurden auch Transkriptionsfaktoren und RNA-bindende Proteine identifiziert (Bataller et al. 2003). Die gefundenen Antigene wurden zum Teil nur bei einzelnen Patienten oder kleineren Gruppen beobachtet. Ein gemeinsames Antigen in OMS wurde dagegen nicht identifiziert (Bataller et al. 2003).

Einzelne Seren erwachsener OMS-Patienten erwiesen sich als positiv für anti-Ri-Antikörper, in der Literatur auch als ANNA2-Antikörper bezeichnet (Buckanovich et al. 1996). Diese Autoantikörper reagieren mit zwei Antigenen: Nova1 und Nova2. Nova1, als RNA-bindendes Protein, im Kern neuronaler Zellen lokalisiert, ist an *Splicing*-Vorgängen der mRNA des Glycin-Rezeptors beteiligt (Buckanovich et al. 1996). Diese regulatorische Funktion des Nova1-Proteins kann durch Autoantikörper blockiert werden und beeinflusst so möglicherweise die Expression des Rezeptors mit effektiver inhibitorischer Funktion im Kleinhirn. Nova2, eng verwandt mit Nova1, gehört auch zu den RNA-bindenden Proteinen und spielt möglicherweise eine Rolle im RNA-Metabolismus neuronaler Zellen (Yang et al. 1998). Es wird in weiten Bereichen des Gehirns, wie dem Mittelhirn, Kleinhirn und besonders stark im Cortex und dem Thalamus exprimiert und hat möglicherweise Einfluss auf neuronale Fehlfunktionen in OMS-Patienten, welche in Folge dessen Enzephalopatie und Demenz entwickeln (Yang et al. 1998).

Bei Patienten mit einem OMS als Folge einer Streptokokkeninfektion wurden Autoantikörper gegen das humane Protein Neuroleukin gefunden (Candler et al. 2006). Diese Autoantikörper zeigten eine Kreuzreaktivität gegen ein in der Struktur ähnliches Protein (Molekulares Mimikry) auf der Oberfläche von Streptokokken (Candler et al. 2006).

Zusammenfassend zeigt sich eine ausgeprägte Heterogenität in den bereits identifizierten Autoantikörpern assoziiert mit einem OMS. Kreuzreaktive Autoantikörper wurden nur für einzelne Patienten oder kleinere Patientengruppen mit einem paraneoplastischen OMS oder als Folge einer Infektion nachgewiesen. Ein gemeinsames Antigen als Auslöser einer Autoimmunreaktion und somit mögliche Ursache einer OMS-Erkrankung bei Kindern konnte bis heute nicht identifiziert werden.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Opsoklonus-Myoklonus Syndrom ist eine seltene neurologische Erkrankung bei Kindern und Erwachsenen. Neben einer idiopathischen Form und Intoxikationen als Ursachen der Erkrankung ist in ca. 50% aller Fälle OMS als PNS mit einem Tumor assoziiert. Klinische und pathologische Untersuchungen, wie die Identifizierung von Autoantikörpern im Serum kindlicher OMS-Patienten, deuten auf eine Autoimmunpathogenese beim OMS hin. Eine vermutete kreuzreaktive Bindung der Autoantikörper an tumorassoziierte und neuronale Proteine führt zu Schädigungen im Nervensystem, im Speziellen cerebellärer Strukturen. Bis heute konnte aber kein gemeinsames Antigen in OMS-Patienten assoziiert mit einem Neuroblastom identifiziert werden. Darauf basierend beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

1. Gibt es bei Kindern mit einem diagnostizierten OMS assoziiert mit einem Neuroblastom ein gemeinsames Autoantigen? Ausgehend von den vorhandenen Patientenproben sollen mittels *2D-Western Blot* und Proteomanalyse neue Autoantigene identifiziert werden. Weiterhin soll unter Verwendung verschiedener Antigenquellen eine Kreuzreaktivität der Autoantikörper gegen Proteine im Tumor und in neuronalem Gewebe untersucht werden. Ein gemeinsames Antigen, gegen welches die Mehrzahl der OMS-Patienten kreuzreaktive Autoantikörper aufweist, könnte als Tumormarker bei einer OMS-Erkrankung dienen und zu einer schnelleren Tumordiagnose führen.

2. Haben neu identifizierte Autoantigene die Fähigkeit RNA zu binden? Viele der beschriebenen paraneoplastischen Autoantigene sind RNA-Bindeproteine und in dieser Funktion an der post-transkriptionellen Kontrolle neuronal-spezifischer Gene beteiligt. In diesem Zusammenhang soll eine möglicherweise noch unbekannte RNA-Bindung neuer Autoantigene untersucht werden.

3. Haben Autoantikörper weitere funktionelle Effekte auf Neuroblastomzellen? Neben den durch OMS-Autoantikörper ausgelösten Effekten einer Proliferationshemmung und der Induktion apoptotischer Prozesse sollen weitere Funktionsanalysen im Bezug auf das Neuritenwachstum und die Migration von Neuroblastomzellen durchgeführt werden und so Aufschluss über die Tumorausbreitung geben.

4. Gibt es alternative Methoden zur Identifizierung neuer Autoantigene im OMS? Das *Screenen* einer Kleinhirn-cDNA Bibliothek soll alternativ zur 2D-Analyse Aufschluss über neue mögliche Antigene geben und so zu einem besseren Verständnis dieses komplexen Krankheitsbildes beitragen.

2. Material

2.1 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden Seren von vier Patientengruppen auf das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen neuronale Proteine hin untersucht: OMS-Patienten mit einem Neuroblastom (OMS⁺/NB⁺), OMS-Patienten ohne einen zugrundeliegenden Tumor (OMS⁺/NB⁻), Patienten mit einem Neuroblastom (NB) ohne ein begleitendes Syndrom sowie Seren gesunder Probanden. Insgesamt wurden Proben von 42 OMS-Patienten analysiert, wovon 19 kindliche OMS⁺/NB⁺-Patienten, 17 kindliche OMS⁺/NB⁻-Patienten und 6 erwachsene OMS-Patienten waren. Bei den kindlichen OMS-Patienten (OMS⁺/NB⁺ und OMS⁺/NB⁻) stammten 19 Seren von weiblichen Patienten und 17 von männlichen und das Durchschnittsalter dieser Patientengruppe beim Ausbruch der Krankheit lag bei $30,6 \pm 17,3$ Monaten (Mittelwert \pm Standardabweichung). Bei den verwendeten erwachsenen OMS-Patienten waren 3 Seren von männlichen und 3 Seren von weiblichen Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von $54,8 \pm 22,2$ Jahren. Die bei 19 von 42 OMS-Patienten diagnostizierten Tumore wiesen unterschiedliche Stadien auf. Tumorstadium I wurde bei 10 OMS-Patienten festgestellt, Stadium II lag bei 5 Patienten vor und Stadium III bei 4 Patienten.

In den Kontrollgruppen wurden insgesamt Seren von 13 NB-Patienten und 42 gesunden Probanden untersucht. Das Durchschnittsalter der NB-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme lag bei $25,3 \pm 12,9$ Monaten (Mittelwert \pm Standardabweichung), wovon 5 Patienten männlich waren und 8 weiblich. Die diagnostizierten Neuroblastome lagen in verschiedenen Tumorstadien vor. Stadium I zeigte sich bei 2 NB-Patienten, Stadium II bei 3 Patienten, Stadium III bei 2 und Stadium IV bei 6 Patienten. Das Serum gesunder Probanden (Kinder) wurde zu diagnostischen Zwecken entnommen und anonymisiert von der Kinderklinik zur Verfügung gestellt. Die Kinder hatten keine Autoimmun- oder Tumorerkrankungen und das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme lag bei $81,1 \pm 31,1$ Monaten (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Das Blut zur Gewinnung der Seren wurden den Kindern mit dem Einverständnis der Eltern entnommen und durfte für die vorliegende Studie verwendet werden. Patienten der Kontrollgruppe waren mit einer Verwendung der Seren für Untersuchungen einverstanden. Die Ethikkommission des Fachbereiches Medizin hat dieser Studie zugestimmt.

Die Seren wurden bis zu ihrer Verwendung portioniert bei -20°C gelagert.

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 3: in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft/Referenz
Top10	F ⁻ ; <i>mcrA</i> ; $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$; Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15; Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> ; <i>deoR</i> ; <i>araD139</i> ; $\Delta(ara\text{-}leu)$ 7697; <i>galU</i> ; <i>galk</i> ; <i>rpsL</i> ; (<i>Str</i> ^r); <i>endA1</i> ; <i>nubG</i>	zur Verfügung gestellt von AG Schmitz, Justus-Liebig- Universität Giessen
BL21(DE3)	F ⁻ ; <i>hsdS_B</i> ; (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻); <i>gal</i> ; <i>dcm</i> ; Stamm mit Protease-Defek (<i>ompT</i>); wird deshalb gern zur Überexpression verwendet; mit DE3, einem λ -Prophagen, der das T7-RNA Polymerase Gen trägt (mit IPTG induzierbar)	zur Verfügung gestellt von AG Schmitz, Justus-Liebig- Universität Giessen
XL-1 Blue	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>lac</i> ⁻ , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , [F ⁻ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15, <i>proAB</i> , <i>Tn10</i>]	Clontech (Wood et al. 1985)
BM25.8	<i>supE44</i> , <i>thi</i> $\Delta(lac\text{-}proAB)$ [F ⁻ <i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15] λ imm434 (<i>kan</i> ^R)P1 (<i>cam</i> ^R), <i>hsdR</i> (<i>r_{k12}</i> . <i>m_{k12}</i> -)	Clontech (Palazzolo et al. 1990)

2.3 Plasmide

Tabelle 4: in dieser Arbeit verwendete Plasmide in *E. coli*

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pNKH1	Ausgangsplasmid pBAD202/D-TOPO [®] (invitrogen), <i>araC</i> ORF, pUC ori, <i>Kan</i> ^R , C-terminale 6 x His-tag Sequenz, um MCS erweitert – dafür Vektor mit <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i> geschnitten, Stop-Codon	zur Verfügung gestellt von AG Schmitz, JLU Giessen
pNKH1/ <i>ALDH1A1</i>	Ausgangsplasmid pBAD202/D-TOPO [®] (invitrogen), <i>araC</i> ORF, pUC ori, <i>Kan</i> ^R , C-terminale 6 x His-tag Sequenz, um MCS erweitert – dafür Vektor mit <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i> geschnitten, Stop-Codon, <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> / <i>ALDH1A1</i> -Fragment (1500 bp)	diese Arbeit
pTriplEx	pUC ori, MCS, <i>loxP</i> -site, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> ⁻ , RBS- ATG _{<i>ompA</i>} , RBS-ATG _{<i>lacZ</i>} , (dT) ₁₃	clontech

2.4 Kulturmedien

2.4.1 Bakterienkultur-Medien und Agarplatten

Die im Folgenden angegebenen Medien werden nach ihrer Herstellung autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten werden dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 1,5% Agar (w/v) zugesetzt.

LB-Medium1 (Luria Bertani; (Sambrook et al. 1989))

10	g	Trypton-Pepton
5	g	Hefeextrakt
10	g	Natriumchlorid (171 mM)
add 1000 ml ddH ₂ O		

LB-Medium2 (Phagenbank)

10	g	Trypton-Pepton
5	g	Hefeextrakt
5	g	Natriumchlorid
add 1000 ml ddH ₂ O		

LB/MgSO₄-Medium

10	g	Trypton-Pepton
5	g	Hefeextrakt
5	g	Natriumchlorid
10	mM	MgSO ₄
add 100 ml ddH ₂ O		

1 M MgSO₄

24,65	g	MgSO ₄ •7H ₂ O
add 100 ml ddH ₂ O		

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch autoklaviert.

LB/MgSO₄-Soft-Top-Agar	10	g	Trypton-Pepton
	5	g	Hefeextrakt
	5	g	Natriumchlorid
	10	mM	MgSO ₄
	add 1000 ml ddH ₂ O		

Für die Herstellung von Soft-Top-Agar werden dem Medium vor dem Autoklavieren 0,72% Agar (w/v) zugesetzt.

LB/MgSO₄/Maltose-Medium	10	g	Trypton-Pepton
	5	g	Hefeextrakt
	5	g	Natriumchlorid
	10	mM	MgSO ₄
	0,2	%	Maltose
add 1000 ml H ₂ O			

20% Maltose-Lösung	20	g	Maltose
	add 100 ml ddH ₂ O		

Die Lösung wird vor dem Gebrauch steril filtriert und bei 4°C gelagert.

2.4.2 Medienzusätze

Tabelle 5: verwendete Antibiotika und Medienzusätze

Substanz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Kanamycin (kan)	50 mg/ml	50-100 µg/ml
Ampicillin (amp)	50 mg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin (tet)	15 mg/ml	15 µg/ml
Chloramphenicol (cam)	34 mg/ml	34 µg/ml
Carbenicillin (carb)	50 mg/ml	50 µg/ml
IPTG	2,4 mg/ml (10 mM)	2,4 mg/ml (10 mM)
L-(+)-Arabinose	20%	0,02%

2.5 Zelllinien

Tabelle 6: in dieser Arbeit verwendete Neuroblastom-Zelllinien

Zelllinie	Zell-Typ	Beschreibung	Herkunft
SH-SY5Y	Neuroblastom	Subklon der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH; epithelial-/ neuronal-ähnliche langgestreckte Zellen; Wachstum: adhären, Monolayer, Verdopplungszeit: >55 h	DSMZ
SK-N-SH	Neuroblastom	etabliert 1970; aus Knochenmark-biopsie eines 4-Jahre alten Mädchens mit metastasenbildendem Neuroblastom; Verdopplungszeit von 44 h; hohe Dopamin- β -Hydroxylase Aktivität; 2 morphologisch ausgeprägte Zelltypen: kleine „dornige“ Zellen; große epithelioide Zellen (Biedler, J.L. et al.)	

2.6 Oligonukleotide (metabion)

hB actinF 5'-ATT GCC GAC AGG ATG CAG AAG -3'

21 nt, komplementär zu Sequenz von β -Actin (human), sense, Fragmentgröße: 148 bp

hB actinR 5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA -3'

21 nt, komplementär zu Sequenz von β -Actin (human), antisense

GAPDH628F 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC -3'

20 nt, komplementär zu Sequenz von GAPDH (human), sense, Fragmentgröße: 431 bp

GAPDH1059R 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA -3'

20 nt, komplementär zu Sequenz von GAPDH (human), antisense

ALDH1A1-EcoRI 5'-TAT GAA TTC ATG TCA TCC TCA GGC ACG C-3'

28 nt, komplementär zu Sequenz von ALDH1A1 (human), sense, enthält *EcoRI*-Erkennungssequenz (grün hervorgehoben), Fragmentgröße: 1505 bp

ALDH1A1-HindIII 5'-TAT AAG CTT TGA GTT CTT CTG AGA GAT TTT C -3'

31 nt, komplementär zu Sequenz von ALDH1A1 (human), antisense, enthält *HindIII*-Erkennungssequenz (grün hervorgehoben)

RALDH1 646F	5'- CTC CTC TCA CTG CTC TCC AC -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von ALDH1A1, sense, Fragmentgröße: 493 bp	
RALDH1 1139R	5'- CCC CTT CTT TCT TCC CAC TC -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von ALDH1A1 (human), antisense	
RALDH2 334F	5'- AGT GTG GAG AAG GAT GGA TG -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von ALDH1A2, sense, Fragmentgröße: 508 bp	
RALDH2 842R	5'- TCC ACA GCA TAG TCC AAG TC -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von ALDH1A2 (human), antisense	
RALDH3 731F	5'- ACC TCT CAC CGC CCT TTA TC -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von ALDH1A3, sense, Fragmentgröße: 480 bp	
RALDH3 1211R	5'- CTT CCT TCT TCC CAC TCT CG -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von ALDH1A3 (human), antisense	
CYP26A 1548F	5'- TCT AAC CTG CAC GAC TCC TC -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von CYP26A1, sense, Fragmentgröße: 140 bp	
CYP26A 1688R	5'- TTC ACC TCG GGG TAG ACC AG -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von CYP26A1 (human), antisense	
CYP26B 1395F	5'- CGA CAT CCA CCG CAA CAA GC -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von CYP26B1, sense, Fragmentgröße: 148 bp	
CYP26B 1543R	5'- GCT TCT GCG CCT CCT GGT AC -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von CYP26B1 (human), antisense	
CYP26C 1228F	5'- TAT GGG ACA GTG TTC AAG AC -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von CYP26C1, sense, Fragmentgröße: 433 bp	
CYP26C 1661R	5'- TCC AGA GGC AGT GAG AAG AG -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz von CYP26C1 (human), antisense	
T7-Primer/3'- Sequencing primer	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz downstream der MCS im Vektor pTriplEx, antisense	
TriplEx5' LD	5'- GAA GCG CGC CAT TGT GTT GG -3'
20 nt, komplementär zu Sequenz downstream der <i>slip site</i> im Vektor pTriplEx, sense	
5' Sequencing primer	5'- TCC GAG ATC TGG ACG AGC -3'
18 nt, komplementär zu Sequenz upstream der <i>slip site</i> im Vektor pTriplEx, sense	

2.7 Geräte, Chemikalien und Enzyme

2.7.1 Geräte und spezielle Artikel

Dynabeads [®] MyOne [™] Streptavidin C1	DYNAL Biotech
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Biosciences
Sterilbank	ThermoScientific
Lichtmikroskop	Leica
Sonifier cell disruptor B15	Branson
Casy Counter	SchärfeSystem
Cell Counter (Zellzähl-Röhrchen)	SchärfeSystem
Nitrocellulose-Membran Ø 132 und 82 mm (runt)	Whatman
	Schleicher &Schuell
NAP [™] -25 Columns	Pharmacia Biotech
Nikon Eclipse TE2000-E	Nikon
Software NIS-Elements AR 2.30	Nikon
96-well Platten	nunc
96-well ELISA Platten (MaxiSorp)	nunc
Hybond [™] -P (Nitrozellulosemembran)	Amersham Biosciences
Hybond [™] -N+	Amersham Biosciences
Cellstar Gewebekulturschalen (Ø 145 mm)	greiner
14 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson
Petrischalen (Ø 9 cm)	greiner
Ultra Microplate Reader EL808i	Bio-Tek Instruments
KC4-Programm	Bio-Tek
48-well Mikrochemotaxis Chamber	NeuroProbe
Polycarbonate membrane 5µm pore	NeuroProbe, Inc.
BioPhotometer, 8,5 mm Lichtstrahlhöhe	eppendorf
Tischzentrifuge Mikro20	Hettich
Zentrifuge, Laborfuge 400R	Heraeus Instruments
Zentrifuge, Rotina 35	Hettich

2.7.2 Chemikalien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien zum Ansetzen verschiedener Pufferlösungen wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (München, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und sind hier im Einzelnen nicht aufgelistet.

2.7.3 spezielle Chemikalien und Lösungen

EZ-Link [®] Sulfo-NHS-Biotin Reagents	Pierce
RPMI-1640-Medium	GIBCO
100 x Penicillin/Streptomycin/Glutamine (PSG)	GIBCO
Fötale Rinderserum (FCS)	HyClone Perbio
d`NTP Mix	Finnzymes
Accutase	PAA
0,9% NaCl-Lösung	B.Braun
Protease-Inhibitor <i>Cocktail</i>	Sigma
complete, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor <i>Cocktail</i>	Roche
10 x PBS (-CaCl ₂ , -MgCl ₂)	GIBCO
<i>Cristal Violet</i>	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva

2.7.4 Molekularbiologische Kits

Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Thermo SCIENTIFIC
Genelute Mammalian Total RNA Kit	SIGMA
ImProm-II [™] Reverse Transcriptase	Promega
GeneAmp [®] RNA PCR	Applied Biosystems
Protino [®] Ni-IDA 2000 packed columns	Macherey-Nagel
peqGOLD Plasmid Miniprep KitI	PeqLab
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche
ImmunoPure [®] TMB Substrate Kit	Pierce
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences

2.7.5 Größenstandards DNA/Protein

PageRuler TM Prestained Protein <i>Ladder</i>	Fermentas
O`GeneRuler TM 1kb DNA <i>Ladder</i>	Fermentas
GeneRuler TM 100bp DNA <i>Ladder plus</i>	Fermentas
<i>Precision Plus ProteinTM Standards Dual Color</i>	BioRAD
Roti [®] Mark Western Marker	Roth

2.7.6 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Fermentas
T4 DNA Ligase	Fermentas
Polymerasen	Fermentas
Reverse Transkriptase	Promega
Reverse Transkriptase	Applied Biosystems
RNase	Fermentas
DNaseI	Roche
Lysozym	Sigma

Für die Enzyme benötigte Puffer wurden als 10 x bzw. 5 x Puffer von den Firmen mitgeliefert. Sie wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet und sind hier im Einzelnen nicht aufgelistet.

2.7.7 Antikörper

2.7.7.1 Primär-Antikörper

Enolase (H300) <i>rabbit polyclonal</i> Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Non Neuronal Enolase (<i>human specific</i>) <i>rabbit polyclonal</i> Antikörper	abcam
Anti-20S proteasome <i>subunit</i> $\alpha 6$, <i>clone</i> MCP20 <i>rabbit monoclonal</i> Antikörper	Millipore

anti-human CD56 (NCAM) <i>mouse monoclonal</i> Antikörper	Ancell
Bcl-2 (<i>human specific</i>) <i>rabbit polyclonal</i> Antikörper	Cell Signaling
beta Actin (<i>Loading control</i>) <i>mouse monoclonal</i> Antikörper	abcam
ALDH1A1 <i>rabbit monoclonal</i> Antikörper	abcam

2.7.7.2 **Sekundär-Antikörper**

Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP Antikörper	DakoCytomation
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	DakoCytomation
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	DakoCytomation
Streptavidin/HRP	DakoCytomation

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Flüssigkulturen werden unter aeroben Bedingungen bei 37°C in einem Schüttler bei ca. 180 rpm kultiviert. Die Kulturgefäße werden mit LB-Medium bis zu 1/10 ihres Nennvolumens gefüllt, was eine ausreichende Belüftung der Kultur gewährleistet. Haben die Bakterien natürliche oder plasmidgekoppelte Resistenzen, wird dem Medium das entsprechende Antibiotikum in den angegebenen Konzentrationen zugegeben, um einen Selektionsdruck aufrecht zu erhalten (Sambrook et al. 1989). Das Animpfen einer Kultur erfolgt mittels einer sterilen Pipettenspitze, einer sterilen Impföse oder der geeigneten Menge einer flüssigen Vorkultur. Die Sterilität der verwendeten Materialien wird durch das Arbeiten unter einer Sterilbank gewährleistet. Die Generationszeit von *Escherichia coli* beträgt 30 min und eine Übernachtskultur besitzt eine geschätzte Keimzahl von 2×10^9 Zellen/ml.

3.1.2 Plattenkulturen von *Escherichia coli*

Für die Herstellung von Plattenkulturen werden die Bakterien mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze oder einem Drigalsky Spatel auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Alle Arbeitsschritte erfolgen dabei unter sterilen Bedingungen.

3.1.3 Messung der optischen Dichte einer Kultur

Die Bestimmung der Zellzahl einer Bakteriensuspension erfolgt mittels der Methode der Trübungsmessung. Dabei nutzt man den Effekt der Lichtstreuung an den in einer Flüssigkultur enthaltenen Zellen. Die optische Dichte (OD) einer *E. coli*-Kultur wird bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen zellfreies Medium oder ddH₂O bestimmt. Dabei können die Proben direkt oder in einer entsprechenden Verdünnung eingesetzt werden, damit der Messbereich zwischen 0 und 0,3 liegt. Für die Bestimmung der Zellzahl gilt:

$$E. coli \quad OD_{600} = 1 \quad \text{entspricht ca. } 5 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$$

3.1.4 Herstellung von Dauerkulturen

Für die Aufbewahrung von Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum werden Dauerkulturen angelegt. Dafür werden von einer über Nacht kultivierten Bakteriensuspension (*E. coli*) 0,9 ml in ein Kryoröhrchen überführt und mit 0,1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Nach der Zugabe von DMSO sollten die Kryoröhrchen schnellstmöglich gekühlt werden, indem man sie in flüssigen Stickstoff überführt. DMSO wird als Gefrierschutzmittel eingesetzt, kann Wasser binden und gleichzeitig Makromoleküle stabilisieren. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgt bei -80°C.

3.1.5 Transformation

Allgemein versteht man unter dem Begriff der Transformation die Aufnahme freier DNA oder Fremd-DNA aus der Umgebung in die Zelle. Diese Aufnahme hat eine genetische Veränderung der Zelle zur Folge. Zellen, die in der Lage sind durch Transformation Fremd-DNA aufzunehmen, werden als kompetent bezeichnet.

3.1.5.1 Transformation von *Escherichia coli*

Die Hitzeschock-Transformation, auch RbCl-Transformation genannt, zählt zu den chemischen Methoden der Transformation. Für diese Methode werden CaCl₂- oder RbCl-kompetente Zellen verwendet.

3.1.5.2 Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen

Diese Methode basiert auf dem Verfahren nach dem Handbuch „*The QIAexpressio-nist*“ (Qiagen). Die Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli* Zellen beginnt mit einer frisch angelegten Plattenkultur des gewünschten Stammes. Von dieser Plattenkultur wird unter sterilen Bedingungen eine Einzelkolonie in 10 ml LB-Medium (ggf. mit Antibiotikum) angeimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wird am nächsten Tag 1 ml in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 kühlt die Kultur für 5 min auf Eis ab. Alle weiteren Schritte finden auf Eis oder bei 4°C statt. Die Kulturen werden unter sterilen Bedingungen in 50 ml Falcon Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 4500 rpm abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wird in 30 ml kaltem

TFB1-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4500 rpm, 10 min) wird das Zellpellet in 4 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden im Anschluss aliquotiert und bei -80°C gelagert.

TFB1-Puffer:	100	mM	RbCl
	50	mM	MnCl ₂
	30	mM	Kaliumacetat
	10	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin

Der Puffer wird auf einen pH-Wert von 5,8 eingestellt und sterilfiltriert.

TFB2-Puffer:	10	mM	MOPS
	10	mM	RbCl
	75	mM	CaCl ₂
	15	%	Glycerin

Der Puffer wird mit KOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und sterilfiltriert.

3.1.5.3 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*-Zellen

Für einen Reaktionsansatz werden 100 µl kompetente Zellen mit 1 bis 4 µl (20 bis 500 ng) Fremd-DNA gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis hat sich die Fremd-DNA an die Membran der Zellen angelagert. Der Hitzeschock erfolgt dadurch, dass die Zellen für 2 min einer Temperatur von 42°C ausgesetzt werden. Für eine anschließende Regeneration werden die Zellen in 1 ml vorgewärmtem LB-Medium bei 37°C für ca. 60 min inkubiert. Die Dauer der Regeneration ist dabei von der aufgenommenen Resistenz abhängig. Die Zellen werden dann auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.6 Überexpression von Fremdproteinen in *E. coli*

Die Entwicklung verschiedener, spezieller Expressionssysteme macht eine Überexpression von Fremdproteinen in *E. coli* möglich. In dieser Arbeit wurde ein Expressionssystem der Firma Invitrogen verwendet, welches die Herstellung eines rekombinanten His-tag Proteins ermöglicht.

3.1.6.1 pBAD/D-TOPO Expressionssystem

Für diese Arbeit wurde der Vektor pBAD202/D-TOPO[®] als Basisvektor verwendet und durch eine *Multiple cloning site* (MCS) erweitert. Der daraus resultierende Vektor erhielt die Bezeichnung pNKH1. In diesen Expressionsvektor wurde die Sequenz des zu exprimierenden Proteins kloniert, wodurch die Produktion eines His-tag Proteins möglich wird. Für die Überexpression wird der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet, welcher einen Protease-Defekt aufweist und somit für eine Überexpression gut geeignet ist. In diesen *E. coli*-Stamm wurde das pNKH1-*ALDH1A1* Plasmid transformiert, um die Überexpression des gewünschten Proteins zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wird von dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)+pNKH1-*ALDH1A1* zunächst eine 5 ml Kultur mit dem Antibiotikum Kanamycin (100 µg/ml) angeimpft. Material dieser Vorkultur wird wiederum in eine 30 ml Übernachtskultur mit dem gleichen Antibiotikum überführt. Die Übernachtskultur wird dann dazu verwendet am nächsten Tag eine 500 ml Kultur mit entsprechendem Antibiotikum auf eine OD₆₀₀ von 0,3 anzuimpfen. Die Kultur wird in einem Schüttler bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 0,6 -0,8 inkubiert. Hat die Kultur die gewünschte OD₆₀₀ erreicht, werden Proben mit einer OD₆₀₀ von 0,5 entnommen. Im Anschluss erfolgt eine Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 0,02% L-(+)-Arabinose. Nach weiteren 5 Stunden Inkubation wird erneut, wie oben beschrieben, eine Probe entnommen. Die Kultur wird nach der Probenentnahme abzentrifugiert (8000 rpm, 10 min, 4°C). Das entstandene Pellet wird bei -20°C gelagert oder zur weiteren Verarbeitung verwendet. Die vor und nach der Induktion entnommenen Proben werden ebenfalls abzentrifugiert (13.000 rpm, 3 min, RT) und die Pellets in 20µl 1 x SDS (*sodium dodecyl sulfate*) - Puffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen.

3.2 *Screening* einer cDNA-Bibliothek

Eine cDNA-Bibliothek besteht aus einer Sammlung verschiedener cDNAs, welche aus mRNA eines bestimmten Gewebes oder spezieller Zellen isoliert und umgeschrieben wurde. Auch als cDNA-Bank bezeichnet, enthält sie alle in einem bestimmten Gewebe exprimierten Sequenzen. Isolierte cDNA-Sequenzen werden in ein Plasmid kloniert, welches in ein λ -Phagengenom integriert ist (siehe Abb. 2).

Über eine Infektion von *E. coli*-Zellen werden Proteine, resultierend aus der eingebrachten cDNA, exprimiert. Die Proteine werden auf eine Membran übertragen und können für ein *Screening*-Verfahren genutzt werden. Durch die Inkubation der Membran mit Serum eines Patienten können positive Klone identifiziert und in Form von Plaques von der Platte isoliert werden. Über ein cre/lox-System kann das kodierende Plasmid aus dem Phagengenom herausgeschnitten werden und steht so weiteren Untersuchungen zur Verfügung.

3.2.1 Bakterienkulturen

Für das *Screenen* der cDNA-Bank werden zwei *E. coli*-Stämme verwendet. Das Anlegen frischer Plattenkulturen erfolgt nach dem in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen Protokoll. Der *E. coli*-Stamm XL1-blue wird auf LB/tet-Platten bei 37°C kultiviert während der Stamm BM25.8 auf LB/kan/cam-Platten bei 31°C wächst. Er exprimiert die Rekombinase cre. Beide Plattenkulturen werden nach einer Inkubation über Nacht bei 4°C gelagert und nach 2 Wochen für die Herstellung neuer Plattenkulturen verwendet.

3.2.2 Titerbestimmung der Phagenbank

Die Übertragung von Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran setzt voraus, dass diese in Form von Plaques einzeln und gut verteilt auf der Platte vorliegen. Aus diesem Grund wird der Titer der Bank bestimmt und eine optimale Verdünnung des Phagen-Lysates berechnet. Die Durchführung der Titer-Bestimmung erfolgt nach den Angaben des beiliegenden Protokolls des Herstellers. Der Titer wird in pfu/ml angegeben und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Anzahl der Plaques} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^3 \text{ } \mu\text{l/ml}}{\text{Menge } [\mu\text{l}] \text{ der ausplattierten Phagenverdünnung}}$$

3.2.3 Übertragung von Plaques auf eine Nitrozellulose-Membran

Für die Herstellung von *E. coli*/Phagenplatten wird mit dem *E. coli*-Stamm XL1-blue eine Flüssigkultur angeimpft. Ein Einzelklon wird in 15 ml LB/MgSO₄/Maltose-Medium überführt und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler (140 rpm) inkubiert. Die Übernachtskultur wird abzentrifugiert (4500 rpm, 10 min, RT) und das entstandene Pellet in 7,5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Neben der benötigten *E. coli*-Kultur werden LB/MgSO₄-Platten vorbereitet. Dafür wird LB/MgSO₄-Agar geschmolzen und in Platten (Petrischalen, Ø 145 mm bzw. 100 mm) gegossen. Nach dem Erstarren des Agars müssen die Platten gut getrocknet werden.

Das Phagen-Lysat wird in einer Verdünnung von 1:10.000 in 1 x λ *dilution buffer* aufgenommen. Aus dieser Verdünnung werden 0,6 μ l entnommen (ca. 2×10^4 pfu/ml). Diese 0,6 μ l werden mit 200 μ l XL1-blue Übernachtskultur, resuspendiert in MgSO₄, gemischt. Im folgenden Schritt wird der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit können die Phagen auf der Wirtszelloberfläche anheften. Während der Inkubationszeit wird LB/MgSO₄ Soft-top-Agar geschmolzen und in Röhrchen abgefüllt. Für die Überschichtung großer LB/MgSO₄-Masterplatten (Ø 145 mm) werden pro Platte 7 ml Soft-top-Agar vorbereitet. Im nächsten Schritt wird die Bakterien/Phagen-Mischung zu dem Soft-top-Agar gegeben und alles vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wird schnellstmöglich auf die vorbereitete und gut getrocknete LB/MgSO₄-Platte gegeben und gleichmäßig verteilt. Nach 10 min bei RT ist der Soft-top-Agar erstarrt. Die Platte wird kopfüber bei 42°C für max. 6 h inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wird die Platte in regelmäßigen Abständen auf eine Plaque-Bildung kontrolliert.

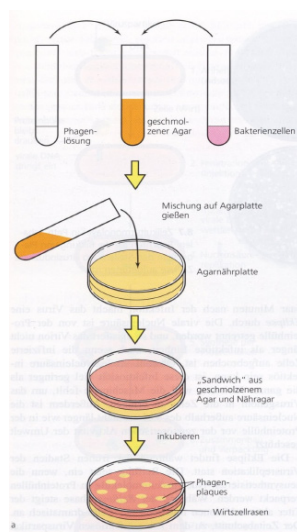


Abb. 1: Schematische Darstellung der Herstellung von Bakterien/Phagen-Platten bis zur Plaquebildung (Agarbeschichtungstechnik) (aus Brock, (Madigan et al. 2000)).

Wenn auf der Platte nach 3 - 6 h kleine Plaques sichtbar sind, wird sie aus dem Inkubator genommen. Mit zwei sterilen Pinzetten wird eine in 10 mM IPTG angefeuchtete Nitrozellulose-Membran (Ø 132 mm bzw. 82 mm) vorsichtig auf die Platte gelegt. Mögliche Luftblasen werden entfernt. Die Membran und ihre genaue Lage auf der LB-Platte werden markiert, um später positive Plaques identifizieren zu können. Die LB-Platte mit der Membran wird für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wird die Membran, auch *Replica*-Filter genannt, vorsichtig von der Platte genommen und in TBS-T überführt.

Nach dem Entfernen des ersten *Replica*-Filters kann die Platte für die Herstellung eines zweiten Filters verwendet werden. Dafür wird eine weitere in 10 mM IPTG angefeuchtete Nitrozellulose-Membran vorsichtig auf die Platte gelegt, markiert und bei 37°C für 3 h inkubiert.

10 x λ dilution buffer:	1	M	Natriumchlorid
	0,1	M	MgSO ₄ • 7H ₂ O
	0,35	M	Tris-HCl (pH 7,5)
	add 1000 ml ddH ₂ O		

Der Puffer wird vor dem Gebrauch autoklaviert und danach bei 4°C gelagert.

1 x λ dilution buffer:	100	ml	10 x λ dilution buffer
	0,01	%	Gelatine
	add 1000 ml ddH ₂ O		

Der Puffer wird vor dem Gebrauch autoklaviert und danach bei 4°C gelagert.

3.2.4 Immunoscreening mit dem *Replica*-Filter

Der *Replica*-Filter ist ein Negativ-Abdruck der *E. coli*/Phagen-Platte. Die Phagenvermehrung hat eine Lyse der Bakterienzellen zur Folge, als Plaque sichtbar. Jeder Plaque steht für ein in *E. coli* produziertes Protein, resultierend aus der durch den Phagen eingebrachten cDNA. Proteine werden so in ihrer nativen Form auf den Filter übertragen. Die weitere Behandlung des *Replica*-Filters erfolgt wie bei einer *Westernblot*-Membran (siehe Punkt 3.6.4.5). Nach mehreren Waschschritten mit TBS-T werden unspezifische Bindungsstellen mit einer Lösung aus Magermilchpulver geblockt (5%, w/v). Als *Primär*-Antikörper wird Serum von einem Patienten bzw. einer Gesundkon-

trolle verwendet. Das Serum wird 1:200 in 5%-Milch/TBS-T verdünnt und mit dem *Replica*-Filter über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wird die Membran 3 - 5 x mit TBS-T gewaschen. Als *Sekundär*-Antikörper wird *polyclonal rabbit anti-human* IgG/HRP 1:3000 in 5%-Milch/TBS-T verdünnt und auf die Membran gegeben (1 h, RT). Die Detektion positiver Spots wird unter Verwendung der ECLplus Detektionslösung durchgeführt.

3.2.5 Isolierung positiver Plaques

Positive Klone sind auf dem entwickelten Film als Punkt sichtbar. Jeder auf dem Film sichtbare Punkt kann einem Plaque auf der LB-Platte zugeordnet werden, auch positiver Plaque genannt. Für den weiteren Versuch müssen die positiven Plaques von der LB-Platte isoliert werden. Es werden 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit je 500 µl 1 x λ *dilution buffer* vorbereitet, entsprechend der Anzahl der zu isolierenden Plaques. Mit einer sterilen blauen Pipettenspitze werden positive Plaques aus der Platte bzw. aus dem Agar gestochen und in die vorbereiteten 500 µl überführt. Der Ansatz wird gevortext und über Nacht bei 4°C gelagert. In dieser Zeit werden die Phagen aus dem Agar-Block freigesetzt.

3.2.5.1 Herstellung kleiner *E. coli*/Phagenplatten

Ausgehend von einer großen Masterplatte werden positive Plaques isoliert. Diese Phagenlysate können für die Herstellung kleiner *E. coli*/Phagenplatten (Ø 100 mm) verwendet werden. Dadurch können Plaques besser vereinzelt werden und es kann nicht zu möglichen Überlagerungen von Phagen-Klonen kommen. Pro Phagenlösung wird 1 µl Lysat mit 200 µl XL1-blue Kultur gemischt. Für die Übersichtung der Platten sind 3 ml Soft-top-Agar nötig. Alle weiteren Schritte erfolgen nach dem in Punkt 3.2.3 beschriebenen Protokoll.

3.2.6 Umwandlung von λ TriplEx2-Klonen in pTriplEx2-Klone

Für weitere Untersuchungen ist die Umwandlung positiv transduzierter *E. coli*-Klone in Plasmid-tragende *E. coli*-Klone nötig. Über ein cre/lox-System wird das Plasmid aus dem Phagen genom freigesetzt. Im Phagen genom ist das Plasmid durch *loxP sites* flankiert. In Kombination mit dem *E. coli*-Stamm BM25.8 kommt es zu einer,

durch die Rekombinase cre vermittelten, Freisetzung des Plasmids aus dem Phagengenom.

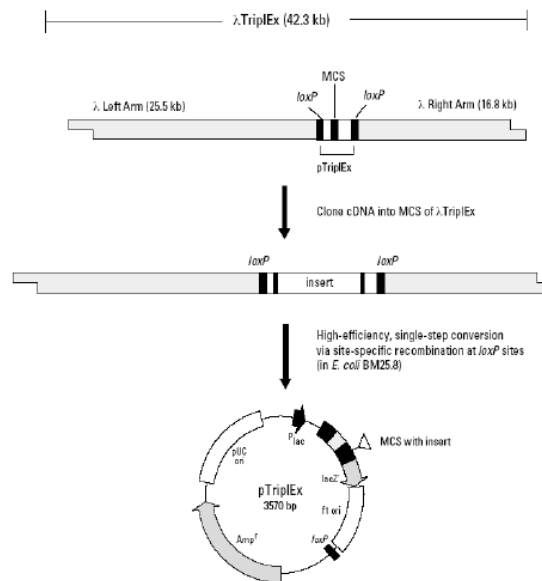


Abb. 2: Schematische Darstellung des Phagengenoms mit dem integrierten Plasmid. Über das cre/lox-System kommt es zu einer Freisetzung des Plasmids (Protokoll, Clontech Laboratories, Inc.).

Durchführung:

Von dem *E. coli*-Stamm BM25.8 wird ein Einzelklon in 10 ml LB-Medium2 angeimpft. Die Kultur wird über Nacht bei 31°C in einem Schüttler (150 rpm) inkubiert. Am darauf folgenden Tag werden zu der Übernachtskultur 100 µl 1 M MgCl₂ (Endkonzentration von 10 mM) gegeben. Positive Plaques werden mit Hilfe einer sterilen blauen Pipettenspitze aus der Platte isoliert und in 350 µl 1 x *λ*dilution buffer überführt. Die einzelnen Lysate werden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Für die Umwandlung werden 200 µl BM25.8 Übernachtskultur mit 150 µl Phagen-Lysat gemischt. Der Ansatz wird für 30 min bei 31°C inkubiert. Nach der Zugabe von 400 µl LB-Medium2 wird der Ansatz für weitere 60 min bei 31°C und 225 rpm inkubiert. Im nächsten Schritt werden 1 - 10 µl der *E. coli*/Phagen-Suspension auf einer LB/carb-Platte ausplattiert. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach einer erfolgreichen Umwandlung in das Plasmid p.TripIEx2 sind am nächsten Tag einzelne Klone auf der Platte sichtbar.

3.2.7 Identifizierung positiver pTriplEx2-Klone

Über verschiedene Methoden können pTriplEx2-Klone auf das Vorhandensein von cDNA-Fragmenten hin überprüft werden. Ein PCR-Schnelltest gibt ohne aufwendige Plasmidisolierung Aufschluss über das Vorhandensein von Fragmenten. Mehrere Klone können direkt von der Platte mit Hilfe einer PCR getestet werden (siehe Punkt 3.6.3). Im nächsten Schritt kann mit positiven Klonen eine Flüssigkultur angeimpft werden, um daraus die Plasmid-DNA zu isolieren (siehe Punkt 3.4.1). Ein Restriktionsverdau des isolierten Plasmids sollte das PCR-Ergebnis bestätigen (siehe Punkt 3.5.1). Eine Sequenzierung des klonierten cDNA-Bereiches gibt Aufschluss über die Sequenz und das daraus resultierende Protein.

3.3 Zellkultur-technische Methoden

Die Zellbiologie macht es möglich, Antworten auf medizinische Fragen zu finden. Zellen aus verschiedenen Organismen und Geweben können unter Laborbedingungen kultiviert werden. Sie stellen ein geeignetes System für die Untersuchungen verschiedener zellulärer Prozesse dar.

3.3.1 Kultivierung von Zellen und Herstellung von Subkulturen

Der Begriff Zellkultur bezeichnet die Kultivierung tierischer und humaner Zellen in einem Nährmedium außerhalb des Organismus. Man unterscheidet in der Zellkultur zwischen adhärennten Zellen und Suspensionszellen. In dieser Arbeit wurden die adhärennten Neuroblastom-Zelllinien SKN-SH und SH-SY5Y verwendet. Ausgehend von einer zu ca. 80% konfluenten, adhärennten Kultur gehört die Herstellung von Subkulturen zu einer Routineaufgabe in der Zellkultur.

Das Arbeiten in der Zellkultur beginnt mit dem Vorwärmen der benötigten Lösungen. Das Medium und die PBS-Lösung werden in einem Wasserbad bei 37°C angewärmt, Accutase bei RT. Alle folgenden Arbeitsschritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Flaschen und Geräte werden vor dem Gebrauch mit 70%igem Ethanol gereinigt.

Das alte Medium in der Kulturschale wird abgesaugt. Die Zellen werden mit 10 ml 1 x PBS gewaschen, um tote Zellen und alte Mediumreste zu entfernen. Im Anschluss daran wird das PBS wieder abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Accutase überschichtet,

um sie enzymatisch von der Unterlage zu lösen. Accutase ist eine Mischung proteolytisch und kollagenolytisch aktiver Enzyme. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 3 - 5 min bei RT haben sich die Zellen von der Platte gelöst. Die Enzymreaktion wird unter Verwendung von serumhaltigem Medium (Vollmedium) gestoppt, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt und abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT). Das entstandene Zellpellet wird in einem definierten Volumen frischem Medium gut resuspendiert. Die Zellsuspension kann direkt auf neue Zellkulturgefäße verteilt werden oder man entnimmt ein Aliquot für eine Zellzahlbestimmung. Das Volumen in der Kulturschale wird auf 10 ml mit RPMI-Vollmedium aufgefüllt. Die Kultivierung der Zellen findet dann in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97% statt.

11 x PBS:	88	g	Natriumchlorid (1,5M)
	2,2	g	KCl (0,03M)
	15,84	g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (0,02M)
	add 1000	ml	ddH ₂ O

Der Puffer wird auf einen pH von 7,4 eingestellt und steril filtriert.

1 x PBS:	500	ml	UltraPure Water (steril)
	50	ml	11 x PBS
RPMI-Medium:	500,00	ml	RPMI-1640-Medium
(Vollmedium)	10	%	fötale Rinderserum (FCS)
	5	ml	100 x Penicillin/Streptomycin/ Glutamine (PSG)

3.3.2 Mediumwechsel

Das Medium enthält lebenswichtige Nährstoffe und Wachstumsfaktoren. Es dient der Versorgung der Zellen und ist essenziell für deren Wachstum und Vitalität. Abhängig von der Zelllinie muss nach 2 – 3 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Ein Grund ist, dass Zellen die im Medium vorhandenen Nährstoffe aufbrauchen. Außerdem werden durch den Stoffwechsel der Zellen Abfallprodukte in den Kulturüberstand abgegeben, was eine Verschiebung des pH-Bereiches zur Folge hat. Für einen

Mediumwechsel ist das enzymatische Ablösen der Zellen nicht nötig. Das Medium wird abgesaugt. Die Zellen werden danach mit 10 ml 1 x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wird vorsichtig frisches Kulturmedium in die Schale gegeben und die Zellen werden wieder in den Inkubator gestellt.

3.3.3 Einfrieren von Zellen - Kryokonservierung

Zellen werden für einen bestimmten Zeitraum in Kultur gehalten, z.B. für die Dauer eines Versuches oder Projektes. Sollen Zellen für spätere Experimente aufbewahrt werden, ist die Kryokonservierung ein typisches Verfahren zur zeitlich unbefristeten Lagerung. Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase sind für diesen Vorgang am besten geeignet. Das Einfriermedium ist eine Mischung aus Kulturmedium, Serum und Gefrierschutzmittel. In dieser Arbeit wurde als Schutzsubstanz DMSO verwendet, mit einer Endkonzentration von 10% (v/v). In seiner Funktion als Kryoprotektiva dringt es in die Zellen ein und führt zur Bildung kleinerer Kristalle im intrazellulären Raum. Der Serumanteil beträgt 20%. Für die Durchführung der Kryokonservierung werden die Medien vorbereitet. Zum einen wird ein 20%iges FCS-Medium sterilfiltriert und auf Eis gestellt. Das DMSO-Medium hat eine Endkonzentration von 10% DMSO, wird ebenfalls sterilfiltriert und kalt gestellt.

Die Zellen einer zu 80% konfluenten Kultur werden wie bereits beschrieben (Punkt 3.3.1) enzymatisch von der Platte gelöst und abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet aus einem Kulturgefäß wird in 1 ml kaltem FCS-Medium gut resuspendiert. In die vorbereiteten Kryoröhrchen werden je 500 µl kaltes DMSO-Medium vorgelegt. Im Anschluss daran wird die Zellsuspension mit je 500 µl auf die Röhrchen verteilt und diese schnellstmöglich auf Eis gestellt. Die gefüllten Kryoröhrchen werden in einem mehrstufigen Prozess eingefroren, um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden. Dafür werden sie in einen mit Isopropanol gefüllten Container gestellt und für 24 h bei -80°C gelagert. Die Zellsuspension wird so mit einer Abkühlrate von -1°C/min auf -80°C runtergekühlt und kann dann in Stickstoff überführt werden.

3.3.4 Auftauen von Zellen

Der Vorgang des Auftauens kryokonservierter Zellen aus dem Stickstofftank muss schnell durchgeführt werden. Die beim Einfrieren der Zellen verwendete Schutzsubstanz muss beim Auftauen schnellstmöglich aus den Zellen entfernt werden, sonst kann

ihre toxische Wirkung bei RT die Zellen schädigen. Vor dem Auftauen der Zellen wird frisches vorgewärmtes Medium in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt. Die aufzutauenden Zellen im Kryoröhrchen werden vorsichtig mit einer Pinzette in das 37°C warme Wasserbad gehalten. Der Vorgang ist beendet, wenn fast alle Eiskristalle aufgetaut sind. Das Röhrchen wird mit Ethanol gereinigt. Danach werden die Zellen schnellstmöglich in das vorbereitete Medium überführt und gemischt. Das Gefrierschutzmittel wird so verdünnt und kann die Zellen nicht mehr schädigen. Es folgt ein Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 5 min, RT). Das Zellpellet wird in einem definierten Volumen Medium gut resuspendiert und in ein Kulturgefäß überführt. In der Schale wird das Medium auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt. Die Zellen werden in den Inkubator gestellt. Nach einem Tag Inkubation wird ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.3.5 Bestimmung der Zellzahl

In der Zellkultur ist die gleiche Zellzahl in einem Versuchsansatz oft Ausgangspunkt für verschiedene Experimente. Für diese Arbeit wurde die Zellzahl mit Hilfe eines elektronischen Zellzählgerätes (*Casy Counter*) bestimmt. Dafür werden die Zellen von der Platte gelöst, abzentrifugiert und das Pellet in einem bestimmten Volumen Kulturmedium resuspendiert. Aus der Zellsuspension werden 20 µl entnommen und in ein Zählröhrchen mit 10 ml 0,9% NaCl-Lösung überführt. Die Zählung erfolgt automatisch durch den *Casy Counter*, welcher nach den Angaben des Herstellers benutzt wird.

3.3.6 Zytotoxizitäts-Assay

Der Begriff Zytotoxizität bezeichnet die Eigenschaft chemischer Substanzen Gewebszellen zu schädigen bzw. abzutöten. Über einen Zytotoxizitäts-assay wird die Vitalität der Zellen nach einer Behandlung gemessen. Es gibt viele Methoden, den Einfluss chemischer Substanzen auf die Zellen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde der LDH-Test für die Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener Stoffe verwendet.

3.3.6.1 LDH-Test

Die Methode basiert auf einer Messung der Plasmamembranpermeabilität durch die Quantifizierung der Freisetzung bestimmter Enzymen, wie der Lactatdehydrogenase (LDH), in den Kulturüberstand. LDH kommt als zytoplasmatisches Protein in allen Zel-

len vor. Es katalysiert den letzten Schritt in der anaeroben Glykolyse. Kommt es durch den Einfluss verschiedener Substanzen zu einer Schädigung der Zellmembran, wird diese permeabel für große Moleküle, wie LDH. Die Enzymaktivität im Zellüberstand wird photometrisch über die Konzentrationsabnahme von Nikotin-adenindinukleotid (NADH) bestimmt. Dieser Reaktion liegt die enzymatische Umsetzung von Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Lactat und NAD^+ zu Grunde.

Durchführung:

Abhängig von der Zelllinie werden $0,2 - 2 \times 10^4$ Zellen/well in einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät. Wenn die Zellen angewachsen sind, wird durch einen Mediumwechsel die Serumkonzentration auf 0,5% FCS reduziert. Serum enthält LDH-Konzentrationen, durch welche die Hintergrund-Absorption ansteigen kann. Die Zellen werden mit den Testsubstanzen über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Für die Messung der LDH-Aktivität wurde der *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* der Firma Roche verwendet. Die Vorbereitung der Proben und die Messung der Enzymaktivität erfolgt nach dem im *Kit* beiliegenden Protokoll und mit den darin enthaltenen Lösungen.

3.3.7 Migrations-Assay

Der Begriff Migration bezeichnet die aktive und auf einen Zielpunkt gerichtete Fortbewegung einer oder mehrerer Zellen. Dieser Vorgang ist mit einer Reorganisation des Zytoskeletts und Änderungen in der Adhäsion der Zellen verbunden. Äußere Signale vermitteln über die Bindung an Oberflächenrezeptoren die Migrationsrichtung der Zelle. Durch die Ausbildung von Lamellopodien und Filopodien wird dieser Vorgang unterstützt. Diese Form der Chemotaxis kann unter Verwendung einer *Boyden Chamber* untersucht werden. Die Kammer setzt sich aus zwei mit Medium gefüllten Bereichen zusammen, welche durch eine Membran getrennt sind. Zellen werden in die obere Kammer gegeben und können durch Poren der Membran in Richtung der unteren Kammer migrieren. Die Migration wird durch in der unteren Kammer befindliche chemotaktische Substanzen positiv beeinflusst. In einem Brutschrank werden die Zellen in der *Boyden Chamber* inkubiert, bis ein Konzentrationsausgleich zwischen beiden Kammern stattgefunden hat. Im Anschluss daran werden die Zellen auf der unteren Seite der Membran fixiert und gefärbt.

Durchführung:

Im ersten Schritt wird die *Boyden Chamber* für den Versuch vorbereitet. Sie besteht aus einer Bodenplatte, einer Silikondichtung und einem Deckel. Bodenplatte und Deckel sind durch eine Nummer gekennzeichnet, die übereinstimmen muss. Am Vortag des eigentlichen Versuchs wird die Membran, aus Polycarbonat, mit einer für die Zellen geeigneten Porengröße vorbereitet. Abhängig von den Zellen wird die Membran mit Collagen, Fibronectin oder Vitronectin über Nacht bei 4°C auf einem Roller beschichtet. Am Versuchstag wird sie kurz in eine PBS/Wasser Lösung gegeben (1:10) und danach vorsichtig zum Trocknen auf den Rand der Schale gelegt. Im folgenden Schritt werden die Zellen für den Versuch vorbereitet. Dafür werden sie von der Platte gelöst, abzentrifugiert und in einem definierten Volumen Medium aufgenommen und gezählt (siehe Punkt 3.3.5). Die Wells im unteren Teil der Kammer werden mit chemotaktischen Reagenzien oder Medium in einem Volumen von 25 µl pro Well luftblasenfrei befüllt. Dabei wird die Füllmenge so pipettiert, dass ein leicht positiver Meniskus entsteht. Danach wird die trockene Membran vorsichtig auf die gefüllten Wells gelegt. Die Membran besteht aus einer glänzenden und einer matten Seite. Beim Auflegen auf die Bodenplatte muss die matte Seite nach unten zeigen. Die Kammer wird mit der Silikondichtung und dem Deckel verschlossen und vorsichtig zugeschraubt. Die Zellen werden in Medium verdünnt und die Zellkonzentration so gewählt, dass die gewünschte Zellzahl einem Aliquot von 50 µl entspricht. Dieses Aliquot entspricht der Füllmenge eines Wells. In jede Öffnung der Deckplatte werden 50 µl Zellsuspension pipettiert, ohne den Einschluss von Luftblasen und ohne die Membran zu beschädigen. Für den Migrationsversuch wird die gefüllte Kammer in den Brutschrank gestellt und dort für einen definierten Zeitraum inkubiert. Die optimale Inkubationszeit wird in Vorversuchen bestimmt. Im folgenden Schritt wird die Kammer aus dem Brutschrank genommen und die Schrauben werden gelöst. Danach wird die Kammer kopfüber auf einen Stapel Papiertücher gestülpt. Der Deckel und die Silikondichtung werden von der Bodenplatte gelöst, welche nach oben zeigt. Auf der Silikondichtung liegt die Membran mit der matten Seite nach oben. Die Bodenplatte wird entfernt und in destilliertes Wasser gelegt. Auf der nach oben zeigenden matten Seite der Membran befinden sich die Zellen, die migriert sind. Nicht migrierte Zellen auf der glänzenden Seite der Membran werden abgeschabt. Dafür wird die Membran, fixiert mit Klammern, auf der glänzenden Seite in einer 0,9%igen NaCl-Lösung angefeuchtet und mehrmals über das Wischblatt gezogen (siehe Abb. 3). Migrierte Zellen werden fixiert, indem die Membran für 10 – 15 min in

eine Methanol/Aceton-Lösung (1:2, v/v) gelegt wird. Danach wird die Membran in Crystal-Violet überführt und für 1 h bei RT oder über Nacht gefärbt. Überschüssige Farbe wird durch das Spülen mit Wasser entfernt. Zum Trocknen der Membran wird diese auf einen Objektträger gelegt.

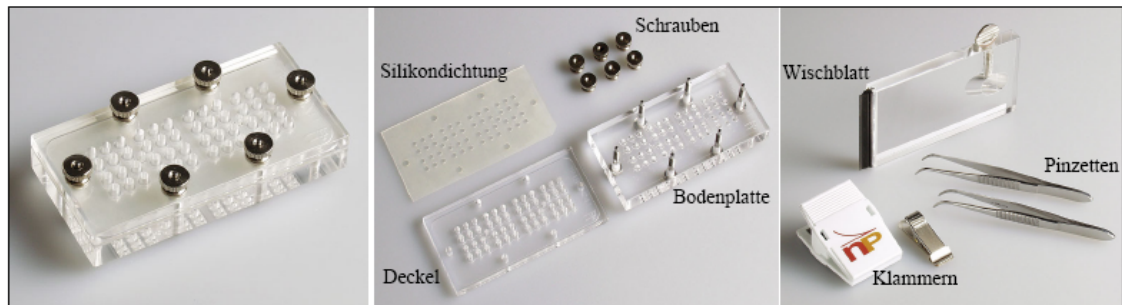


Abb. 3: Abbildung der Migrationskammer und zusätzlich benötigter Utensilien

Crystal-Violet:	20	%	Methanol
	0,5	%	Crytal-Violet
	add ddH ₂ O		

Für die Auswertung des Migrations-*assays* wird von der getrockneten Membran ein Photo gemacht. Die optische Dichte der einzelnen Migrationspunkte wird mit Hilfe der Software *Quantity one* (Biorad) ausgemessen und die Daten in eine Exceltabelle überführt.

3.3.8 Dendriten-Wachstum und Ausmessung der Dendritenlänge

In der Zellkultur verwendete Zelllinien haben verschiedene Eigenschaften und zeigen unterschiedlich morphologische Merkmale. Verschiedene Einflüsse und Behandlungen können zu Veränderungen in der Morphologie einer Zelle führen. Diese Veränderungen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dem Mikroskop Nikon Eclipse TE2000-E in Form von Phasenkontrastaufnahmen festgehalten. Im Anschluss daran werden unter Verwendung der speziellen Software *NIS-Elements AR 2.30* morphologische Veränderungen, wie die Dendritenlänge neuronaler Zellen, ausgemessen und ausgewertet.

Durchführung:

Die in dieser Arbeit verwendete Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y wird in eine Multiwellplatte ausgesät. Dafür wird die Zellzahl der Kultur bestimmt und so auf einer 24-well Platte verteilt, dass in jedem well die gleiche Anzahl Zellen vorliegt (siehe Punkt 3.3.5). Die Zellen werden über Nacht in einem Brutschrank kultiviert und können am Boden der Platte adhären. Am nächsten Tag werden die Zellen mit frischem Medium versorgt (siehe Punkt 3.3.2) und mit Retinolsäure (RA) behandelt. Dieser Ansatz wird für 24 - 48 h in einem Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wird das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen. Die Zellen werden durch die vorsichtige Zugabe einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) auf der Platte fixiert. Unter diesen Bedingungen können Zellen über mehrere Tage bei 4°C gelagert werden. Nach 3 – 4 Tagen empfiehlt es sich, dass PFA gegen 1 x PBS auszutauschen, um eine Kristallbildung der Lösung zu vermeiden. Von den fixierten Zellen werden unter Verwendung des Mikroskops Nikon Eclipse TE2000-E Phasenkontrastaufnahmen gemacht. Dabei werden pro well 8 Bilder aus verschiedenen Bereichen gemacht. Im nächsten Schritt werden die Zellen, im speziellen ihre Dendriten, unter Verwendung der Software *NIS-Elements AR 2.30* ausgemessen. Pro Bild werden die Dendriten von 10 Zellen ausgemessen und die daraus resultierenden Mittelwerte in eine Excel-Tabelle überführt. Für jedes Bild werden die einzelnen Mittelwerte dann zu einem zusammengefasst und können graphisch dargestellt werden.

3.4 Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.4.1 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA basiert auf der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). Dabei werden Bakterienzellen bei einem alkalischen pH-Wert in Gegenwart von SDS lysiert. Auf diesem Weg wird bakterielle DNA entfernt, weil DNA bei einem stark alkalischen pH denaturiert. Durch die Zugabe von Kaliumacetat wird das Lysat neutralisiert und Plasmid-DNA renaturiert. Proteine, Lipide und andere Zellbestandteile denaturieren in Gegenwart von SDS und fallen aus. Über einen folgenden Zentrifugationsschritt können diese präzipitiert werden. Die im daraus resultierenden Überstand vorliegende Plasmid-DNA kann in weiteren Reinigungsschritten isoliert werden.

3.4.1.1 Plasmid-Minipräparation nach *PeqLab*

Für die Isolierung sauberer Plasmid-DNA aus *E. coli* in größeren Mengen wird der *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit* der Firma *PeqLab* verwendet. Die Plasmidisolierung erfolgt nach dem beiliegenden Protokoll und unter Verwendung der enthaltenen Puffer und Säulen. Diese Form der Isolierung basiert auf der grundlegenden Methode der alkalischen Lyse und ermöglicht eine schnelle und einfache Isolierung von Plasmid-DNA.

3.4.2 RNA-Isolierung aus Zelllinien

RNA steht als Abkürzung für *ribonucleic acid* und ist wie DNA eine Nukleinsäure. Eine ihrer wichtigsten Funktionen in der Zelle ist die Umsetzung von genetischer Information in Proteine. Für die Isolierung von RNA aus Neuroblastomzellen wird das Reagenz *QIAzol™ Lysis Reagenz (QIAzol™)* der Firma Qiagen verwendet. *QIAzol™* enthält Guanidiniumisothio-cyanat (GITC), wodurch Zellen lysiert und RNasen sowie andere Enzyme inaktiviert werden. Ein weiterer Bestandteil dieses Reagenz ist Phenol, in dem sich Proteine und DNA gut lösen. Eine konfluente Zellkulturschale (Ø 10 cm) wird mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die adhärenen Zellen werden im Anschluss unter Verwendung von 1 ml *QIAzol™* von der Platte gelöst und dadurch lysiert. Das entstandene Lysat wird mit 10% des vorhandenen Volumens mit Chloroform aufgefüllt und gevortext, bis eine milchige Lösung entsteht. Im Folgenden wird der Ansatz abzentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, 4°C), wodurch sich drei Phasen bilden. Einer unteren organischen Phase liegt eine obere, wässrige Phase auf. Proteine befinden sich in der unteren organischen Phase. RNA liegt in der oberen wässrigen Phase vor. Zwischen diesen Phasen ist ein weißes Band sichtbar, auch Interphase genannt. Hier sammeln sich ausgefallene Proteine, Nukleotide und andere Zellbestandteile. Die wässrige Phase mit der darin enthaltenen RNA wird in ein sauberes, neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgt durch die Zugabe von ca. 1 ml Isopropanol und einer anschließenden Inkubation für eine Stunde bei -20°C oder über Nacht bei -80°C. Nach einem Zentrifugationsschritt (13.000 rpm, 15 min, 4°C) wird das entstandene Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, um Salze und Isopropanolreste zu entfernen. Das Pellet der so isolierte Gesamt-RNA wird getrocknet und je nach Größe in 20 bis 100µl RNase-freiem Wasser gelöst.

3.4.3 RNA-Isolierung aus Zelllinien nach *Sigma*

Für die schnelle Isolierung von RNA aus Neuroblastomzellen wird der *GenElute™ Mammalian Total RNA Kit* der Firma Sigma verwendet. Die Isolierung von RNA wird nach dem im *Kit* beiliegenden Protokoll durchgeführt. Die dafür benötigten Puffer und Säulen sind im *Kit* enthalten und werden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.4.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

3.4.4.1 OD-Messung mittels Absorptionsspektrometrie

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Messung wird mit einem Photometer und unter Verwendung einer Küvette (*UVette®* von Eppendorf) durchgeführt. Dabei wird die Nukleinsäurekonzentration aus der Absorption bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor berechnet. Bei einer Absorption von 1 geht man von folgenden Konzentrationen aus:

ds DNA	$1A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$
ss DNA	$1A_{260} = 30 \mu\text{g/ml}$
Oligonukleotide	$1A_{260} = 30 \mu\text{g/ml}$
RNA	$1A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$

(A_{260} = Absorption bei 260 nm)

Große RNA- bzw. DNA-Mengen müssen entsprechend verdünnt werden, weil eine zuverlässige Messung mit dem Photometer nur in einem Bereich von 0,1 – 1 möglich ist. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung lässt sich aus dem Verhältnis zwischen der $OD_{260\text{nm}}$ und $OD_{280\text{nm}}$ bestimmen. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung hat ein Verhältnis $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ von 1,8 – 2.

3.4.5 Biotinylierung isolierter Gesamt-RNA

Für den Nachweis von RNA als potenziellen Bindungspartner für Proteine kann diese durch einen Biotin-Anhang markiert werden. Unter Verwendung von *EZ-*

Link™ Psoralem-PEO-Biotin kann aus Zellen isolierte Gesamt-RNA einfach markiert werden. Die RNA-Isolierung erfolgt nach dem bereits beschriebenen Protokoll. Nach einer Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung wird diese auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Die Biotinylierung wird nach der dem Biotinpulver beiliegenden Anleitung des Herstellers durchgeführt.

3.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wird unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kits* der Firma *Qiagen* durchgeführt. Fragmente mit einer Molekülgröße von 70 bp bis 10 kb können aus einem Reaktionsgemisch extrahiert und gereinigt werden. Die für die Isolierung benötigten Puffer und *QIAquick spin columns* sind im Kit enthalten und werden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Um das gesuchte Fragment für eine Isolierung sichtbar zu machen, wird die mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennte Probe mit Ethidiumbromid gefärbt. Ethidiumbromid lagert sich als interkalierende Verbindung zwischen die Basenpaare der DNA und macht sie unter Verwendung von UV-Licht sichtbar. Im folgenden Schritt wird die gewünschte Bande mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Isolierung des Fragmentes aus dem Gelstück erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

3.4.7 Reinigung von Nukleinsäure-Fragmenten nach einer PCR oder anderen enzymatischen Modifikationen

Für die Reinigung von Nukleinsäure-Fragmenten oder Plasmiden nach einer PCR oder anderen enzymatischen Modifikationen wird der *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma *Qiagen* verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich, Fragmente im Bereich von 100 bp bis 10 kb zu reinigen. Dabei können Primer, Nukleotide, Polymerasen und Salzreste aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Die dafür benötigten Puffer und *QIAquick spin columns* sind im Kit enthalten und werden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.5.1 Restriktion von DNA

Zellen schützen sich durch ein Restriktions-Modifikationssystem vor dem Eindringen fremder DNA. Fremd-DNA wird von diesem System erkannt und abgebaut. Zelleigene DNA wird durch Modifikationen (Methylierungen) vor einem Abbau geschützt. Teil dieses Systems sind Restriktions-Endonukleasen. Sie spalten Fremd-DNA an spezifischen Sequenzen und erzeugen so Doppelstrang-Brüche. Die Restriktion von chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA macht man sich in der Molekularbiologie zu Nutze. Restriktionsenzyme erkennen Sequenzen von vier bis acht Basen und lagern sich in diesem Bereich an die DNA an. Dabei werden die Phosphodiesterbindungen doppelsträngiger DNA-Moleküle gespalten. In ihrer Erkennungssequenz schneiden die Enzyme in beiden Strängen an der gleichen Stelle oder um einige Basen versetzt. Daraus resultierende Fragmente weisen verschiedene Enden auf. Man unterscheidet glatte Enden (*blunt ends*) und bei einem versetzten Schnitt überstehende Enden (*sticky ends*). Die für einen Restriktionsverdau verwendeten Puffer und Reaktionsbedingungen werden nach den Angaben und Empfehlungen des Herstellers gewählt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes findet in den meisten Fällen bei 37°C statt. Nur wenige Enzyme benötigen für eine optimale Aktivität niedrigere oder höhere Temperaturen. Ein Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wird nach den Standardvorschriften (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Der Reaktionsansatz wird im Anschluss an den Verdau für 20 min auf 65°C bis 80°C erhitzt, was eine Inaktivierung der meisten Endonukleasen zur Folge hat. Die Überprüfung eines Restriktionsverdaus kann mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt werden (siehe Punkt 3.6.4.1).

3.5.2 Ligation von DNA

Unter dem Begriff Ligation versteht man die Verknüpfung von zwei DNA-Enden unter Verwendung des Enzyms Ligase. Bei dieser Enzymreaktion katalysieren DNA-Ligasen die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe unter Spaltung energiereicher Phosphatverbindungen. Die in dieser Arbeit verwendete T4-DNA-Ligase ermöglicht die Ligation glatter sowie überhängender DNA-Enden. Bei der Ligation von einem Fragment in einen Vektor sollte das Verhältnis von Fragment zu Vektor 3:1 betragen.

Ligationsansatz:	50 – 400	ng	Vektor-DNA
	X	ng	<i>insert</i> -DNA
	2	μl	10 x T4-Ligase-Puffer (enthält ATP)
	2/4	U	T4-DNA-Ligase (<i>sticky ends/blunt ends</i>)
add	20	μl	ddH ₂ O

Der Ligationsansatz wird über Nacht bei 16°C inkubiert. In einem folgenden Schritt wird der Ansatz für 15 min bei 65°C erhitzt, was eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge hat. Der Ligationsansatz kann aber auch direkt für die Transformation in *E. coli*-Zellen verwendet werden.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Banks Mullis entwickelt und dient der exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte *in vitro*. Die Methode basiert auf der enzymatischen Amplifikation kleinster DNA-Mengen in kurzer Zeit. Dadurch ist der Nachweis bestimmter Sequenzen aus einem Pool an DNA-Sequenzen möglich.

Ein PCR-Ansatz enthält neben freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP's) und entsprechenden Puffern, mit für das Enzym geeigneten Mg²⁺-Konzentrationen, geringe Mengen Ausgangs-DNA oder cDNA (*template*), eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und Oligonukleotidprimer. Bei einer PCR sollen beide Stränge des gewählten DNA-Abschnittes amplifiziert werden. Aus diesem Grund werden Oligonukleotidprimer mit einer Mindestlänge von 17 Nukleotiden so gewählt, dass sie komplementär zum DNA-Abschnitt sind und gegenläufig auf dem jeweiligen Strang binden. Unter Verwendung der DNA-Polymerase kann die Synthese des neuen Stranges am 3'-Ende des Primers beginnen. Ein PCR-Zyklus setzt sich aus drei Reaktionsschritten zusammen: Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird der Reaktionsansatz für 5 min auf 94°C erhitzt, was eine Trennung der DNA-Stränge zur Folge hat. Der zweite Schritt dient der Anlagerung (*Annealing*) der Primer an die Matrizen-DNA. Die für den Prozess der Hybridisierung geeigneten Temperaturen variieren stark und sind abhängig von der Basenzusammensetzung des Hybridisierungsbereiches. Die *Annealing*-Temperatur lässt sich mit folgender Formel berechnen: $T_a = [(4^\circ\text{C} \times \text{G/C}) + (2^\circ\text{C} \times \text{A/T})] - 5^\circ\text{C}$

Der dritte Schritt, die Elongationsphase, beinhaltet die Synthese der zur Matrize komplementären Stränge, ausgehend vom 3`-Ende der Primer.

Die Länge eines Reaktionszyklus ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Eine Grundregel besagt, dass für 1000 bp 1 min nötig ist. Eine PCR-Reaktion durchläuft meist 35 Zyklen, wodurch eine exponentielle Vervielfältigung des DNA-Bereiches zwischen den Primern möglich ist.

Eine PCR wird unter Verwendung eines *Thermocyclers* durchgeführt, in dem die Proben auf die gewünschten Temperaturen erhitzt oder abgekühlt werden. Die für eine PCR-Reaktion benötigten optimalen Bedingungen, wie die Anzahl der Zyklen, die *Annealing*-Temperatur und die Dauer der Synthese können im Gerät programmiert werden.

Standard-PCR-Ansatz in 20µl:	x	µl	DNA
	2	µl	10 x Puffer
	0,7	µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
	0,7	µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
	0,7	µl	dNTP's (10 mM)
	0,2	µl	Taq-Polymerase
	add	20	µl ddH ₂ O

Standardprogramm einer PCR:

Denaturierung vor dem ersten Zyklus:	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	30 sec.
<i>Annealing</i>	Ta	30 sec.
<i>Primer-Extension</i>	72°C	30 sec. – 2 min
Abschließende Synthese	72°C	10 min
Abkühlung	4°C	∞

3.6.2 RT-PCR

Diese Form der PCR setzt sich aus zwei molekularbiologischen Methoden zusammen. RT steht für Reverse Transkriptase und bezeichnet den ersten Teil einer RT-PCR. Im zweiten Teil wird unter Verwendung genspezifischer Primer eine Standard-PCR durchgeführt.

Mit Hilfe dieser Methode kann die Expression spezieller Gene in Zellen und Geweben untersucht werden. Für den Nachweis der Transkription spezifischer Gene ist die abgelesene RNA Ausgangspunkt der Analyse. Gesamt-RNA aus Zellen oder Geweben wird isoliert und unter Verwendung einer Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird als *template* in einer folgenden PCR-Reaktion eingesetzt. Daraus resultierende Fragmente können über eine Agarosegelelektrophorese analysiert werden (siehe Punkt 3.6.4.1).

Durchführung:

Die im ersten Schritt einer RT-PCR benötigte RNA wird wie in Punkt 3.4.3 beschrieben, aus Zelllinien isoliert. Im Anschluss daran wird die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA bestimmt und auf 0,5 - 1 µg pro Ansatz berechnet. Die cDNA-Synthese wird unter Verwendung der *ImProm-IITM Reverse Transcriptase* durchgeführt. Dafür notwendige Puffer, MgCl₂-Lösung und dNTP's sind im Kit enthalten und werden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Synthese wird in einem *Termocycler* nach dem im Kit beiliegenden Protokoll durchgeführt.

cDNA-Synthese-Programm:

Primerbindung	70°C	5 min
Abkühlen	4°C	5 min
<i>Annealing</i>	25°C	5 min
Synthese	42°C	60 min
Hitzeinaktivierung des Enzyms	70°C	15 min

Im Anschluss an die cDNA-Synthese wird eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt (siehe Punkt 3.6.1). Für einen späteren Vergleich der Proben wird von jedem Ansatz 1 µl cDNA als *template* eingesetzt. Danach werden die Proben auf einem Agarosegel analysiert.

3.6.3 PCR-Schnelltest

Mit dieser Methode ist eine schnelle Überprüfung und Identifizierung rekombinanter *E. coli*-Klone möglich. Mehrere Klone können daraufhin überprüft werden, ob sie das gewünschte *Insert* enthalten oder nicht, ohne das für alle Klone eine aufwendige Plasmidisolierung durchgeführt werden muss.

Die PCR-Reaktion wird dabei wie bereits beschrieben durchgeführt. Im Vergleich zu einer normalen PCR-Reaktion wird hier keine DNA als *template* verwendet, sondern Zellen. Damit erspart man sich die aufwendige Isolierung der Plasmid-DNA. Für eine Optimierung der PCR-Reaktion mit Zellen wird dem Reaktionsgemisch DMSO beigelegt. Von einer Transformationsplatte werden mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze einzelne Kolonien in saubere PCR-Reaktionsgefäße überführt. Damit im Fall eines richtigen Klones genug Zellen für weitere Analysen vorhanden sind, wird die Pipettenspitze danach auf einer *master plate* ausgestrichen. Als *master plate* bezeichnet man eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum, welche über Nacht bei 37°C inkubiert wird.

3.6.4 Gelelektrophorese

Die Methode der Elektrophorese basiert darauf, dass geladene Moleküle in einem elektrischen Feld wandern und ermöglicht so die Untersuchung von Nukleinsäuren und Proteinen. Wie sich die Moleküle in diesem Gel bewegen, hängt dabei von ihrer Größe, Form und Ladung ab. Die für diese Methode verwendeten Gele bestehen aus Polyacrylamid oder Agarose. Sie bilden ein komplexes Netzwerk, dessen Porengröße bei der Herstellung der Gele bestimmt wird. Kleine, kompakte Moleküle wandern schneller durch dieses Netzwerk als große, entfaltete Moleküle. Dadurch ist eine Größenauftrennung der einzelnen Bestandteile in einem Gemisch möglich.

3.6.4.1 Agarosegele

Eine Agarosegel-Elektrophorese dient der Untersuchung von Nukleinsäuren. PCR-Produkte, isolierte Plasmid-DNA und Restriktionsverdaus von Plasmid-DNA lassen sich so analysieren. Für die Herstellung der Gele wird die benötigte Menge Agarose eingewogen und mit 1 x TAE-Puffer auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt. Die Agarosekonzentration beträgt dabei meist 1% (w/v). Durch Aufkochen wird die Agarose vollständig gelöst. In die noch flüssige Agarose wird eine geringe Menge Ethidiumbromid gegeben und gut gemischt. Mit dieser Lösung wird, unter Verwendung einer Gel-Apparatur und einem Kamm, ein Gel gegossen. Ist das Gel erstarrt, kann es mit 1 x TAE-Puffer überschichtet werden. In die durch den Kamm entstandenen Taschen können nun die Proben pipettiert werden, welche zuvor mit 6 x Probenpuffer gemischt

wurden. Als Größenstandard werden 200 – 300 ng des entsprechenden Größenmarkers verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 100 V.

6 x DNA-Auftragspuffer:	60	%	Glycerol
	60	mM	EDTA
	0,1	%	Bromphenolblau (w/v)
50 x TAE-Puffer:	484	g	Tris
	114,2	ml	Essigsäure
	200	ml	EDTA (0,5M)
	add 2000	ml	ddH ₂ O

Der Puffer wird auf den pH-Wert 8,5 eingestellt.

1 x TAE-Puffer:	20	ml	50 x TAE-Puffer
	add 1000	ml	ddH ₂ O

3.6.4.2 Färbung von Agarosegelen

Für den Nachweis von DNA wird in das Gel Ethidiumbromid gegeben. Als interkalierende Substanz lagert es sich zwischen die Basenpaare der DNA und bildet zusammen mit der DNA einen fluoreszierenden Komplex. Dieser Komplex kann mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dadurch können neben doppelsträngiger DNA auch einzelsträngige DNA-Fragmente sowie RNA detektiert werden.

3.6.4.3 SDS-Polyacrylamidgele für die SDS *page*

Eine Polyacrylamidgelelektrophorese, auch SDS-*page* (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) genannt, wird zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen verwendet. Die Auftrennung erfolgt dabei nach Molekulargewicht.

Für die Herstellung der Gele und den Auftragspuffer wird SDS verwendet. SDS als anionische Detergenz bindet an die Proteine und denaturiert sie. Dadurch verlieren Proteine ihre Quartär- und Tertiärstruktur. Im folgenden Schritt werden die Proben gekocht und dadurch auch denaturiert.

Die Methode der SDS-*page* zeichnet sich durch eine hohe Trennschärfe aus und ermöglicht die Analyse von Proteinen und Proteingemischen, auch wenn diese schwer löslich sind. Die Möglichkeit einer Auftrennung basiert auf der Verwendung unterschiedlicher Puffer in Trenn- und Sammelgel. Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel ist gering, wodurch ein großporiges Netzwerk entsteht. Der Siebeffekt entfällt und die Proteine können konzentriert werden. Das Trenngel weist auf Grund der höheren Polyacrylamidkonzentration ein engmaschigeres Netzwerk auf, wodurch die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden können. Große, kompakte Proteine wandern durch dieses Netzwerk in einem elektrischen Feld nicht so weit wie kleine Proteine. Für die Herstellung der Gele werden zwei Glasplatten mit Ethanol gereinigt und zusammengebaut. Die Gel-Lösungen setzen sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

Tabelle 7: Zusammensetzung 10% bzw. 15%iger SDS-Gele

Lösungen	Trenngel [ml]*		Sammelgel [ml]*
	10%	15%	5%
Trenngelpuffer pH 8,8	2,5	2,5	
Sammelgelpuffer pH 6,8			2,5
Wasser	4,1	2,4	5,7
30%-Acrylamid Mix	3,3	5,0	1,65
10% APS	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,01	0,01

*Die Angaben beziehen sich auf 10 ml Trenn- bzw. Sammelgel.

Die Polymerisation der Acrylamid-Lösungen wird durch die Verwendung von Ammoniumperoxodisulfat (APS) ausgelöst. Katalysator dieser Reaktion ist ,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Das Trenngel nimmt ca. 2/3 des gegossenen Gels ein. Für eine glatte, luftblasenfreie obere Gelkante wird das Trenngel mit Isobutanol überschichtet. Wenn das Trenngel vollständig auspolymerisiert ist, wird das Isobutanol entfernt. Im nächsten Schritt kann das Sammelgel gegossen werden, in welches der Probenauftragskamm luftblasenfrei eingelassen wird. Für die Elektrophorese wird das fertige Gel in eine Gelelektrophorese-Apparatur (Biorad) eingebaut. Der zwischen den Gelen entstandene Zwischenraum sowie der Bereich um die Gele werden mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt.

Die Proteinproben können zum Auftragen auf das Gel vorbereitet werden. Dafür wird die Probe mit 5 x SDS-Auftragspuffer versetzt und für 5 min. gekocht. Der Puffer enthält neben Bromphenolblau 20% Glycerin. Durch die Zugabe von Glycerin erhöht sich die Dichte der Probe, wodurch sie in der Tasche bleibt und sich nicht mit dem Laufpuffer vermischt. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Probe wird neben den Proben ein Protein-Größenmarker als Standard aufgetragen.

5 x SDS-Auftragspuffer:	10	%	SDS
	20	%	Glycerin
	0,2	M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,05	%	Bromphenolblau

Vor der Benutzung des Puffers wird 1/10 β -Mercaptoethanol zugefügt.

Trenngel-Puffer:	90,825	g	Tris (1,5 M)
	20	ml	10%ige SDS Lösung (0,4%)
add	500	ml	ddH ₂ O

Der Puffer wird auf einen pH von 8,8 eingestellt.

Sammelgelpuffer:	24,2	g	Tris (1M)
	8	ml	10%ige SDS-Lösung (0,4%)
add	200	ml	ddH ₂ O

Der Puffer wird auf einen pH von 6,8 eingestellt.

Ammoniumpersulfat:	10	%	APS
add	100	ml	ddH ₂ O

10 x SDS Laufpuffer:	60,4	g	Tris (0,125 M)
	376,0	g	Glycin (1,25 M)
	200,0	ml	10%ige SDS Lösung
add	2000,0	ml	ddH ₂ O

3.6.4.4 Färben von SDS-Gelen

Eine häufig verwendete Methode SDS-Gele zu färben, ist die Coomassie-Färbung. Für den Nachweis geringerer Proteinmengen kann die Methode der Silber-Färbung angewendet werden. Diese Färbemethode ist sehr empfindlich und ermöglicht den Nachweis von Proteinmengen bis zu 0,1 ng.

In dieser Arbeit wurde die Methode der Coomassie-Färbung verwendet. Bei diesem Färbeverfahren ist der Nachweis von Proteinmengen bis zu 0,1 µg möglich. Die Färbung mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R250 findet in einer sauren Lösung bei RT für ca. 30 min statt. Die Proteine werden so fixiert, positiv geladen und können den Farbstoff binden. Weitere Farbstoffmoleküle können auf Grund hydrophober Effekte an die Proteine und den bereits gebundenen Farbstoff binden. Es werden mehr als 1 g Farbstoff/ g Protein gebunden. Der Farbstoff färbt unspezifisch alle Proteine sowie den Rest des Gels. Überschüssig gebundene Farbe wird durch die Verwendung einer Entfärber-Lösung entfernt. Wird das Gel für einige Zeit entfärbt, werden die Proteine als blaue Banden sichtbar.

Coomassie-Färbelösung:	2,5	g	Serva BlueR 250
	450,0	ml	Methanol
	100,0	ml	Essigsäure
	450,0	ml	ddH ₂ O

Die Färbelösung wird nach dem Lösen des Farbstoffes filtriert.

Entfärber:	320,0	ml	Isopropanol
	50,0	ml	Essigsäure
	add 1000,0	ml	ddH ₂ O

3.6.4.5 Western-Analyse von Proteinen (*Western Blot*)

Für den Nachweis spezifischer Proteine eignet sich die sensible Methode des *Western Blots*, auch Immunoblot genannt. Durch eine immunologische Reaktion können Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Dafür werden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen und sind so zugänglich für weitere Reaktionen. Vor der Zugabe

des ersten Antikörpers werden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Der erste Antikörper, auch als *Primär*-Antikörper bezeichnet, erkennt spezifisch das gesuchte Antigen. Durch kurze Waschschriffe werden ungebundene Antikörperreste entfernt. Der Nachweis des gesuchten Antigens erfolgt über einen zweiten Antikörper, auch *Sekundär*-Antikörper genannt, der konjugiert mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*Horse-radisch Peroxidase*, HRP) vorliegt. Dieser Antikörper ist gegen IgG-Bereiche des ersten Antikörpers gerichtet.

Durch die Zugabe der Substratlösung, die von dem konjugierten Enzym des *Sekundär*-Antikörpers umgesetzt wird, entsteht ein Chemilumineszenz-Signal in der Höhe des gesuchten Proteins, was auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

3.6.4.5.1 **Blotten von Polyacrylamidgelen**

Die Methode des *Western blotting* basiert auf dem Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Membran mittels Elektrophorese.

In dieser Arbeit wurde für das Blotten von SDS-Gelen das Tank *blotting*-Verfahren verwendet. Dafür wird das Gel nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus der Apparatur ausgebaut und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wird in ein *Sandwich* bestehend aus Whatman-Papier, einem Kunststoffgeflecht und der Membran eingebaut. Das Kunststoffgeflecht sowie das Whatman-Papier werden vor dem Gebrauch in Blot-Puffer eingelegt. Die PVDF-Membran wird vor dem Gebrauch mit Methanol angefeuchtet. Das Sandwich setzt sich wie folgt zusammen und wird auf die schwarze Seite eines *Clamping frames* (Biorad) gestapelt: 1 Kunststoffgeflecht, 1 Lage Whatman-Papier (1,4 mm), das Gel, die PVDF-Membran, eine 2. Lage Whatman-Papier (1,4 mm) und das 2. Kunststoffgeflecht. Der Rahmen wird geschlossen und in eine Halterung gesteckt. Diese Halterung wiederum wird in eine Blot-Apparatur (Biorad), einen Tank, eingebaut. Der Tank wird mit Blot-Puffer gefüllt und gekühlt.

Der Transfer der Proteine erfolgt bei 100 V von der Kathode (-) zur Anode (+) und somit aus dem Gel auf die Membran. Nach 1 Stunde ist der Transfer auf die Membran beendet. Nach dem *Blotten* wird die Membran für 5 min in TBS-Tween (TBS-T) gewaschen.

Für die immunologische Reaktion müssen auf der Membran unspezifische Bindungsstellen blockiert werden. Dafür wird die Membran in einer Lösung aus Magermilchpulver (5%, w/v) inkubiert. Der Blockierschritt dauert mindestens 1 Stunde bei RT. Im folgenden Schritt wird die Membran drei Mal kurz mit TBS-T gewaschen. Da-

nach wird der erste Antikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Verdünnungen der Antikörper werden den Angaben des Herstellers entnommen. In den meisten Fällen beträgt diese 1:1000. Im Anschluss daran wird die Membran drei Mal, für je 15 min, mit TBS-T gewaschen. Jetzt kann der zweite Antikörper (*anti-human* IgG/HRP; *anti-mouse* IgG/HRP oder *anti-rabbit* IgG/HRP) auf die Membran gegeben werden, meist 1:5000 in einer 5%igen-Milchlösung verdünnt. Die Membran wird so 1 Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss daran folgen wieder drei Waschschritte mit TBS-T.

Der *Blot* wird mit der ECLplus-Detektionslösung (Amersham Biosciences), einer 1:50 Mischung aus Lösung A und Lösung B für 3 min bedeckt. Diese Detektionslösung enthält das Substrat Luminol, welches von dem an den zweiten Antikörper gebundenen Enzym, der Meerrettichperoxidase, umgesetzt wird. Die Peroxidase katalysiert in Verbindung mit einem Peroxid, wie H₂O₂, die Oxidation von Luminol. Im Bereich des detektierten Proteins wird Licht emittiert. Die entstandene Chemilumineszenz wird auf einen Röntgenfilm übertragen und so sichtbar gemacht.

Blot- bzw. Transferpuffer:	12,125	g	Tris (0,02M)
	56,25	g	Glycin (0,15M)
	1000	ml	Methanol
	add 5000	ml	ddH ₂ O

10 x TBS-Puffer:	60,56	g	Tris (0,5M)
	87,66	g	Natriumchlorid (1,5M)
	add 1000	ml	ddH ₂ O

Der Puffer wird auf einen pH von 7,4 eingestellt.

1 x TBS-T-Puffer:	500	ml	10 x TBS
	5	ml	Tween (0,1%)
	add 5000	ml	ddH ₂ O

5%-Blockierlösung:	10	g	Milchpulver
	add 200	ml	1 x TBS-T

3.6.4.6 *Strippen von Western Blot Membranen*

Eine PVDF-Membran kann nach der Detektion des Antikörper/Enzymkonjugates mittels ECL-Lösung für weitere Antikörperreaktionen genutzt werden. Dafür müssen die bereits gebundenen *Primär*- und *Sekundär*-Antikörper von der Membran abgelöst werden (*strippen*). Die Membran wird nach dem Entwickeln in eine Schale überführt und 2 – 3 x mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss daran wird die Membran für 60 min bei RT in 50 – 100 ml *Stripping Buffer* auf einem Schüttler inkubiert. Danach folgen weitere 5 – 8 Waschschrte in TBS-T. Die Membran kann dann ausgehend von einem Blockierschritt für einen weiteren Antikörpernachweis verwendet werden.

<i>Stripping Buffer:</i>	10	ml	1M Glycine-Lösung
	1	ml	37%ige HCl
	add 90	ml	ddH ₂ O

3.6.4.7 *Line Blots*

Für die Untersuchung von Patientenseren auf das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen ein bestimmtes Protein werden *Line Blots* hergestellt. Dafür wird das mögliche Autoantigen als rekombinantes Protein über eine SDS *page* elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei befindet sich in jeder Proben tasche des Gels die gleiche Menge Protein (0,5 – 1 µg). Im Anschluss daran werden die Proteine über die Methode des *Western blottings* auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wird wie bereits beschrieben mit einer 5%igen-Magermilch-Lösung blockiert. Für die Inkubation mit verschiedenen Patientenseren wird der Blot in Streifen geschnitten. Jeder Streifen kann so separat mit einem Serum über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Das Serum wird 1:200 in einer 5%igen Magermilch-Lösung verdünnt. Als Sekundär-Antikörper wird ein *anti-human* IgG/HRP Antikörper verwendet. Die folgenden Schritte erfolgen entsprechend dem bereits beschriebenen Verfahren des *Western blottings*.

3.6.4.8 *Dot Blot*

Der Begriff *Dot Blot* bezeichnet das punktförmige Auftragen isolierter RNA- oder Proteinproben auf ein Trägermaterial, wie Nitrozellulose. Diese Methode dient ähnlich

einem *Western Blot* dem Nachweis spezifischer Proteine bzw. RNA mittels Antikörpern.

3.6.4.8.1 *Dot Blot* mit Proteinlösungen

Der *Dot Blot* wird als Alternative zu einem ELISA für den Nachweis nativer Proteine, immobilisiert auf einer Membran, verwendet. Ohne eine vorangegangene elektrophoretische Auftrennung kann die zu analysierende Probe mit Hilfe einer *Dot Blot*-Apparatur direkt auf die Membran pipettiert werden. Diese wird wie eine *Western Blot* Membran weiterbehandelt.

Durchführung:

Die *Dot Blot*-Apparatur wird vor Versuchsbeginn mit 70%igem Ethanol gereinigt. Für den Versuch wird eine Nitrozellulose-Membran vorbereitet (11 x 5,5 cm) und in *Binding buffer* gelegt. Die Proteinproben werden in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 1 x PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Apparatur wird mit der dazwischen liegenden Membran zusammengebaut und an eine Pumpe angeschlossen. Im nächsten Schritt werden die Proteinproben in die vorgesehenen Öffnungen der Apparatur pipettiert. Die angeschlossene Pumpe ist dabei eingeschaltet und saugt überschüssige Flüssigkeit durch die Membran ab. Nach dem Pipettieren der Proben bleibt die Pumpe noch 10 – 15 min eingeschaltet, um alle Flüssigkeit zu entfernen. Bevor die Membran aus der Apparatur genommen wird, wird ihre Lage markiert.

Die Membran wird in *Binding buffer* überführt und für 2 h bei RT auf einem Schüttler gewaschen. Der *Primär*-Antikörper wird in dieser Form der Durchführung durch biotinylierte RNA ersetzt. Diese wird in der gewünschten Konzentration in 30 ml *Binding buffer* gegeben. Die Membran wird mit der biotinylierten RNA (siehe Punkt 3.4.5) für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wird die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler in *Binding buffer* gewaschen. Als *Sekundär*-Antikörper wird Streptavidin/HRP 1:5000 in *Binding buffer* verdünnt und die Membran damit für 45 min bei RT inkubiert. Nach weiteren 2 – 3 Waschschritten über Nacht bei 4°C kann die Membran unter Verwendung der *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*-Lösung entwickelt werden. Die Substrate-Lösung wird nach den Angaben des Herstellers verwendet.

50 x Denhards:	1	%		Ficoll-PM 400
	1	%		Polyvinylpyrrolidone
	1	%		BSA
	add 200 ml ddH ₂ O			

Der Puffer wird in 20 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Binding buffer:	10	ml	1 M	Tris-HCl, pH 7,6
	2	ml	500 mM	EDTA
	20	ml	50 x	Denhards
	50	ml	1 M	Natriumchlorid
	add 1000 ml ddH ₂ O			

Der Puffer wird vor dem Gebrauch filtriert.

3.6.4.8.2 *Dot Blot* mit Nukleinsäuren

Der *Dot Blot* kann auch für die Überprüfung modifizierter Nukleinsäuren genutzt werden. Mit dieser Methode wird die Biotinylierung von RNA bzw. DNA kontrolliert. Unter Verwendung eines Streptavidin/HRP-Antikörpers kann der an die Nukleinsäuren angehangene Biotinteil detektiert werden.

Durchführung:

Die für die Durchführung notwendige *Dot Blot*-Apparatur wird mit 70%igem Ethanol gereinigt. Eine Nylon-Membran (HybondN 11 x 5,5 cm) wird vorbereitet und in *Binding buffer* gelegt. Die Apparatur wird wie bereits beschrieben (Punkt 3.6.4.8.1) zusammengebaut. Für die Probenvorbereitung werden die Nukleinsäuren in den entsprechenden Konzentrationen angesetzt und mit 1 x PBS auf ein Gesamtvolumen von 100 µl verdünnt. Im Anschluss daran werden die Proben in die vorgesehenen Öffnungen der Apparatur pipettiert. Danach bleibt die Pumpe weitere 10 min eingeschaltet, um überschüssige Flüssigkeit abzusaugen. Im nächsten Schritt wird die Membran kurz in *Binding buffer* überführt.

Über ein *UV-cross linking* können Nukleinsäuren an eine Nylonmembran gebunden werden. Dafür wird die Membran unter eine UV-Lampe gelegt und bei 254 nm für 10 min inkubiert.

Nach einem kurzen Waschschrift in *Binding buffer* wird die Membran mit einem Streptavidin/HRP-Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Der Antikörper wird 1:5000 in *Binding buffer* verdünnt. Es folgt ein weiterer Waschschrift über Nacht bei 4°C. Der Nachweis biotinylierter Nukleinsäuren, gebunden an eine Nylon-Membran, findet unter Verwendung der *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*-Lösung statt. Die Substrat-Lösung wird nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.6.4.9 *Enzyme linked immunosorbent assay* – ELISA

Der ELISA, auch als Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA) bezeichnet, ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Antigen-Antikörper-Komplexe immobilisiert auf einer festen Oberfläche. Die Methode basiert auf der Umsetzung eines chromogenen Substrates durch ein Enzym. Das Enzym kann dabei an das Antigen oder den Antikörper gekoppelt vorliegen. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine, Viren oder Antikörper in Proben wie Serum oder Urin nachgewiesen werden.

Durchführung:

Das zu untersuchende Protein wird in verschiedenen Konzentrationen angesetzt und mit 50 mM NaHCO₃ (pH 9,5) verdünnt. Die Proben werden in eine Mikrotiterplatte (MaxiSorp) pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wird der Überstand abgeklopft und die Platte einmal mit 1 x TBS gewaschen.

Unspezifische Bindungsstellen werden durch die Zugabe einer 3%igen BSA-Lösung in TBS-Puffer für 1 – 2 h bei RT geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift kann der erste Antikörper, das Serum oder biotinylierte RNA in die Platte gegeben werden. Die optimale Konzentration wird in Vorversuchen bestimmt. Dieser Ansatz wird für 1 h bei RT inkubiert. Danach wird die Platte dreimal mit 1 x TBS gewaschen und zwischendurch gut abgeklopft. Der *Sekundär*-Antikörper wird 1:5000 in TBS verdünnt und in die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wird für 45 min bei RT inkubiert und im Anschluss daran weitere dreimal gewaschen.

Der Antigen-Antikörper-Komplex wird unter Verwendung des *ImmunoPure*[®] *TMB Substrate Kits* in einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. Die Substrat-Lösung wird dabei nach den Angaben des Herstellers angesetzt und verwendet. Sie enthält das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und wird von dem an den *Sekundär*-Antikörper gekoppelten Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) umgesetzt. Die Enzymreaktion wird

durch die Zugabe einer 2 M H₂SO₄-Lösung gestoppt. Danach wird die Farbreaktion photometrisch in einem ELISA-reader bei 450 nm gemessen.

3.7 Proteinanalytik

3.7.1 Zellaufschluss-Methoden

Die Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen, Bakterienkulturen oder Gewebe basiert auf einem nicht-mechanischen oder mechanischen Aufschluss. Isolierte Proteine, als Makromoleküle mit verschiedenen Funktionen, sind nicht sehr stabil. Aus diesem Grund werden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt, um eine Degradation der Proteine zu verhindern. Der Aufschluss von Zellen hat auch die Freisetzung von Proteasen zur Folge, welche zu einer Degradation des Proteinextraktes führen können. Deshalb werden dem Aufschluss-Puffer Protease-Inhibitoren zugesetzt.

In jeder Zelle liegen verschiedene Proteasen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen vor. Aus diesem Grund verwendet man eine Mischung aus Protease-Inhibitoren, wie zum Beispiel Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) für die Hemmung von Serinproteasen. PMSF ist in wässrigen Lösungen nicht lange stabil und muss dem Puffer immer frisch zugegeben werden.

3.7.1.1 Proteinisolierung aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolierung von Proteinen aus eukaryotischen Zellen wird als Aufschluss-Puffer RIPA-Puffer verwendet. Vor dem Beginn der Isolierung wird der Puffer mit einem *Cocktail* aus Serin- und Cysteine Protease-Inhibitoren komplementiert. Dafür wird eine Tablette „*complete, Mini, EDTA-free*“ in 10 ml RIPA-Puffer gelöst.

In dieser Arbeit wurden Proteine aus adhärennten Zellen isoliert. Dafür werden die Zellen vor dem Aufschluss einmal mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Die noch adhärennten Zellen werden mit 1 ml RIPA-Puffer überschichtet und ca. 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran werden die Zellen mit einem Schaber von der Platte gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dieser Reaktionsansatz wird für weitere 30 min auf Eis inkubiert und dann abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, 4°C). Entstandene Zelltrümmer werden so aus dem Proteinextrakt entfernt. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und kann für eine folgende Konzentrations-Bestimmung auf Eis gelagert werden.

10 x PBS-Puffer:	400	g	Natriumchlorid (1,37 M)
	10	g	KCl (0,027 M)
	72	g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (0,081 M)
	12	g	KH ₂ PO ₄ (0,018 M)
	add 5000	ml	ddH ₂ O

Der Puffer wird unter Verwendung von NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt.

RIPA-Puffer:	50	mM	Tris-HCl, pH 7,4
	150	mM	Natriumchlorid
	1	mM	EDTA
	1	%	Triton-X-100
	0,1	%	SDS
	add 100	ml	ddH ₂ O

Kurz vor der Verwendung des Puffers werden 10ml Puffer mit einer Tablette „Protease-Inhibitor-Cocktail“ (*complete Mini*, Roche) versetzt.

3.7.1.2 Trennung und Isolierung von Membran- und Zytoplasmaproteinen aus eukaryotischen Zellen

Für die Untersuchung der Expression von Proteinen auf der Oberfläche von Zellen müssen diese von den anderen Proteinen der Zelle getrennt werden. In dieser Arbeit wurden die Membran- und Zytoplasma-Proteine adhärenter Zellen voneinander isoliert. Die Isolierung setzt sich aus zwei Hauptarbeitsschritten zusammen. Im ersten Schritt werden Proteine auf der Oberfläche intakter, lebender Zellen durch einen Biotinanhang markiert. Nach der Isolierung des Gesamtproteinextraktes können im zweiten Schritt die Proteinfractionen durch einen Biotin/Streptavidin *Pull-Down assay* getrennt werden.

3.7.1.2.1 Biotinylierung von Membranproteinen adhärenter Zellen

Unter Verwendung der *EZ-Link[®] Sulfo-NHS-Biotin reagents* ist eine einfache Markierung von Oberflächenproteinen lebender Zellen möglich. Die Zellen werden in Petrischalen (10 cm Durchmesser) angezogen und eventuell mit entsprechenden Substanzen stimuliert.

Für die Biotinylierung wird das Medium in der Schale abgesaugt. Die Zellen werden im Anschluss daran drei Mal vorsichtig mit 1 x PBS gewaschen. Von der frisch angesetzten Biotin-Lösung (1mg/ml) werden pro Schale 2,5 ml vorsichtig zu den noch adhären Zellen gegeben und diese damit bedeckt. Biotin ist lichtempfindlich. Aus diesem Grund werden alle weiteren Arbeitsschritte ohne Licht durchgeführt und die Reaktionsansätze mit Alufolie abgedeckt. Die Zellen werden auf Eis im Dunkeln für eine Stunde mit der Biotinlösung inkubiert. Danach werden sie dreimal für je 10 min mit 1 x PBS + 100 mM Glycin gewaschen. So wird überschüssiges, ungebundenes Biotin entfernt. Für den vierten Waschschrift wird 1 x PBS verwendet. Im Anschluss daran werden zu den gewaschenen Zellen 400 µl RIPA-Puffer mit entsprechenden Proteaseinhibitoren gegeben und die Platten so 10 min auf einem Shaker inkubiert. Das entstandene Zelllysate wird mit einem Schaber von der Platte gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Entstandene Zelltrümmer werden durch einen Zentrifugationsschritt vom Proteinextrakt getrennt (10.000 rpm, 10 min, 4°C). Dieser wird dann in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt.

Nach der Konzentrationsbestimmung des Extraktes werden 150 µg Protein in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und wenn nötig mit RIPA-Puffer auf ein Volumen von 300 µl aufgefüllt. In einem zweiten Eppendorf-Gefäß werden 60 µl Streptavidin-Beads (*Dynabeads[®] MyOne[™] StreptavidinC1*) vorbereitet und mit 60 µl RIPA-Puffer gewaschen. Die *Beads* werden danach in 50 µl RIPA-Puffer resuspendiert und zu dem vorbereiteten Proteinextrakt gegeben. Der Reaktionsansatz wird über Nacht auf einem Roller bei 4°C inkubiert.

3.7.1.2.2 Biotin/Streptavidin *Pull-Down Assay*

Die für die Isolierung verwendeten Streptavidin *Dynabeads* sind magnetisch und haben Streptavidin auf ihrer Oberfläche. Über Nacht konnten die mit Biotin markierten Proteine an das Streptavidin auf der Oberfläche der *Beads* binden. Durch die magnetischen Eigenschaften der *Beads* können markierte Membranproteine unter Verwendung eines Magneten von den zytoplasmatischen Proteinen getrennt werden. Die Zytoplasma-Fraktion wird in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt.

Über mehrere Schritte werden die *Beads* mit verschiedenen Puffern gewaschen, um so mögliche Kontaminationen durch zytoplasmatische Proteine zu entfernen. Im ersten Schritt werden sie mit 300 µl Puffer A gewaschen. Danach werden die *Beads* unter Verwendung von je 300 µl Puffer B zweimal gewaschen. In den folgenden 3 Waschschrift-

ten werden sie mit je 300 µl Puffer C gewaschen. Für den letzten Waschschrift wird Puffer D verwendet. Bei jedem Waschschrift werden die *Beads* in dem entsprechenden Puffer resuspendiert und im Anschluss daran für ca. 1 min in einen Magneten gestellt. Die Überstände der einzelnen Waschschrift werden verworfen.

Die *Beads* werden am Ende in 30 µl 1 x SDS-Auftragspuffer resuspendiert und können für eine elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-*page* verwendet werden.

Puffer A:	150	mM	Natriumchlorid
	50	mM	Tris-HCl, pH 7,4
	5	mM	EDTA, pH 8
Puffer B:	500	mM	Natriumchlorid
	50	mM	Tris-HCl, pH 7,4
	5	mM	EDTA, pH 8
Puffer C:	500	mM	Natriumchlorid
	20	mM	Tris-HCl, pH 7,4
	0,2	%	BSA
Puffer D:	10	mM	Tris-HCl, pH 7,4

3.7.1.3 Proteinisolierung aus humanem Gewebe

Für die Isolierung von Proteinen aus humanem Gewebe wird eine Kombination aus zwei mechanischen Aufschlussverfahren angewendet.

Ein kleines Gewebestück wird mit 400 µl 1 x PBS (-CaCl₂, -MgCl₂) und 100 µl Protease-Inhibitor *Cocktail* versetzt. In einem Homogenisator wird das Gewebe per Hand zerkleinert. Das entstandene Homogenat wird in ein sauberes 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Ein weiterer Aufschluss findet mit Ultraschall statt (3 x 15 sec.). Im Anschluss daran wird der Ansatz abzentrifugiert (10.000 rpm, 3 min, 4°C). Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und ein weiteres Mal abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, 4°C). Danach wird der klare Überstand erneut in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt. Der Proteinextrakt wird im Anschluss daran für folgende Versuche bei -20°C gelagert.

3.7.1.4 Proteinisolierung aus einer Bakterienkultur

Proteinextrakte aus Bakterienzellen, im speziellen *E. coli*-Zellen, werden durch eine Kombination von zwei Aufschlussverfahren gewonnen. Im ersten Schritt werden die Zellen enzymatisch behandelt und so zerstört. Der Ultraschallaufschluss als mechanisches Aufschlussverfahren wird im zweiten Schritt der Isolierung verwendet. Bei der Durchführung kann es zu einem Anstieg der Temperatur der Zellsuspension kommen. Aus diesem Grund werden die Proben während der Ultraschallbehandlung auf Eis gestellt. Grundlage dieser Methode ist, dass die Zellen aufgrund von Kavitationseffekten zerstört werden. Die Intensität und Dauer der einzelnen Impulse kann an dem Gerät manuell eingestellt werden und so für den Versuch optimiert werden.

Die Proteinisolierung aus Bakterienzellen wird nach dem im *Kit (Protino[®]Ni-IDA 2000 packed columns)* vorliegenden Protokoll durchgeführt.

1 x LEW-Puffer:	50	mM	NaH ₂ PO ₄
	300	mM	Natriumchlorid

Der Puffer wird unter Verwendung von NaOH auf einen pH-Wert von 8 eingestellt.

Vor der Verwendung des Puffers wird frisch 1 mM PMSF zugefügt.

PMSF:	0,174	g	PMSF
	add 10	ml	96%iges Ethanol

3.7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Bei der Weiterverarbeitung von Proteinlösungen ist oft die Konzentration der Lösung wichtig. Für die Untersuchung verschiedener Proteinproben mittels *SDS-page* ist es wichtig gleiche Proteinmengen zu laden, weil sonst kein Vergleich der Bandenintensität möglich ist.

Die Konzentrationsbestimmung kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. In dieser Arbeit wurde die Proteinbestimmung durch einen *BCA-assay* mit dem *Pierce[®]BCA Protein Assay Kit* der Firma Thermo Scientific durchgeführt (Smith et al. 1985). Diese empfindliche Methode der colorimetrischen Konzentrationsbestimmung basiert auf einer Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺. Unter Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA) wird unter alkalischen Bedingungen Cu²⁺ zu Cu¹⁺ reduziert. Die BCA-Lösung, eine 50:1 Mi-

schung aus Lösung A und Lösung B bildet mit Cu^{1+} einen lilafarbenen Komplex. Durch eine Absorptionsmessung im Bereich von 562 nm kann dann die Konzentration bestimmt werden.

Für die genaue Konzentrationsbestimmung wird bei jeder Messung eine Standardkurve verwendet. Diese besteht aus einer BSA-Verdünnungsreihe. Bei der Konzentrationsbestimmung isolierter IgG-Lösungen wird BSA durch eine Standard-IgG-Lösung (Sigma) ersetzt und auch als Verdünnungsreihe verwendet.

Durchführung:

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Standardreihe in Triplets pipettiert. Dafür werden 10 μl pro Konzentration in eine 96-well Platte pipettiert, beginnend mit der kleinsten. Von den zu messenden Proteinproben werden ebenfalls 10 μl pro Ansatz pipettiert. Sind die Proben zu hoch konzentriert, müssen sie in einer entsprechenden Verdünnung eingesetzt werden.

Zu der pipettierten Standardreihe sowie den Proteinproben werden 50 μl BCA-Lösung gegeben und vorsichtig gemischt. Die Platte wird mit einem Deckel verschlossen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran kann die Intensität der Färbung in einem Bereich von 562 nm gemessen werden.

3.8 Säulenchromatographische Methoden

Chromatographische Trennverfahren werden für präparative und analytische Untersuchungen verwendet. Die Methode basiert auf einer unterschiedlichen Verteilung von verschiedenen Stoffen auf zwei nicht mischbare Phasen. Bei allen chromatographischen Methoden liegt eine Phase stationär vor, die andere mobil. In einer Säulenchromatographie wird das Säulenfüllmaterial als stationäre Phase bezeichnet. Eine Lösung fließt als mobile Phase durch die Säule.

Bei der Säulenchromatographie unterscheidet man verschiedene Methoden, so zum Beispiel die Affinitätschromatographie und die Gelfiltration.

3.8.1 Affinitätschromatographie

Grundlage dieser Methode ist die spezifische Interaktion zweier Reaktionspartner, zum Beispiel von Enzym und Substrat oder von Antigen und Antikörper oder allgemein gesagt von einem Protein mit einem Liganden. In einer Säulenmatrix liegt kovalent ge-

bunden ein Ligand vor, an den der zu isolierende Stoff reversibel bindet und spezifisch wieder eluiert werden kann. Das gesuchte Protein kann so aus einem Pool an Proteinen isoliert und aufgereinigt werden.

3.8.1.1 Metallchelatchromatographie

Die Methode der Metallchelatchromatographie wurde mit dem *Protino[®]Ni-IDA 2000 packed column kit* der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Darin enthaltenen Lösungen und Materialien wurden nach den Empfehlungen des Herstellers und dem beiliegenden Protokoll verwendet.

Grundlage dieser Methode ist eine Wechselwirkung zwischen dem rekombinanten His₆-tag Protein und in der Säulenmatrix befindlichen Ni²⁺-Ionen. Unter Verwendung der Protino[®]Ni Agarose können PolyHis-tag Proteine spezifisch gereinigt werden. Unspezifische Proteine werden in mehreren Waschschritten entfernt. Der dafür verwendete LEW-Puffer ist im Kit enthalten und enthält kein Imidazol.

Das reversibel an die Säulenmatrix gebundene rekombinante Protein kann mit einem Elutionspuffer von der Matrix gelöst werden. Der Elutionspuffer enthält 250 mM Imidazol.

Durchführung:

Für eine Reinigung unter nativen Bedingungen werden die Zellen, unter Verwendung von Lysozym, aufgebrochen und der Proteinextrakt isoliert (siehe Punkt 3.7.1.4). Der klare Proteinüberstand wird für die Aufreinigung des rekombinanten Proteins verwendet. Alle folgenden Schritte werden auf Eis durchgeführt, um Schädigungen der Proteine zu vermeiden.

Im ersten Schritt der Aufreinigung wird eine neue Säule durch die Zugabe von 4 ml LEW-Puffer aktiviert. Der Puffer wird dabei direkt auf die trockene Membran der Säule pipettiert. Die Bindung des rekombinanten Proteins an das Säulenmaterial erfolgt durch die Zugabe des klaren Proteinüberstandes auf die Säule. Alle in den folgenden Schritten entstehenden Durchläufe werden einzeln gesammelt.

Unspezifisch gebundene Protein werden in 10 - 15 Waschschritten durch die Zugabe von je 2 ml LEW-Puffer entfernt. Das polyHis-tag Protein wird dann durch die Zugabe von 3 ml Elutions-Puffer eluiert. Die Elution erfolgt in ca. 10 Schritten mit je 3 ml Puffer. Das im Elutions-Puffer enthaltene Imidazol konkurriert mit dem His₆-tag Protein um die Bindestellen an die Ni²⁺-Ionen, wodurch das Protein eluiert werden kann. Die

gesammelten Durchläufe der Wasch- und Elutionsfraktionen werden auf einem SDS-Gel analysiert.

3.8.1.2 IgG-Isolierung aus Serum

Die Anreicherung einer Immunglobulinfraktion aus Serum wird mit Hilfe einer Affinitätschromatographie durchgeführt. Unter Verwendung von Protein G *Sepharose 4 Fast Flow* können Antikörper aus einem komplexen Gemisch wie Serum isoliert werden. Protein G bindet mit hoher Affinität IgGs über ihren Fc-Teil. Die Bindung erfolgt in einem neutralen bis schwach alkalischen pH-Bereich. Mit einem Glycin-HCl-Puffer werden die IgGs eluiert und die Lösung sofort neutralisiert.

Durchführung:

Für die Isolierung werden 100 µl Protein G Sepharose in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß überführt. Die Sepharose als vorgequollenes Gel wird 3 x mit je 1 ml 1 x PBS gewaschen und zwischendurch abzentrifugiert (5000 rpm, 1 min, 4°C).

Die Serumprobe wird mit 1 x PBS verdünnt. Es werden 100 µl Serum mit 400 µl PBS gemischt und auf die Sepharose gegeben. Sind von der Serumprobe nur 50 µl vorhanden, wird das fehlende Volumen mit PBS aufgefüllt. Die Bindung der IgGs an die Sepharose erfolgt über Nacht bei 4°C auf einem Roller.

Im nächsten Schritt wird der Reaktionsansatz abzentrifugiert (5000 rpm, 1 min, 4°C). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgesäß überführt. Im Folgenden wird die Sepharose 3 x mit je 1 ml PBS gewaschen und zwischendurch abzentrifugiert (5000 rpm, 1 min, 4°C). Die Elution erfolgt mit einem 0,1 M Glycinpuffer (pH 2,5). Die Sepharose wird mit 300 µl Puffer für 15 min bei RT auf einem Roller inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (5000 rpm, 1 min, 4°C) wird der Überstand in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgesäß überführt.

Die angereicherte IgG-Fraktion wird nach der Elution mit einem Tris-HCl-Puffer (pH 9) neutralisiert. Dafür wird der abgenommene Überstand (300 µl), das Eluat, mit 30 µl Tris-HCl-Puffer versetzt.

Für eine folgende Konzentrationsbestimmung wird die IgG-Fraktion auf Eis oder bei -20°C gelagert.

3.8.2 Gelfiltration

Die Methode der Gelfiltration basiert auf einer Trennung und somit auch Reinigung von Molekülen nach ihrer Größe und Form. Es ist eine Möglichkeit, Proteinlösungen zu entsalzen oder einen Pufferaustausch vorzunehmen.

Das Säulenmaterial, die stationäre Phase, besteht aus einem porösen Material. Kleine Kügelchen, bestehend aus hydrophilen Polysacchariden, wie Dextran und Agarose, sind durch ihre Kettenstrukturen zu einem dreidimensionalen Netzwerk verbunden und geben die Porengröße der Säule an.

Große Moleküle sind auf Grund ihrer Größe nicht in der Lage, in die Poren der Säulenmatrix einzudringen. Sie wandern mit dem Flüssigkeitsstrom durch die Säule und sind somit schneller als kleinere Moleküle. Diese können besser in die Poren der Kügelchen eindringen, wodurch ihre Wandergeschwindigkeit durch die Säule verringert ist.

3.8.2.1 Umpuffern von Proteinlösungen

Das über eine Affinitätschromatographie gereinigte His₆-tag Protein liegt in dem dafür verwendeten Elutionspuffer vor. Dieser enthält hohe Konzentrationen an Imidazol und anderen Salzen. Für die weitere Verwendung der gereinigten Proteinlösung muss ein Pufferaustausch vorgenommen werden.

Unter Verwendung einer NAPTM-25-Säule ist der Pufferaustausch einzelner Elutionsschritte möglich. Die Säulenmatrix besteht aus Sephadex[®]G-25, einer Form von Dextran. Als maximales Probenvolumen können 2,5 ml auf die Säule gegeben werden.

Durchführung:

Die Säule wird in eine Halterung eingespannt und auf beiden Seiten geöffnet. Nach dem Ablaufen der in der Säule befindlichen Flüssigkeit wird diese mit 5 ml 1 x PBS gespült. Wenn die Flüssigkeit durch die Säulenmatrix abgelaufen ist, kann die Proteinprobe (2,5 ml) auf die Säule gegeben werden. Der Durchlauf wird in einem sauberen 15 ml Falcon-Gefäß gesammelt. Die Elution erfolgt in 5 - 8 Schritten mit je 3,5 ml 1 x PBS. Die einzelnen Durchläufe werden gesammelt und auf Eis bzw. bei -20°C gelagert.

3.9 Statistik

Für die statistische Auswertung verschiedener Daten wurde in dieser Arbeit das Programm Graphpad Prism 4 Version 4.02 verwendet.

Die statistische Auswertung und ein Vergleich erhaltener Werte wurden mit einem T-Test durchgeführt. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der ANOVA-Test herangezogen. Die Spezifität von Autoantikörperbindungen wurde mit Hilfe der Vierfeldertafel berechnet und die Signifikanz mittels dem Chi-Quadrat Test überprüft. Ein Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

Das Opsoklonus-Myoklonus Syndrom (OMS) ist eine seltene neurologische Erkrankung und kann sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen beobachtet werden. Auslöser können Infektionen, Toxine oder Stoffwechselerkrankungen sein. In 50% aller Fälle hingegen ist OMS als paraneoplastisches Syndrom (PNS) mit einer Tumorerkrankung assoziiert (Pranzatelli 1996). Beim kindlichen OMS ist ein Neuroblastom der am häufigsten zugrundeliegende Tumor (Altman and Baehner 1976; Pranzatelli 1996; Rudnick et al. 2001). Im Vergleich dazu findet man bei Erwachsenen kleinzellige Lungenkarzinome oder Brustkrebs (Bataller et al. 2003). Verschiedene Hinweise lassen darauf schließen, dass es sich bei einem OMS um eine Autoimmunkrankheit handelt. Ein Hinweis ist die Identifizierung von Autoantikörpern gegen neuronale Strukturen und Proteine im Serum von OMS-Patienten. Da für das kindliche OMS bis heute kein gemeinsames Autoantigen identifiziert werden konnte, war es ein Ziel dieser Arbeit, neue Autoantigene zu finden und zu charakterisieren. Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss über die Funktion von Autoantikörpern in Bezug auf verschiedene Zellfunktionen geben.

4.1 Identifizierung von Autoantikörpern im OMS

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Autoantikörper aus OMS-Seren isoliert, an Oberflächenstrukturen von Neuroblastom- und Kleinhirnzellen binden (Blaes et al. 2005; Korfei et al. 2005). Des Weiteren wurde eine Bindung isolierter IgG-Fractionen an zytoplasmatische Proteine beobachtet (Korfei et al. 2005; Beck et al. 2007). Mittels der 2D-Gelelektrophorese sollten neue Antigene identifiziert werden.

4.1.1 2D-Western Blot Analyse für die Identifizierung neuer Autoantigene in Neuroblastom-Zellen

Für die Identifizierung neuer Autoantigene wurde eine 2D-Gelelektrophorese nach dem von O'Farrell und Gorg beschriebenen Protokoll durchgeführt (O'Farrell 1975; Gorg et al. 2000). Ausgangsmaterial für diesen Versuch war Proteinextrakt, isoliert aus der Neuroblastom-Zelllinie SKN-SH.

In der ersten Dimension werden die Proteine über eine Isoelektrische Fokussierung (IEF) nach dem pH-Wert aufgetrennt. Unter Verwendung von pH-Gradienten *Strips* (11 cm) mit einem festgelegten pH-Bereich von 3 – 10 (linear) wurden 460 µg Protein pro *Strip* aufgetragen und aufgetrennt. Die zweite Dimension ermöglicht eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Dafür wurden in vier parallelen Ansätzen Gradienten *Strips* auf 10%ige SDS-Gele überführt und die Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Für die spätere MALDI-TOF Analyse wurde ein Gel mit Coomassie gefärbt. Die Proteine der anderen drei Gele wurden durch *Western blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen.

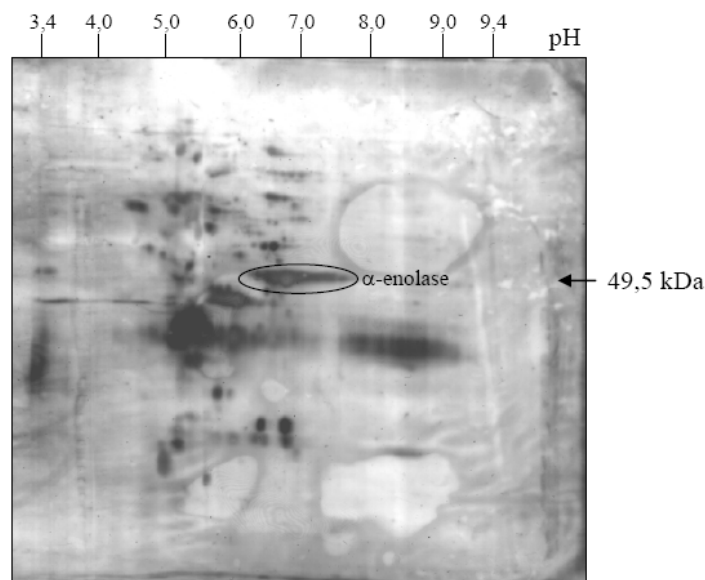


Abb. 4: 2D-Western Blot Analyse zur Identifizierung neuer Autoantigene

Proteinextrakt aus SKN-SH-Zellen (Neuroblastomzelllinie) wurde in einer Konzentration von 460 µg Protein pro 2D-Gel und 2D-Blot verwendet. Die Auftrennung in der IEF erfolgte über einen pH-Gradienten von 3 – 10 (linear). Im Folgenden wurden die Proteine über ein 10%iges SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Für die Detektion positiver Spots wurde die Membran mit Serum von Patient 4 inkubiert (M. Korfei, nicht veröffentlicht). α-Enolase wurde als neues Autoantigen identifiziert.

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mit einer Roti®-Block Lösung blockiert. Für die Identifizierung neuer Autoantigene im OMS wurden die Membranen mit Serum von OMS-Patienten inkubiert. Abb. 4 zeigt einen der drei *Western Blots* inkubiert mit Serum von Patient 4 (OMS⁺/NB⁺). Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:200 in einer 1 x Roti®-Block-Lösung verwendet. Es folgten mehrere

Waschschritte mit einer 0,05%igen PBS-Tween-Lösung (PBS-T). Der *Sekundär*-Antikörper anti-human IgG/HRP wurde 1:5.000 verdünnt.

Positive Protein-Spots auf dem *Blot* (Abb. 4) wurden aus dem entsprechenden Coomassie-Gel ausgestanzt. Insgesamt wurden 66 positive Spots aus dem Gel isoliert und nach einem insitu Trypsin-Verdau über eine folgende MALDI-TOF-Massenspektroskopie (MS) analysiert. Die Auswertung der MALDI-TOF-MS Daten erfolgte über die Datenbanksuche Mascot. Jedem isolierten Spot konnte ein Protein zugeordnet werden. Mit Hilfe der Autoantikörper im Serum von Patient 4 konnten insgesamt 12 potentielle Antigene identifiziert werden (siehe Anhang Tabelle IV). Neben dem bekannten Antigen HuD wurde ein Protein im Bereich von 49,5 kDa (pI 7,01) isoliert. Über eine Datenbanksuche konnte dieses Protein als α -Enolase identifiziert werden. Eine positive Reaktion gegen das Protein α -Enolase zeigte sich auch unter Verwendung von zwei weiteren OMS-Seren (Patient 1 und 3, siehe Anhang Tabelle I, Abbildung nicht gezeigt).

Die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese, die Herstellung der 2D-*Western Blot*-Membranen und die MALDI-TOF-MS-Analyse fanden in Kooperation mit Dr. Sigrid Schmitt (Biochemisches Institut) statt.

4.1.2 2D-*Western Blot* Analyse für die Identifizierung von Autoantigenen in humanem Kleinhirn

Autoantikörper im Serum von OMS-Patienten zeigen eine mögliche Kreuzreaktivität gegen Proteine, welche im Tumor aber auch in neuronalen Zellen exprimiert werden. Aus diesem Grund wurde eine zweite Proteom-Analyse mit 2D-Gelen und 2D-*Western Blots* durchgeführt. Ausgangsmaterial für diese 2D-Analyse war Proteinextrakt, isoliert aus humanem Kleinhirngewebe. Die Isolierung fand nach dem unter Punkt 3.7.1.3 angegebenen Protokoll statt. In parallelen Ansätzen wurden pro Gel 250 μ g Gesamtprotein eingesetzt. Die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese fand unter gleichen Bedingungen, wie bereits in Punkt 4.1.1 beschrieben, statt. Für die erste Dimension, die IEF, wurden pH-Gradienten *Strips* (11 cm) mit einem pH-Bereich von 3 – 10 (linear) verwendet. Über ein 15%iges SDS-Gel wurden die Proteine in der zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

Für die Identifizierung positiver Proteinspots mittels MALDI-TOF-MS Analyse wurde ein Gel mit Coomassie gefärbt und zeigt einen Überblick über alle aus dem Kleinhirngewebe isolierten Proteine (Abb. 5).

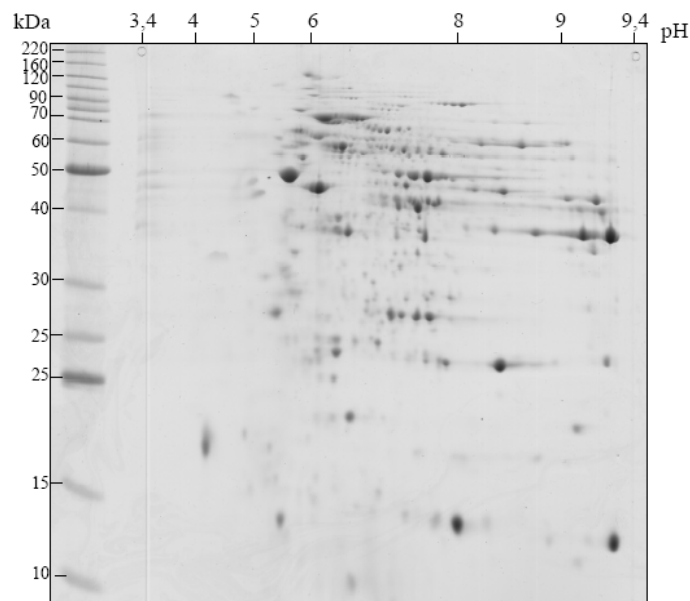


Abb. 5: 15%iges 2D-Coomassie-Gel mit Proteinextrakt aus humanem Kleinhirn. Proteinextrakt, isoliert aus humanem Kleinhirn, wurde in einer Konzentration von 250 µg pro Gel eingesetzt. Die IEF erstreckt sich über einen pH-Bereich von 3 – 10. Die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgte über ein 15%iges SDS-Gel, welches im Anschluss daran mit Coomassie gefärbt wurde.

Neben dem für die Analyse benötigten Coomassie-Gel wurden 12 weitere Gele angefertigt und mittels *Western blotting* auf PVDF-Membranen übertragen. In Doppelansätzen wurde jede *Blot*-Membran mit dem Serum eines OMS-Patienten inkubiert. Für die Kontrollseren wurde nur eine Membran mit dem entsprechenden Serum inkubiert. Insgesamt wurden für die 2D-Analyse Seren von 4 OMS⁺/NB⁺-Patienten (Patienten 1, 4, 14 und 15, siehe Anhang Tabelle I) und 4 Kontrollen (Seren 15, 16, 19 und 21, siehe Anhang Tabelle II) verwendet. Die für jeden OMS-Patienten in Doppelansätzen hergestellten *Blots* wurden verglichen und nur Proteinspots, welche auf beiden Filmen sichtbar waren, wurden als potentielle Antigene angesehen.

In Abb. 6 ist exemplarisch die *Western-Blot* Analyse für Patient 4 dargestellt. Aus Kleinhirngewebe konnten viele potentielle Antigene von unterschiedlichem Molekulargewicht und in verschiedenen pH-Bereichen detektiert werden (Abb. 6, siehe Anhang Tabelle V).

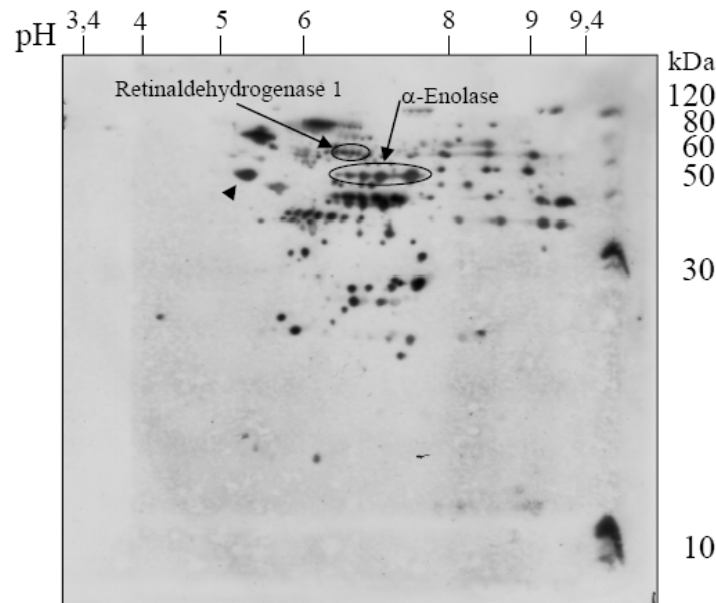


Abb. 6: 2D-Western Blot Analyse für die Identifizierung neuer Autoantigene

Für die Gele und daraus resultierenden *Blots* wurde Proteinextrakt aus humanem Kleinhirn in einer Konzentration von 250 µg/Gel verwendet. Die IEF erstreckte sich über einen pH-Gradienten von 3-10. Im Folgenden wurden die Proteine über ein 15%iges SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Detektion positiver Proteinspots erfolgte mit Serum von Patient 4. Retinaldehydhydrogenase 1 (RALDH1) und α-Enolase wurden als neue Autoantigene identifiziert.

Für eine genaue Analyse möglicher Autoantigene wurden ausgehend von diesem *Western Blot* (Abb. 6) 90 positive Proteinspots aus dem entsprechenden Coomassie-Gel ausgeschnitten und per MALDI-TOF-MS analysiert. Über eine Datenbanksuche konnte 78 Spots ein Protein zugeordnet werden (siehe Anhang Tabelle V).

Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe dieser Proteinliste alle *Western Blots*, inkubiert mit OMS-Seren und Kontrollen, mit den entsprechenden Spots auf dem Coomassie-Gel verglichen. Tabelle V (siehe Anhang) zeigt eine Übersicht über die identifizierten Proteine der *Western Blot* Analysen mit den vier getesteten OMS-Patienten. Positive Signale auf dem Film wurden für das entsprechende Protein mit einem + gekennzeichnet. Hatte der Patient keine Antikörper gegen ein Protein, war kein Signal auf dem Film sichtbar, was in der Tabelle durch ein – gekennzeichnet wurde. Die Auswertung ergab, dass die meisten identifizierten Proteine nur von einem oder zwei Patienten erkannt wurden und aus diesem Grund nicht als mögliche gemeinsame Autoantigene im OMS angesehen wurden. Darüber hinaus konnte jedoch das, wie bereits unter Verwendung von Proteinextrakt aus Neuroblastomzellen identifizierte, Autoantigen α-Enolase auch in Proteinextrakt aus Kleinhirngewebe nachgewiesen werden. Das Protein α-Enolase

wurde durch 3/4 OMS-Patienten erkannt (siehe Anhang Tabelle V, Protein Nr. 24-27). Auffällig war auch das zweite Protein Retinaldehydrogenase 1 (siehe Anhang Tabelle V, Protein Nr. 21-23) im Bereich von 57 kDa, welches sogar von allen 4 getesteten OMS-Patienten erkannt und als neues potentiell Autoantigen identifiziert werden konnte.

Als Kontrolle wurden 4 2D-*Blot*-Membranen mit Serum gesunder Probanden inkubiert. In Abb. 7 ist einer der vier *Blots*, inkubiert mit Serum 25, exemplarisch dargestellt. Auf dem Film sind keine positiven Spots im Bereich der Proteine Retinaldehydrogenase und α -Enolase sichtbar. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch bei den anderen *Blots*, inkubiert mit den Kontrollseren 23,17 und 18 (Abbildungen nicht gezeigt).

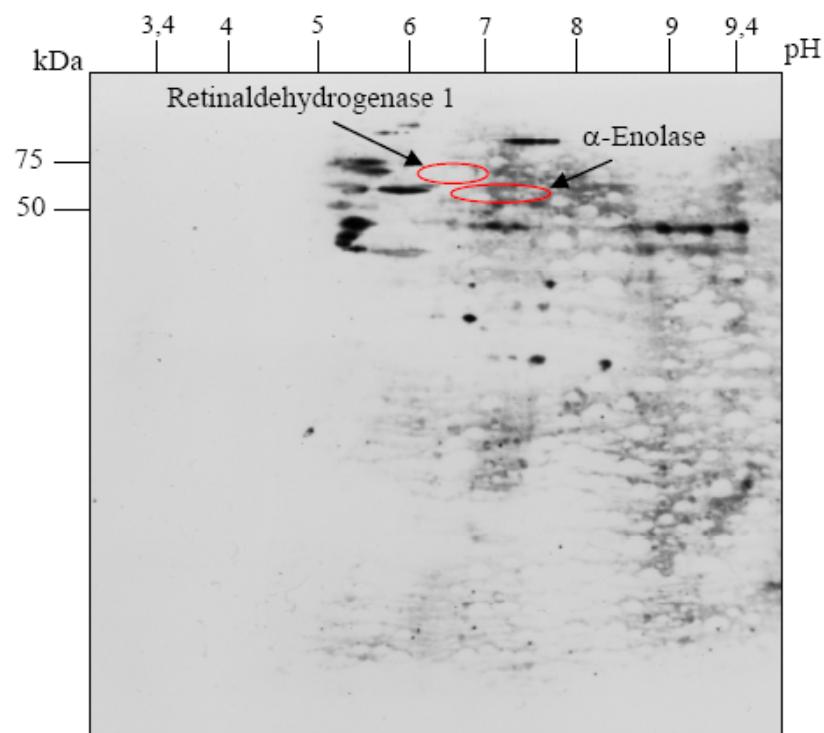


Abb. 7: 2D-Western Blot mit Proteinextrakt aus humanem Kleinhirn, inkubiert mit Kontrollserum 25. Für die Gele und anschließenden 2D-Western Blots wurde Proteinextrakt aus humanem Kleinhirn mit 250 μ g Protein/Gel verwendet. Die IEF erfolgte über einen pH-Gradienten von 3 – 10. Im Anschluss daran wurden die Proteine über ein 15%iges SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte unter Verwendung von Kontrollserum Nr.25. Das Kontrollserum wies keine Antikörper gegen die identifizierten potentiellen Autoantigene α -Enolase und Retinaldehydrogenase 1 auf.

Für eine bessere statistische Aussage über die Verteilung dieser Autoantigene im OMS wurden mehr als die bereits getesteten OMS-Seren auf das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen diese Proteine untersucht.

4.2 α -Enolase als Autoantigen im OMS

Über die Proteom-Analyse, unter Verwendung von Proteinextrakt aus Neuroblastom-Zellen, konnte α -Enolase als mögliches Autoantigen im OMS identifiziert werden. Dieses Ergebnis bestätigte sich in einer zweiten 2D-Analyse mit Proteinextrakt aus humanem Kleinhirn. Eine Analyse weiterer Patientenproben wurde auf 1D-Ebene durchgeführt.

4.2.1 *Line Blots* für die Identifizierung α -Enolase positiver OMS-Seren

Für eine Analyse weiterer Seren wurden mit dem rekombinanten Protein α -Enolase (abnova) *Line Blots* hergestellt. Das Protein wurde mit einer Konzentration von 0,5 μ g/Spur über ein 10%iges SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels *Western blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Im nächsten Schritt wurde die Membran in Streifen geschnitten und diese in ein mehrkammriges Reaktionsgefäß überführt. Jeder Streifen konnte so mit dem Serum eines Patienten inkubiert werden. Als Positivkontrolle wurde bei jedem Blot ein Streifen mit dem *Non Neuronal Enolase*-Antikörper (*rabbit polyclonal*, abcam) inkubiert. Danach wurden überschüssige Serumreste in mehreren Waschschritten mit TBS-T entfernt. Als *Sekundär*-Antikörper wurde anti-human IgG/HRP (1:5.000) verwendet.

Insgesamt wurden so 15 OMS⁺/NB⁺-Seren und 16 OMS⁺/NB⁻-Seren getestet. Seren gesunder Probanden (insgesamt 16) und von Patienten mit einem Neuroblastom (NB) ohne OMS (insgesamt 13) dienten dabei als Kontrollgruppen. Die Analyse ergab, dass 7/31 (22,6%) OMS-Seren, aber nur 1/13 (7,7%) NB-Patienten ohne OMS und keines der Seren gesunder Probanden Autoantikörper gegen α -Enolase hatten ($p < 0,05$, Abb. 8).

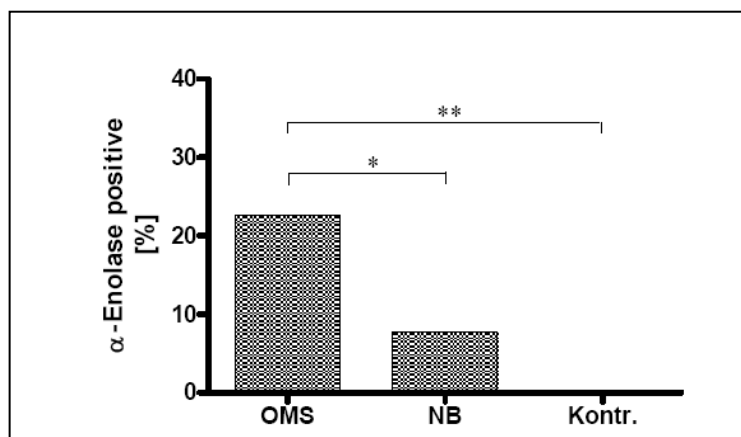


Abb. 8: Line Blots für die Analyse α -Enolase positiver OMS-Seren

Das rekombinante Protein α -Enolase (abnova) wurde mit 0,5 μ g Protein/Spur geladen. Jeder *Blot*-Streifen wurde mit einem Serum inkubiert. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen wies eine signifikant hohe Anzahl an OMS-Patienten Autoantikörper gegen α -Enolase auf ($p < 0,05$).

4.2.2 Line Blots für die Identifizierung γ -Enolase positiver OMS Seren

Ob es sich bei den identifizierten Antikörpern um spezifisch gegen das Protein α -Enolase gerichtete Autoantikörper handelt, wurde in einem weiteren Versuch mit *Line Blots* untersucht. Für die *Blots* wurde das rekombinante Protein γ -Enolase (Calbiochem) verwendet. γ -Enolase kann als neuronal-spezifische Form des Enzyms nur in Neuronen und Zellen neuronalem Ursprungs detektiert werden.

Wie bereits für α -Enolase beschrieben, wurde das Protein in einer Konzentration von 0,5 μ g/Spur auf ein 10%iges SDS-Gel geladen und danach mittels Transfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Jeder aus den Membranen hergestellte Streifen wurde mit einem Serum inkubiert. Insgesamt wurden 19 OMS-Patienten, 13 NB-Patienten und 13 Gesund-Kontrollen getestet. Dabei waren 16 der getesteten Seren von OMS+/NB+-Patienten und wurden auch für die Untersuchung mit α -Enolase verwendet (siehe Anhang Tabelle I). Als Positivkontrolle wurde bei jedem Blot ein Streifen mit dem anti-Enolase-Antikörper inkubiert (*rabbit polyclonal* Santa Cruz).

Weder die getesteten OMS-Seren (0/19) noch die NB-Seren (0/13) enthielten Antikörper gegen γ -Enolase (Abb. 9). Mit Ausnahme eines Serums waren auch alle Gesund-Kontrollen negativ (1/13, 7,7%).

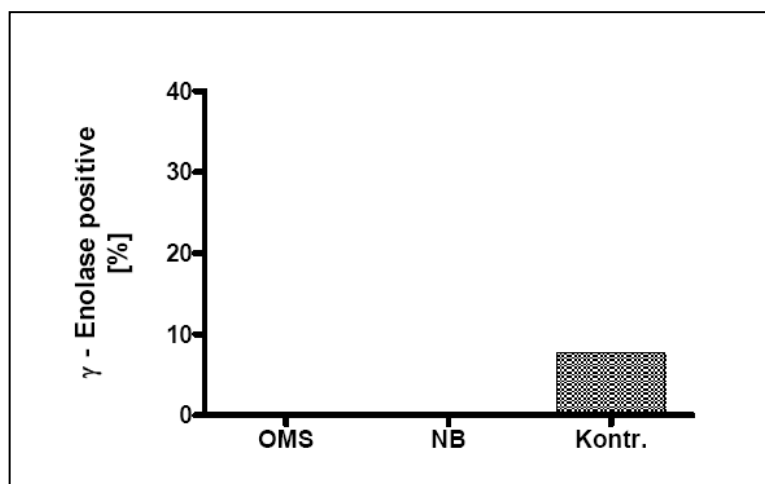


Abb. 9: Line Blots zur Identifizierung γ -Enolase positiver OMS-Seren

Es wurden 0,5 μg Protein/Spur verwendet. Jeder *Blot*-Streifen wurde mit dem Serum eines Patienten/ einer Gesund-Kontrolle inkubiert. Bei 0/19 OMS-Seren, 0/13 NB-Seren und 12/13 Kontrollseren konnte kein positives Signal im *Western Blot* beobachtet werden ($p > 0,05$).

4.2.3 α -Enolase als RNA-bindendes Protein

Die meisten in Verbindung mit einem paraneoplastischen OMS beschriebenen Autoantigene, wie das Hu Protein oder NOVA 1/2, sind RNA-bindende Proteine. Aus diesem Grund wurde für das Protein α -Enolase eine mögliche Funktion als RNA-bindendes Protein untersucht.

Zu diesem Zweck wurden in Vorversuchen über einen *North-Western Blot* Proteine aus Neuroblastomzellen auf eine mögliche RNA-Bindung hin untersucht. Dafür wurde ein 2D-*Western Blot* mit 3 μg $\gamma^{32}\text{P}$ -markierter RNA inkubiert (M. Korfei, Abbildung nicht gezeigt). Neben dem bekannten RNA-bindenden Protein HuD konnte so auch α -Enolase als RNA-bindendes Protein identifiziert werden. Eine mögliche Abhängigkeit der RNA-Bindung von der Proteinkonzentration wurde mittels der *Dot Blot* Technik weiter untersucht. Dazu wurden beide Proteine, α - und γ -Enolase, sowie BSA als Negativkontrolle unter nativen Bedingungen in verschiedenen Konzentrationen auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet. Im Anschluss daran wurde die Membran mit 3 μg biotinylierter RNA inkubiert.

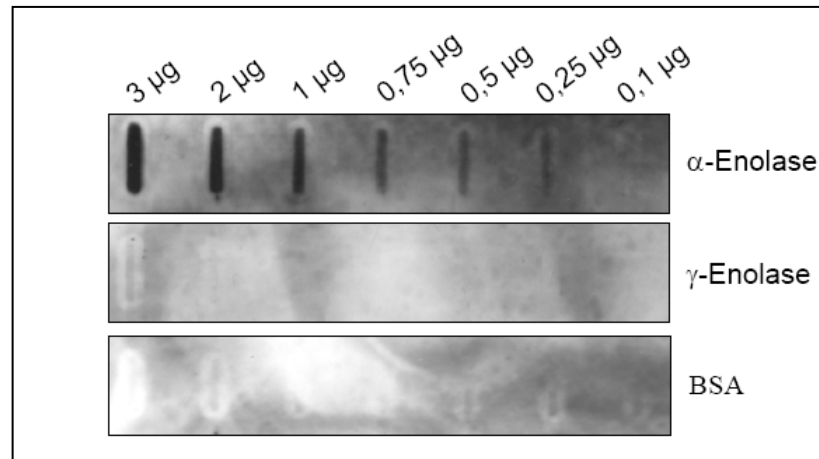


Abb. 10: Dot Blot Analyse zur Untersuchung der RNA-Bindung von α -Enolase

Mit abnehmender Proteinkonzentration beginnend bei $3\mu\text{g}$ wurden α -Enolase, γ -Enolase und BSA (Negativkontrolle) auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet. Die Membran wurde mit $3\mu\text{g}$ biotinylierter RNA inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem *Sekundär*-Antikörper Streptavidin/HRP. Nur für α -Enolase ist eine RNA-Bindung zu beobachten.

Das Protein α -Enolase bindet RNA mit abnehmender Proteinkonzentration bis zu einer Konzentration von $0,25\mu\text{g}$ (Abb. 10). Diese Bindung konnte für γ -Enolase nicht beobachtet werden. Für die Negativkontrolle BSA zeigte sich erwartungsgemäß kein Signal. Das Ergebnis der *Dot Blot* Analyse bestätigt somit das Ergebnis des *North-Western Blots* und zeigt, dass α -Enolase RNA binden kann.

4.2.4 Einfluss von RNA oder Plasminogen auf die Bindung von Autoantikörpern an α -Enolase

Etwa $1/4$ der OMS-Seren haben Autoantikörper gegen α -Enolase. Um weiterführend zu untersuchen, ob die Bindung von RNA an α -Enolase die Bindung von Autoantikörpern an das Enzym beeinflusst, wurde ein ELISA-Test mit dem rekombinanten Protein α -Enolase durchgeführt.

Die ELISA-Platte (MaxiSorp, Nunc) wurde zu diesem Zweck mit Enolase in einer Konzentration von $0,5\mu\text{g}$ Protein/well beschichtet. Zu einem Teil des Proteinextraktes wurde isolierte Gesamt-RNA gegeben. Die optimale RNA-Konzentration von $5\mu\text{g/ml}$ wurde dabei in Vorversuchen ermittelt (M. Wygreczka). BSA diente als Negativkontrolle. Pro Patient und Protein wurden Dreifachansätze durchgeführt.

Serumproben von 8 OMS-Patienten wurden in einer Verdünnung von 1:200 auf ihre Bindung an Enolase und Enolase+RNA untersucht.

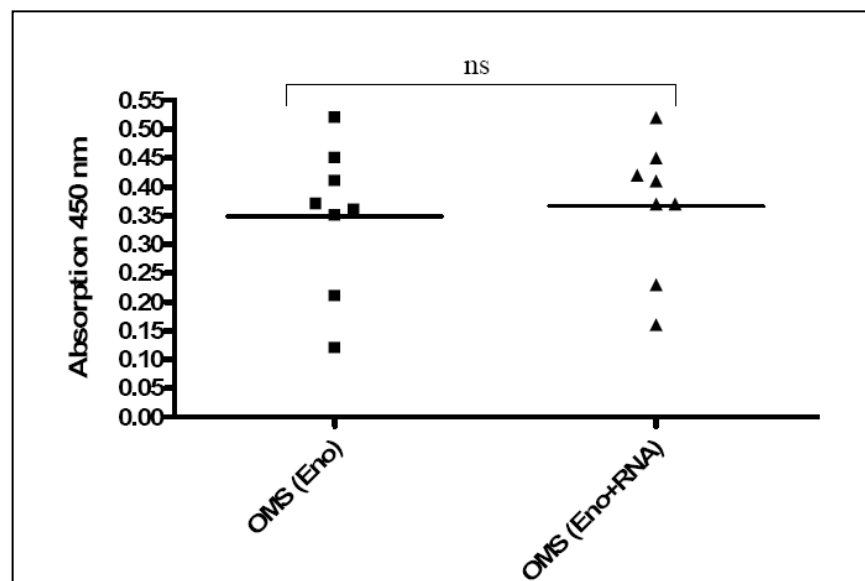


Abb. 11: ELISA-Test zur Untersuchung der Antikörper-Bindung an α -Enolase in Gegenwart von RNA. ELISA-Platten wurden mit dem rekombinanten Protein α -Enolase (0,5 $\mu\text{g}/\text{well}$) beschichtet. RNA wurde in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. BSA wurde als Negativkontrolle verwendet (nicht gezeigt). Die Detektion einer Bindung an α -Enolase (OMS (Eno)) und Enolase+RNA (OMS (Eno+RNA)) erfolgte unter Verwendung von OMS-Seren (1:200 verdünnt) und mit dem *Sekundär*-Antikörper anti-human/HRP bei einer Absorption von 450 nm.

Patienten mit Autoantikörpern gegen α -Enolase wurden auch im ELISA positiv getestet (siehe Anhang, Tabelle I). Zwei α -Enolase negative Seren waren auch im ELISA negativ. Auf Grund zu geringer Serummengen konnten nur 6 der 7 α -Enolase-positiven OMS-Seren getestet werden. Ein Vergleich der Antikörperbindung an α -Enolase (OMS (Eno)) und α -Enolase mit RNA (OMS (Eno+RNA)) macht deutlich, dass eine RNA-Bindung an das Protein keinen Einfluss auf die Bindung der Autoantikörper an α -Enolase hat (Abb. 11). Für alle Seren wurden unter beiden Bedingungen ähnliche Werte bei 450 nm gemessen.

Neben der Funktion als zytoplasmatisches Protein wird α -Enolase auch auf der Oberfläche verschiedener Zellen exprimiert (Miles et al. 1991; Dudani et al. 1993; Pancholi 2001). In dieser Funktion kann α -Enolase auf neuronalen Zellen Plasminogen binden (Nakajima et al. 1993; Nakajima et al. 1994). Wie für den Fall der RNA-Bindung besteht auch bei einer Bindung von Plasminogen an Enolase ein möglicher

Einfluss auf die Autoantikörperbindung an das Protein. Enolase könnte beispielsweise in Kombination mit Plasminogen ein stärkeres Antigen darstellen als Enolase allein.

Für die Untersuchung wurde ein ELISA-Test unter den bereits beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Das Protein α -Enolase wurde in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/well}$ verwendet. Plasminogen wurde in einer Konzentration von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ zum Protein α -Enolase oder direkt auf die Platte gegeben. Die optimale Plasminogen-Konzentration konnte wie für RNA in Vorversuchen ermittelt werden (M. Wygreczka). Für die Untersuchung wurde für jeden Patient die Platte in Triplets mit Enolase, Enolase/Plasminogen und Plasminogen beschichtet. Der ELISA wurde mit isolierten IgG-Fractionen statt Serum durchgeführt. Die Konzentration der IgGs betrug dabei 100 $\mu\text{g/ml}$. Insgesamt wurden IgG-Fractionen von 10 OMS-Patienten verwendet, wovon 7 Patienten OMS assoziiert mit einem NB aufwiesen (OMS^+/NB^+). Die IgG-Fractionen 8 gesunder Probanden dienten als Kontrolle. Abb. 12 zeigt eine graphische Darstellung der gemessenen Werte bei einer Absorption von 450 nm.

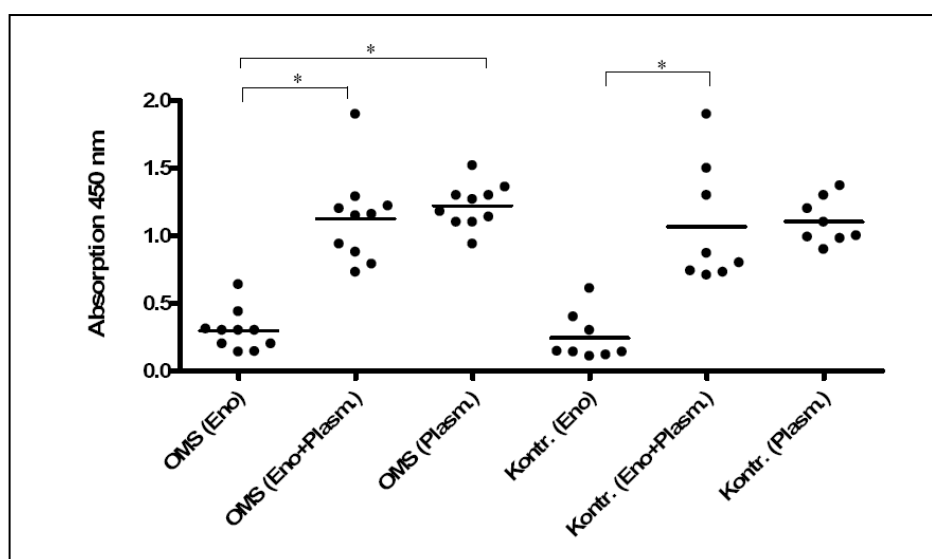


Abb. 12: ELISA-Test für die Untersuchung der Antikörper-Bindung an α -Enolase unter dem Einfluss von Plasminogen. ELISA-Platten wurde mit dem rekombinanten Protein α -Enolase (Eno, 2 $\mu\text{g/ml}$), α -Enolase und Plasminogen (Eno+Plasm.) sowie Plasminogen (Plasm., 1,5 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet. IgG-Fractionen von OMS-Patienten (OMS) und gesunden Probanden (Kontr.) wurden in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Es zeigte sich kein Unterschied in der Bindung von OMS-Autoantikörpern und Antikörpern der Kontrollgruppe an Enolase bzw. den Komplex ($p > 0,05$). Für beide Gruppen ist aber ein signifikanter Unterschied zwischen der Bindung an Enolase und den Komplex zu beobachten ($p < 0,01$).

Im Ergebnis zeigte sich kein Unterschied in der Bindung von OMS-Autoantikörpern und Antikörpern der Kontrollgruppe an Enolase, Plasminogen bzw. den Komplex ($p > 0,05$, Abb. 12). In einem Vergleich der Antikörperbindung konnte aber für beide Gruppen (OMS-IgGs und Kontroll-IgGs) eine stärkere Bindung an den Komplex aus Enolase und Plasminogen sowie Plasminogen allein beobachtet werden, im Vergleich zu Enolase allein ($p < 0,01$, Abb. 12).

4.2.5 Expression von α -Enolase auf der Oberfläche von Neuroblastom-Zellen

α -Enolase ist ubiquitär im Körper vorhanden und als zytoplasmatisches Protein Teil der Glykolyse. Neben dieser enzymatischen Funktion wird Enolase auch auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen, wie Monozyten, neuronalen Zellen und Tumorzellen, exprimiert. Autoantikörper in OMS-Seren zeigen eine Bindung an Oberflächenstrukturen von Neuroblastomzellen (Blaes et al. 2005; Korfei et al. 2005).

Da Autoantikörper in OMS-Seren eine Bindung an α -Enolase zeigen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Expression von α -Enolase auf der Oberfläche der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

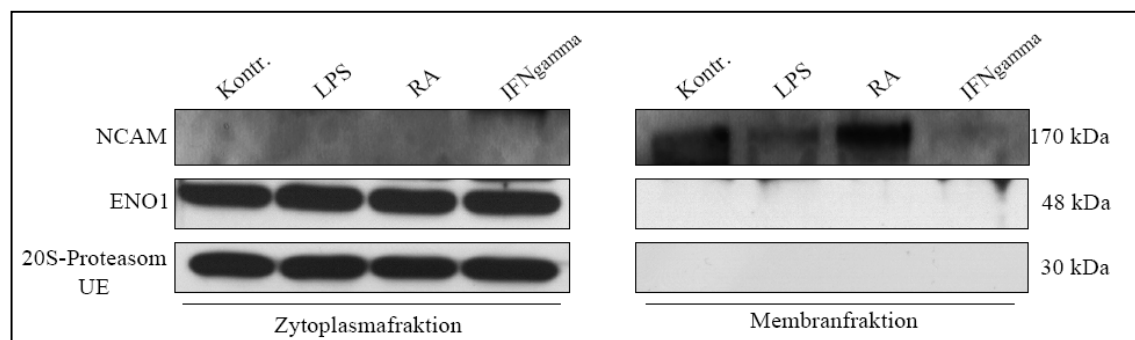


Abb. 13: Western Blot Analyse der Expression von Enolase auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen. Die Zellen (SH-SY5Y) wurden vor der Isolierung des Proteinextraktes mit LPS, IFNgamma und RA behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Kontr.). Für die Analyse wurden 100 μ g Gesamtprotein in Membran- und Zytoplasmafraktion getrennt. Die an Beads gebundenen Membranproteine wurden in 30 μ l 1 x SDS-Auftragspuffer aufgenommen und mit 15 μ l pro Spur und Probe pipettiert. Für den zytoplasmatischen Teil wurden 5 μ l Proteinextrakt pro Spur verwendet. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern gegen Eno1, NCAM und die 20S-Proteasom Unter-einheit (UE).

Dazu wurden die Zellen in Kulturschalen (\varnothing 10 cm) kultiviert und für 24 h mit Retinolsäure (RA, 10 μ M), Lipopolysaccharid (LPS, 50 ng/ml) und Interferon γ (INF γ , 100 ng/ml) inkubiert. Für eine Untersuchung der Oberflächenexpression wurden Membran- und Zytoplasma-Proteine getrennt. Die Isolierung des Gesamtproteinextraktes und die Trennung der Proteinfractionen erfolgte nach dem in Punkt 3.7.1.2 angegebenen Protokoll, unter Verwendung von Biotin. Die Trennung der Proteinfractionen wurde mit 100 μ g Gesamtprotein durchgeführt.

Die nach der Isolierung an die *Beads* gebundenen Membranproteine wurden nach der Trennung von der zytoplasmatischen Proteinfraction mittels SDS *Page* aufgetrennt. Die *Beads* wurden dafür in 30 μ l 1 x SDS Auftragspuffer resuspendiert, gekocht und mit 15 μ l pro Probe geladen. Von der zytoplasmatischen Proteinfraction wurden 5 μ l eingesetzt.

Die *Western Blot* Analyse erfolgte mit verschiedenen *primären* Antikörpern. Eine Oberflächenexpression wurde mit dem für α -Enolase spezifischen Antikörper (abcam) durchgeführt. Als Kontrolle für eine reine Membranfraction, ohne eine Kontamination durch Zytoplasma-Proteine, wurde ein Antikörper gegen das Protein NCAM (CD56, Ancell) verwendet. NCAM, auch *Neural cell adhesion molecule*, ist ein in Neuronen vorkommendes Adhäsionsmolekül. Für den zytoplasmatischen Teil wurde ein Antikörper gegen die 20S-Proteasomuntereinheit (Millipore) verwendet. Zwischen den Inkubationen mit den Antikörpern wurde die Membran gestrippt (siehe Punkt 3.6.4.6).

Die *Western Blot* Analyse, getrennt in Zytoplasmafraction und Membranfraction, unter Verwendung der beiden Kontroll-Antikörper NCAM und 20S Proteasom UE zeigte, dass eine saubere Trennung beider Proteinfractionen vorlag (Abb. 13). NCAM konnte nur in der Membranfraction nachgewiesen werden, im Vergleich zur 20S-Proteasom UE, welche nur in der Zytoplasmafraction der Neuroblastomzellen detektiert wurde. Die Expression von α -Enolase wurde im Zytoplasma beobachtet. Auf der Zelloberfläche, in der Membranfraction, konnte Enolase unter inflammatorischen Bedingungen (LPS, INF γ) und Differenzierungsbedingungen (RA) sowie bei unbehandelten Zellen nicht nachgewiesen werden.

Eine Änderung im Expressionsmuster der einzelnen Proteine unter den verschiedenen Behandlungen zeigte sich nicht. Enolase und die 20S Proteasom UE wurden in gleichen Konzentrationen im Zytoplasma exprimiert. Auffällig war, dass NCAM unter inflammatorischen Bedingungen geringer auf der Zelloberfläche vorhanden ist, als bei unbehandelten und RA-behandelten Zellen.

4.2.6 Nachweis einer Kreuzreaktion von OMS-Seren mit bakterieller Enolase

Autoantikörper in OMS-Patienten wurden in Zusammenhang mit einer Streptokokkeninfektion beschrieben (Candler et al. 2006). Diese Antikörper weisen eine Kreuzreaktivität gegen ein humanes Protein auf, welches auch auf der Oberfläche von Streptokokken vorkommt (Molekulares Mimikry). Antikörper gegen das glykolytische Protein α -Enolase wurden auch in Verbindung mit einer poststreptokokkalen Autoimmunkrankheit beschrieben (Dale 2005). Daher wurden Seren von 5 OMS-Patienten und 4 Kontrollen auf Antikörper gegen in Streptokokken vorkommende Enolase getestet, um den möglicherweise ähnlichen Effekt einer Kreuzreaktion auch für die OMS-Antikörper nachzuweisen. Der Versuch wurde in einer Kooperation mit S. Hammerschmidt und S. Bergmann (Universität von Würzburg) durchgeführt.

Für den Versuch wurde das rekombinante Protein α -Enolase von *Streptococcus pneumoniae* in zwei Konzentrationen (5 bzw. 0,5 μ g) auf eine Nitrozellulosemembran gespottet. Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mit den einzelnen Seren inkubiert, als Positivkontrolle wurde Enolase-Antiserum verwendet, eine Detektion ohne Serum aber mit dem *Sekundär*-Antikörper diente als Negativkontrolle.

Unter Verwendung von 5 μ g Protein konnten Antikörper gegen bakterielle Enolase in 4/5 OMS-Seren (OMS+/NB+) nachgewiesen werden, aber auch für 3/4 getesteten Seren gesunder Probanden wurde ein positives Signal beobachtet (Abb. 14). Bei 0,5 μ g Protein reagierte, mit Ausnahme von einem Serum, kein Serum positiv (Abb. 14).

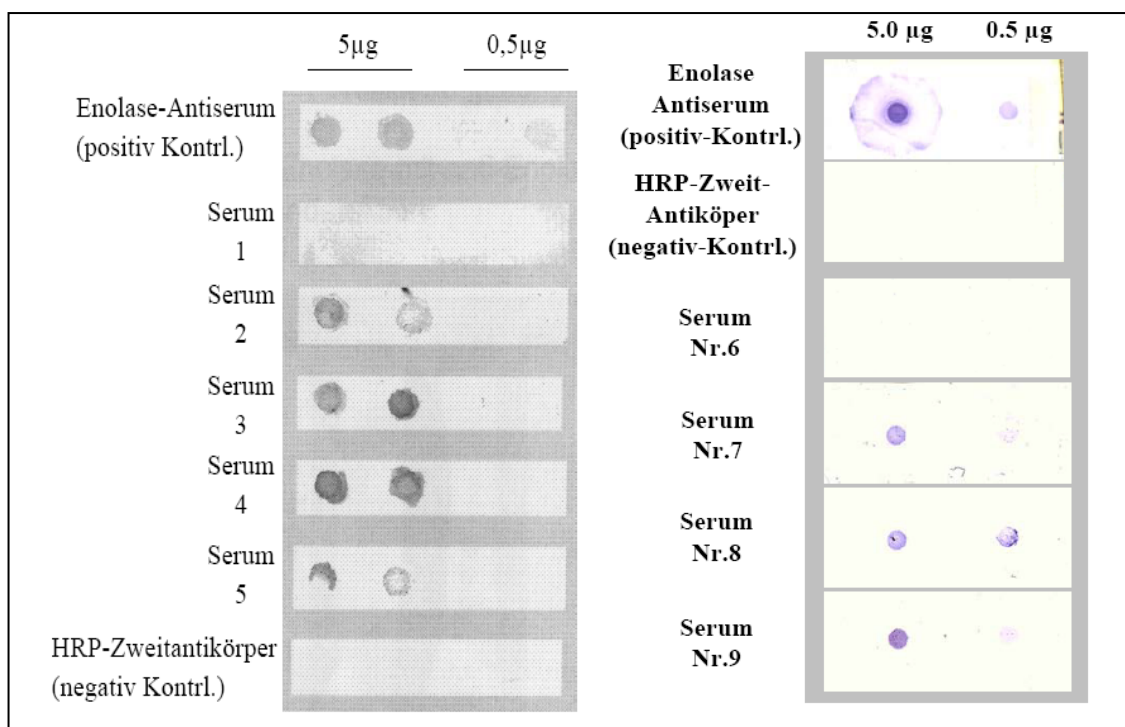


Abb. 14: Dot Blot Analyse zur Identifizierung von Antikörpern gegen bakt. Enolase. Das rekombinante Protein α -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae* wurden unter nativen Bedingungen in zwei Konzentrationen (5 bzw. 0,5 μ g) auf eine Nitrozellulosemembran gespottet. Die Membranstreifen wurden mit den einzelnen Seren inkubiert. Bei Serum 1 - 5 handelt es sich um OMS-Patienten. Die Seren 6 – 9 stammen von gesunden Probanden. Als Positivkontrolle wurde Enolase-Antiserum verwendet, Negativkontrolle war der *Sekundär*-Antikörper/HRP.

Neben der Untersuchung einer Kreuzreaktion mit dem nativen Protein wurde auch eine *Western Blot* Analyse unter denaturierten Bedingungen durchgeführt. Über ein SDS-Gel wurden der Proteinextrakt, isoliert aus *Streptococcus pneumoniae*, sowie das rekombinante Protein α -Enolase elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die entstandenen Membranstreifen einzeln mit den Seren inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Enolase-Antiserum verwendet.

Die in Abb. 15 dargestellte *Western Blot* Analyse wurde mit den Seren 6 - 9 der Kontrollgruppe durchgeführt. Darin enthaltene Antikörper reagierten mit einer Vielzahl an Proteinen des Extraktes aus *Streptococcus pneumoniae*. Im Vergleich dazu wurde keine Reaktion der Antikörper mit dem rekombinanten Protein α -Enolase unter denaturierten Bedingungen nachgewiesen.

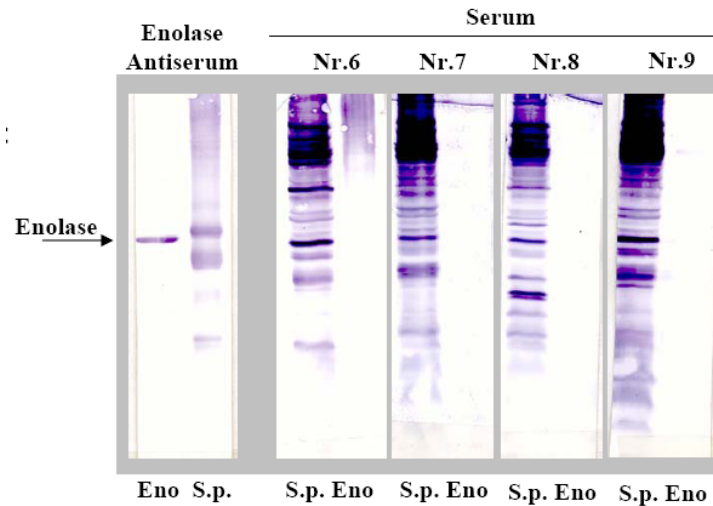


Abb. 15: Western Blot Analyse zur Identifizierung von Antikörpern gegen bakterielle Enolase. Das rekombinante Protein α -Enolase (Eno) sowie der Proteinextrakt aus *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) wurden für das Gel verwendet. Die Blot-Streifen wurden mit den Seren 6 – 9 der Kontrollgruppe inkubiert. Positivkontrolle war Enolase-Antiserum.

Diese *Western Blot* Analyse wurde auch unter Verwendung der Seren 1 - 5 von OMS-Patienten durchgeführt (Abbildung nicht gezeigt). Ebenso wie gesunde Probanden, erkannten Antikörper in OMS-Seren mehrere Proteine aus *Streptococcus pneumoniae*, nicht aber spezifisch das rekombinante Proteine α -Enolase.

Im Gegensatz zur Bindungsanalyse unter nativen Bedingungen war unter denaturierten Bedingungen keine Reaktion der Seren mit dem bakteriellen Enzym zu beobachten.

4.2.7 LDH-assay mit IgG-Fraktionen α -Enolase positiver OMS-Seren

Untersuchungen der IgG-Fraktionen aus OMS⁺/NB⁺- und OMS⁺/NB⁻-Seren haben ergeben, dass diese die Zellproliferation hemmen und Apoptose in neuronalen Tumorzellen induzieren (Korfei et al. 2005). Basierend auf diesen bereits bekannten Funktionen isolierter IgG-Fraktionen von OMS-Patienten sollte in diesem Versuch untersucht werden, ob IgG-Fraktionen aus α -Enolase-positiven Seren zytotoxisch auf Neuroblastomzellen wirken.

Für den Versuch wurde die Neuroblastom-Zelllinie SH-SY5Y verwendet und mit 4.000 Zellen pro well in einer 96-well Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 200 μ l eines 0,5%igen FCS-Mediums ersetzt. Die Zellen

wurden mit isolierten IgG-Fraktionen (10 µg/200 µl, Abb. 16) und als Kontrollen (in Abb. 16 nicht gezeigt) mit OMS-Serum (1:100 verdünnt) und den Überständen der IgG-Isolierungen (60 µg/200 µl) inkubiert.

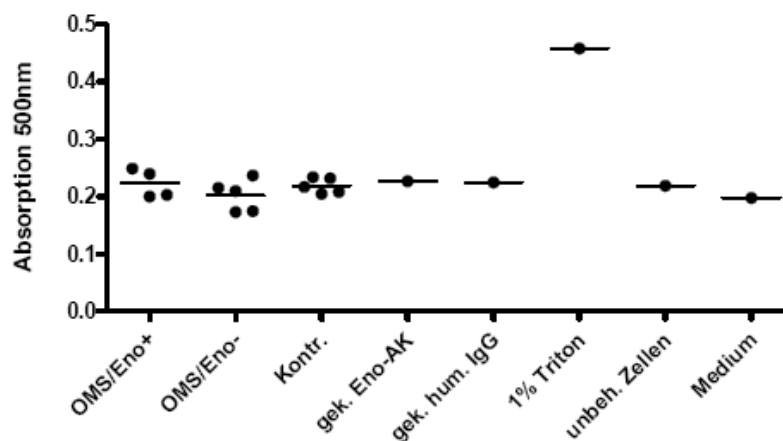


Abb. 16: LDH-assay für die Untersuchung funktioneller Effekte von IgG-Fraktionen α -Enolase positiver OMS-Seren. SH-SY5Y Zellen wurden für 48 h mit IgG-Fraktionen (10 µg/200 µl), isoliert aus OMS-Seren (OMS) und gesunden Kontrollseren (Kontr.), inkubiert. Von 9 für die IgG-Isolierung verwendeten OMS-Seren waren 4 α -Enolase positiv (OMS/Eno+) und 5 Seren negativ (OMS/Eno-). Als zusätzliche Kontrollen wurden zum Einen der *Non neuronal enolase* Antikörper (gek. Eno-AK) und ein IgG-Standard (gek. hum. IgG) eingesetzt. Auf der anderen Seite dienten unbehandelte Zellen (unbeh. Zellen) und Medium ohne Zellen als Negativkontrollen. Als Positivkontrolle diente eine 1%ige Triton-Lösung (1% Triton).

Insgesamt wurden für den Versuch IgG-Fraktionen aus 9 OMS-Seren verwendet, wovon 4 Patienten Autoantikörper gegen α -Enolase aufwiesen. Als Negativkontrolle wurden Seren von 5 gesunden Probanden verwendet. Der spezifisch gegen die humane α -Enolase (*Non neuronal Enolase*, abcam) gerichtete Antikörper sowie ein IgG-Standard (sigma) dienten als zusätzliche Kontrollen. Eine 1%ige Triton-Lösung wurde als Positivkontrolle, unbehandelte Zellen und Medium ohne Zellen hingegen als Negativkontrolle, eingesetzt (Abb. 16).

Die Zytotoxizität der verwendeten Proben wurde über die Freisetzung des zytoplasmatischen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) gemessen (Abb. 16). Ein Vergleich der Gruppen, inkubiert mit verschiedenen IgG-Fraktionen, zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Zytotoxizität ($p > 0,05$). Weder IgGs Enolase-positive OMS-Seren noch Enolase-negative Seren und Kontrollen hatten einen zytotoxischen Effekt

auf die Zellen. Die Werte der Absorptionsmessung bei 500 nm bewegten sich in einem Bereich, der auch für unbehandelte Zellen gemessen wurde (Abb. 16).

4.3 RALDH1 als Autoantigen im OMS

In der 2D-Western Blot Analyse wurde neben α -Enolase ein weiteres Autoantigen im OMS identifiziert, Retinaldehydrogenase 1 (RALDH1, siehe Punkt 4.1.2). Das Protein wurde durch 4/4 OMS-Patienten, getestet auf 2D-Ebene, erkannt. Für die Untersuchung weitere Patientenproben wurden *Line Blots* mit dem rekombinanten Protein hergestellt.

4.3.1 Herstellung des rekombinanten Proteins RALDH1

4.3.1.1 Klonierung des Plasmids pNKH1-*ALDH1A1*

Das Protein Retinaldehydrogenase 1 (RALDH1) wird durch das Gen *ALDH1A1* kodiert. Unter Verwendung der genspezifischen Primer *ALDH1A1-EcoRI* (sense) und *ALDH1A1-HindIII* (antisense) wurde das Fragment *ALDH1A1* mittels PCR erfolgreich amplifiziert. Für die PCR wurde in cDNA umgeschriebene RNA, isoliert aus Fibroblasten, eingesetzt. Durch die verwendeten Primer erhielt die Sequenz eine *EcoRI*-Erkennungssequenz am 5'-Ende und eine *HindIII*-Erkennungssequenz am 3'-Ende. Das amplifizierte Fragment wurde gereinigt und über eine Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut.

Der für die Klonierung gewählte Vektor pBAD/D-TOPO[®] (siehe Abb. 17) der Firma Invitrogen ermöglicht die Expression eines rekombinanten Proteins fusioniert mit einem C-terminalen *His-tag* (Abb. 17). Für die Klonierung des Fragmentes *ALDH1A1* wurde der Vektor modifiziert und durch eine *Multiple cloning site* (MCS) erweitert. Der Vektor erhielt die neue Bezeichnung pNKH1 und hat eine Größe von 4093 bp. Durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* wurde der Vektor linearisiert und so geöffnet. Die Ligation des Fragmentes *ALDH1A1* in den Vektor pNKH1 fand über Nacht bei 17°C statt.

Das daraus resultierende Plasmid pNKH1/*ALDH1A1* wurde mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* Top10-Zellen eingebracht. Für die Selektion positiver Transformanden wurden die Zellen nach einer kurzen Regenerationszeit auf einer LB/Kan-

Platte ausgestrichen. Die am folgenden Tag auf der Transformationsplatte gewachsenen Klone wurden über einen PCR-Schnelltest getestet.

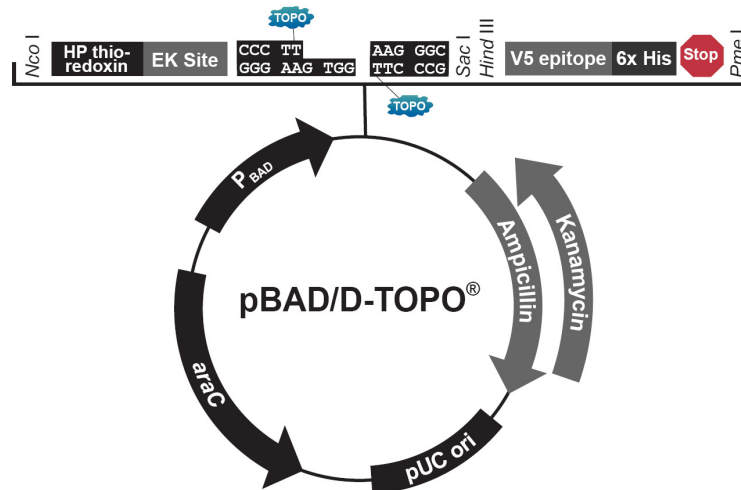


Abb. 17: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pBAD/D-TOPO

Der Vektor pBAD/D-TOPO (Invitrogen) wurde mit den Enzymen *NcoI* und *HindIII* geöffnet und zwischen diesen beiden Schnittstellen um eine MCS erweitert. Danach erhielt der Vektor die neue Bezeichnung pNKH1 und hatte eine Größe von 4093 bp.

Unter Verwendung der genspezifischen Primer *ALDH1A1-EcoRI* und *ALDH1A1-HindIII* zeigte sich, ob und welche Klone das gewünschte *insert ALDH1A1* enthielten. Insgesamt wurden so 92 Klone überprüft. Durch eine folgende Analyse der PCR auf einem 1%igen Agarosegel konnten 5 positive Klone mit dem gewünschten Fragment von 1505 bp identifiziert werden. Abb. 18 zeigt exemplarisch die Agarosegele mit den positiven Klonen Nr. 20, 36 und 45.

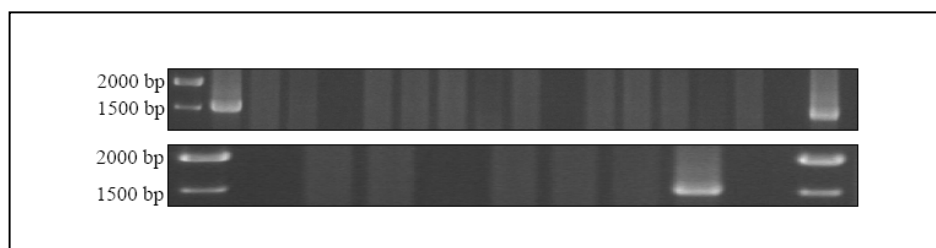


Abb. 18: 1%iges Agarosegel mit der Analyse des PCR-Schnelltests Von 92, über einen PCR-Schnelltest geprüften, *E. coli*-Top10 Klonen sind 26 PCR-Proben gezeigt. Klon 20, 36 und 45 stellten sich als positiv heraus und enthielten das Fragment *ALDH1A1* im Bereich von 1505 bp.

Für eine weitere Überprüfung der Klone wurde die Plasmid-DNA der positiven Transformanden isoliert und mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut. Die anschließende Analyse des Restriktionsverdaus auf einem 1%igen Agarosegel bestätigte das Ergebnis der PCR-Analyse (Abbildung nicht gezeigt). Für alle 5 Klone war neben der Vektorbande eine Bande im Bereich von 1505 bp sichtbar, welche der erwarteten Fragmentgröße von *ALDH1A1* entsprach.

4.3.1.2 Überexpression von RALDH1

Für die Überexpression des Proteins RALDH1 musste das Plasmid pNKH1/*ALDH1A1* in einen anderen *E. coli* Stamm transformiert werden. Der bis dahin verwendete *E. coli*-Stamm Top10 stellte sich für eine Überexpression als nicht geeignet heraus. Aus diesem Grund wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet.

Nach der Transformation in BL21(DE3)-Zellen wurden erneut 8 Klone über einen PCR-Schnelltest kontrolliert und wiesen das erwartete Fragment bei 1505 bp auf. Zur Optimierung der Versuchsbedingungen für die Überexpression des RALDH1-Proteins wurden Kulturen mit einem kleinen Volumen verwendet. Zwei der acht getesteten Klone (Klon 4 und Klon 5) wurden für eine Test-Überexpression ausgewählt. Dazu wurden je zwei 5 ml Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,3 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 inkubiert. Vor einer Induktion der Kulturen wurden Proben mit einer OD₆₀₀ von 0,5 entnommen. Die folgende Induktion der Expression mit L-Arabinose wurde mit 2 Konzentrationen durchgeführt (0,2% und 0,02%). Im Anschluss daran wurden die Kulturen weitere 5 h bei 37°C inkubiert. Nach einer erneuten Bestimmung der OD₆₀₀ wurde eine Probe nach der Induktion entnommen.

Die Auswertung der vor und nach der Induktion entnommenen Proben erfolgte über ein SDS-Gel. Dafür wurden die gewonnenen Zellpellets in 20 µl 1 x SDS-Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und gekocht. Ein Teil der Proben (10 µl) wurde für die Herstellung eines Coomassie-Gels verwendet (Abb. 19), der andere Teil zur Herstellung eines *Western Blots* (Abb. 20).

Das Gel zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den Kulturen vor der Induktion (v.Ind.) und nach der Zugabe von L-Arabinose (n.Ind.). Vor der Induktion war im erwarteten Bereich von 57 kDa keine Bande sichtbar. Nach Induktion der Expression war auf der gleichen Höhe eine dickere Bande erkennbar. Es wurde mehr Protein unter Verwendung der geringeren L-Arabinose-Konzentration von 0,02% gebildet als mit der

höheren von 0,2%. Ein Vergleich beider Klone machte deutlich, dass Klon 4 für eine Überexpression besser geeignet ist als Klon 5 (Abb. 19).

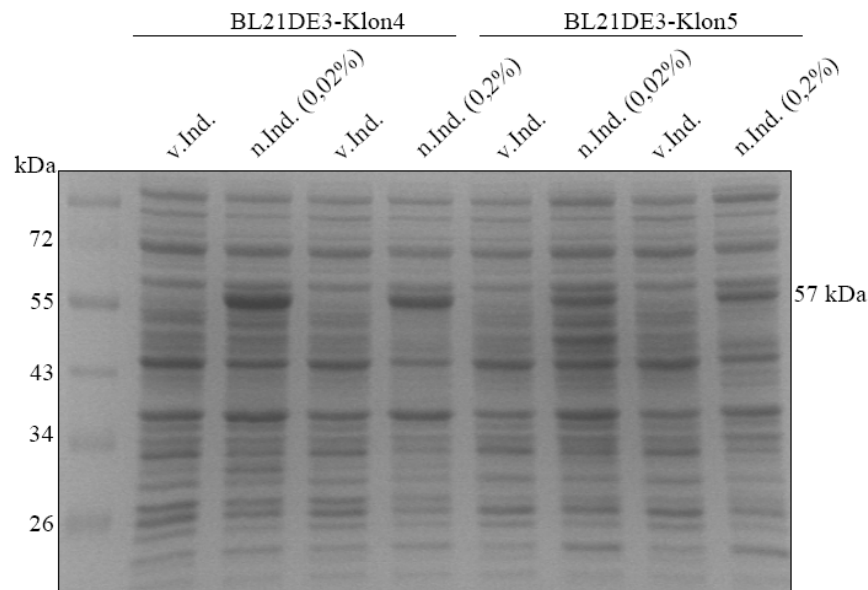


Abb. 19: 10%iges Coomassie-Gel mit der Analyse der Überexpression von RALDH1. Den *E.coli*-Kulturen wurden vor der Induktion mit L-Arabinose (v.Ind.) und nach der Induktion (n. Ind. 0,2% bzw. 0,02%) Proben mit einer OD₆₀₀ von 0,5 entnommen. Die erhaltenen Zellpellets wurde in 20 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, wovon je 10 µl pro Spur geladen wurden.

Die in Abb. 20 gezeigte *Western Blot* Analyse mit den gleichen Proben bestätigt das Ergebnis des Coomassie-Gels. Für beide Klone war im nichtinduzierten Zustand im Bereich von 57 kDa keine Expression des Proteins in Form einer Bande sichtbar. Erst durch die Zugabe von L-Arabinose wurde die Expression des Proteins RALDH1 induziert, als deutliche Bande im *Western Blot* sichtbar (Abb. 20).

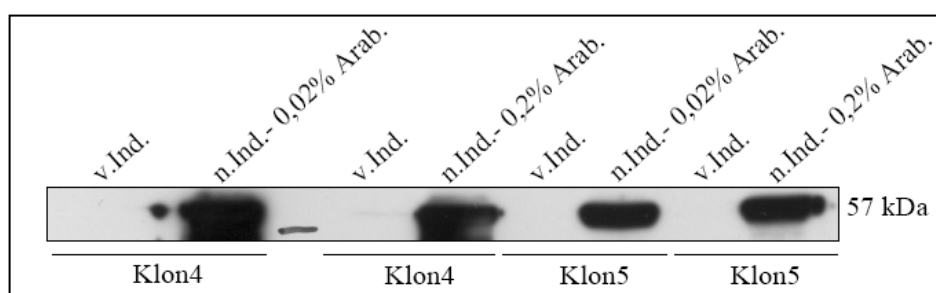


Abb. 20: *Western Blot* Analyse der Test-Überexpression von RALDH1.

Die aus der Überexpression resultierenden Zellpellets, vor (v.Ind.) und nach (n.Ind.) Induktion mit L-Arabinose (0,2% bzw. 0,02% Arab.), wurden in 20 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen, mit 10 µl pro Spur pipettiert, über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des ALDH1A1 Antikörpers (rabbit monoclonal, abcam) und zeigt eine Bande bei 57 kDa.

Für die Reinigung des Proteins RALDH1 wurde die Überexpression in einem größeren Maßstab durchgeführt. Mit Hilfe der Übernachtskultur wurde eine 500 ml Kultur auf eine OD600 von 0,3 angeimpft und nach den beschriebenen Bedingungen mit 0,02% L-Arabinose induziert und weiterbehandelt.

4.3.1.3 **Aufreinigung des *His-tag* Proteins RALDH1**

Das aus der Überexpression resultierende Zellpellet wurde in 5 ml 1 x LEW-Puffer resuspendiert und der Proteinextrakt nach dem angegebenen Protokoll isoliert (Punkt 3.7.1.4). Die Isolierung des *His-tag* Proteins RALDH1 aus einem Pool an Proteinen erfolgte über eine Affinitätschromatographie, im Speziellen eine Metallchelatchromatographie (siehe Punkt 3.8.1.1).

Unspezifische Proteine werden durch sich anschließende Waschschrte entfernt. Dem Waschpuffer wurde dafür in steigender Konzentration Imidazol beigefügt. Beginnend mit Puffer ohne Imidazol wurden 20 mM, 50 mM und 100 mM Imidazol in den einzelnen Waschschrten verwendet. Die Elution des Proteins erfolgte mit LEW-Puffer, welcher durch 250 mM Imidazol komplementiert wurde.

Die Aufreinigung von RALDH1 erfolgte unter nativen Bedingungen. Wasch- und Elutionsschrte erfolgten durch die Zugabe von je 1 ml des entsprechenden Puffers auf die Säulenmatrix. Genaue Angaben über die Anzahl der einzelnen Wasch- und Elutionsschrte können nicht gemacht werden, weil diese zwischen den Isolierungen variierten. Zur Kontrolle wurden die Waschschrte und auch später die Elutionsschrte mit Hilfe einer Bradford-Lösung getestet. Vor Versuchsbeginn wurde eine 96-well Platte mit 100 µl Bradford-Lösung pro well vorbereitet. Von jedem Wasch- und Elutionsschritt wurden je 10 µl mit 100 µl Bradford-Lösung resuspendiert. Die Waschschrte wurden so lange durchgeführt, bis keine unspezifischen Proteine mehr von der Säule gewaschen wurden. Gleiches erfolgte bei den Elutionsschrten.

Die gesammelten Wasch- und Elutionsschrte wurden auf einem 10%igen SDS-Gel analysiert (Abb. 21). Im für das Protein RALDH1 erwarteten Bereich von 57 kDa war eine deutliche Bande sichtbar, deren Intensität mit zunehmenden Elutionsschrten abnahm. Die Verunreinigung durch andere Proteine war sehr gering.

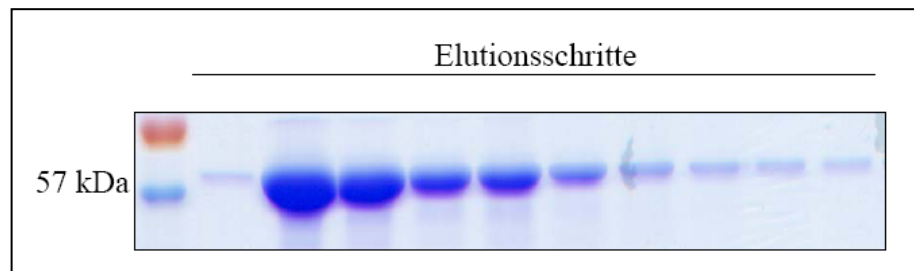


Abb. 21: 10%iges Coomassie-Gel mit Elutionsschritten der RALDH1-Reinigung. Von den gesammelten Elutionsschritten wurden je 10 μ l Proteinextrakt über ein 10%iges SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

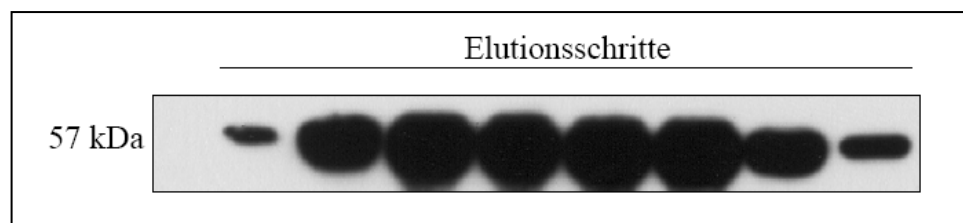


Abb. 22: Western Blot Analyse mit Elutionsschritten der RALDH1-Aufreinigung. Unter Verwendung des ALDH1A1 Antikörpers (*rabbit monoclonal*, abcam) wurde mit den Elutionsschritten (je 10 μ l), welche zuvor über ein 10%iges SDS-Gele elektrophoretisch aufgetrennt wurden, eine *Western Blot* Analyse durchgeführt.

Ob es sich bei dem isolierten Protein um RALDH1 handelt, wurde in einer *Western Blot* Analyse mit einem für das Protein spezifischen Antikörper untersucht. Von den einzelnen Elutionsschritten wurden zu diesem Zweck je 10 μ l Proteinextrakt über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt und anschließend mittels *Western blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen.

Die *Western Blot* Analyse zeigt im für RALDH1 erwarteten Bereich von 57 kDa eine Bande (Abb. 22). Eine folgende MALDI-TOF Analyse bestätigte dieses Ergebnis.

4.3.1.4 Umpuffern der RALDH1-Proben

Das über eine Metallchelatchromatographie aufgereinigte Protein lag in dem für die Elution verwendeten Puffer vor. Die darin enthaltene hohe Imidazolkonzentration machte das Protein für Folgeversuche unbrauchbar und musste entfernt werden, da zum Einen mit dieser Imidazolkonzentration eine Konzentrationsbestimmung der Elutionsschritte mittels *BCA-assay* nicht möglich war. Auf der anderen Seite konnten die Proben nicht bei -20°C gelagert werden, weil das Protein unter diesen Bedingungen

ausfällt und somit unbrauchbar ist. Alternativ dazu war auch eine Lagerung bei 4°C über einen längeren Zeitraum nicht möglich, weil das Protein degradierte.

Ein Pufferaustausch und eine Entsalzung der Proben wurden unter Verwendung von NAPTM-25-Säulen durchgeführt. Dafür wurden 3 Elutionsschritte (max. 2,5 ml) gepoolt und über die Säule gegeben. Die Elution wurde mit 1 x PBS in 500 µl-Schritten durchgeführt, da Elutionsschritte mit kleineren Puffermengen eine bessere Entsalzung der Proben ermöglichen.

Die gesammelten Elutionsschritte wurden mittels einem *Western Blot* analysiert. Unter Verwendung des für das Protein RALDH1 spezifischen Antikörpers ist eine saubere Bande im erwarteten Bereich von 57 kDa erkennbar (Abb. 23).

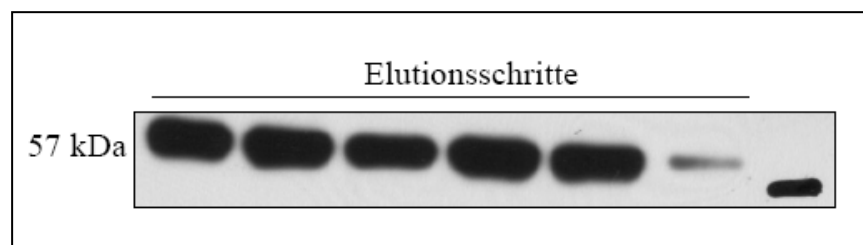


Abb. 23: *Western Blot* Analyse der umgepufferten Elutionsschritte der RALDH1-Reinigung. Die Elutionsschritte wurden nach dem Umpuffern der Proben mit 10 µl pro Spur über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. Der anschließende *Western Blot* Analyse erfolgte mit dem spezifischen Antikörper ALDH1A1 (*rabbit, monoclonal*, abcam).

4.3.2 *Line Blots* für die Analyse RALDH1 positiver OMS-Seren

Für die Analyse weiterer Patientenserum auf das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen das Protein RALDH1 wurden *Line Blots* verwendet. Das aufgereinigte und umgepufferte rekombinante Protein RALDH1 wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/Spur über ein 10%iges SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels *Western blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde in Streifen geschnitten und in ein mehrkammriges Reaktionsgefäß überführt. Dadurch konnte jeder Strip mit dem Serum eines Patienten oder dem Serum der entsprechenden Kontrollgruppen inkubiert werden. Die Seren wurde dafür mit einer Verdünnung von 1:200 in einer 5%igen Milchlösung eingesetzt.

Für den Versuch wurden Seren von 39 OMS-Patienten, 41 gesunden Probanden und 13 NB-Patienten ohne OMS getestet, wobei die letzten beiden Gruppen als Kontrollen

dienten (siehe Anhang Tabellen I, II und III). Dabei konnten in 15/39 OMS-Seren (39%), aber nur 5/42 Seren gesunder Probanden (11,9%) und nur 2/13 NB-Patienten (15,4%) Autoantikörpern gegen RALDH1 nachgewiesen werden ($p < 0,04$, Abb. 24).

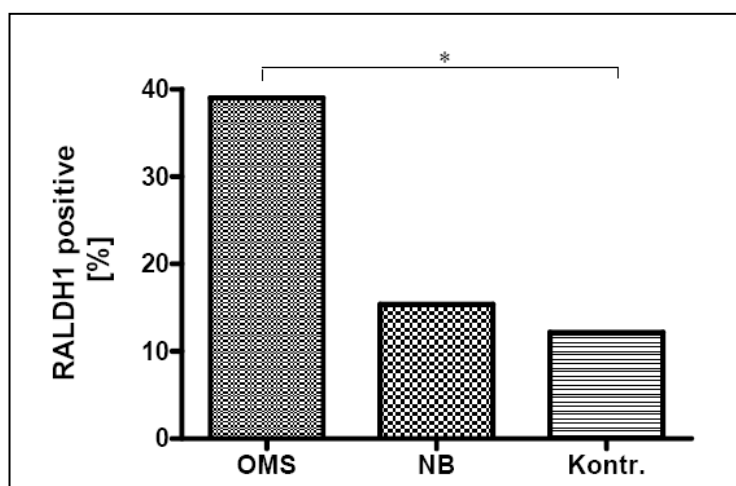


Abb. 24: Line Blots für die Analyse von RALDH1-Antikörpern in OMS-Seren .

Das rekombinante Protein RALDH1 wurde mit 0,5 µg Protein/Spur geladen. Jeder Streifen wurde mit einem Serum (1:200 verdünnt) von OMS-Patienten (OMS), gesunden Kontrollen (Kontr.) oder NB-Patienten ohne OMS (NB) inkubiert. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil RALDH1 positiv getesteter Seren. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen wies eine signifikant hohe Anzahl an OMS-Seren Autoantikörper gegen RALDH1 auf ($p < 0,04$).

4.3.3 RALDH1 als RNA-bindendes Protein

Viele Autoantigene werden im Zusammenhang mit einem paraneoplastischen OMS als RNA-bindende Proteine beschrieben, so zum Beispiel das Hu Protein, NOVA 1/2 sowie die in dieser Arbeit identifizierte α -Enolase. Aus diesem Grund wurde auch RALDH1 auf eine mögliche Funktion als RNA-bindendes Protein hin untersucht.

4.3.3.1 Herstellung biotinylierter RNA

Für die Untersuchung einer RNA-Bindung wurde Gesamt-RNA aus der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y isoliert und durch einen Biotinanhäng markiert. Die Biotinylierung wurde in einem *Dot Blot* überprüft (siehe Punkt 3.6.4.8.2). Dazu wurde biotinylierte Gesamt-RNA auf eine Nylon-Membran gespottet und nach einem Waschschrift mit

dem *Sekundär*-Antikörper Streptavidin/HRP (1:5.000) inkubiert, welcher an den Biotinanhang bindet. Die Biotinylierung der RNA war erfolgreich und konnte bis in den Bereich geringer RNA-Mengen nachgewiesen werden (Abb. 25).

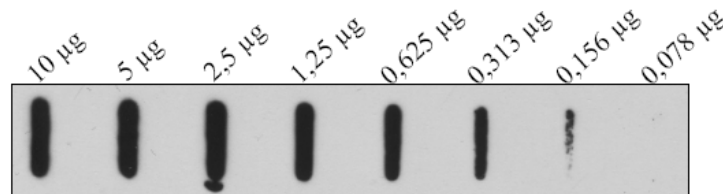


Abb. 25: Dot Blot zur Überprüfung der Biotinylierung von Gesamt-RNA.

Biotinylierte RNA wurde in verschiedenen Konzentrationen auf eine Nylon-Membran gespottet. Die Detektion erfolgte über den Biotinanhang und mit dem *Sekundär*-Antikörper Streptavidin/HRP (1:5.000).

4.3.3.2 ELISA-Assay mit RALDH1 und biotinylierter RNA

Eine für das Protein RALDH1 mögliche Funktion als RNA-bindendes Protein wurde unter nativen Bedingungen über einen ELISA-Assay untersucht. Das rekombinante Protein RALDH1 (RALDH) wurde in verschiedenen Konzentrationen, verdünnt in 50 mM NaHCO₃, angesetzt und damit eine 96-well Platte über Nacht bei 4°C beschichtet. Parallel dazu wurden auf der gleichen Platte BSA als Negativkontrolle und die bekannten RNA-bindenden Proteine Eap (1 µg) und α -Enolase (Eno, 3 µg) als Positivkontrollen eingesetzt. Alle Proteine wurden dafür in Dreifachansätzen verwendet. Nach einem Blockierschritt wurde biotinylierte RNA in zwei verschiedenen Konzentrationen zu den Proteinen gegeben: RNA, verdünnt in TBS, wurde mit 3 µg/well und 6 µg/well eingesetzt.

Das Ergebnis der Absorptionsmessung bei 450 nm zeigt, dass RALDH1 RNA bindet (Abb. 26). Die Absorption und somit auch die RNA-Bindung nahmen mit einer steigenden Proteinkonzentration zu. Für 6 µg RNA konnte ein höherer Kurvenverlauf beobachtet werden, im Vergleich zu 3 µg (Abb. 26). Die als Positivkontrolle verwendeten Proteine Eap und α -Enolase wurden mit 3 µg RNA inkubiert. Beide Proteine wiesen im Vergleich zu RALDH1 eine stärkere RNA-Bindung auf (Abb. 26).

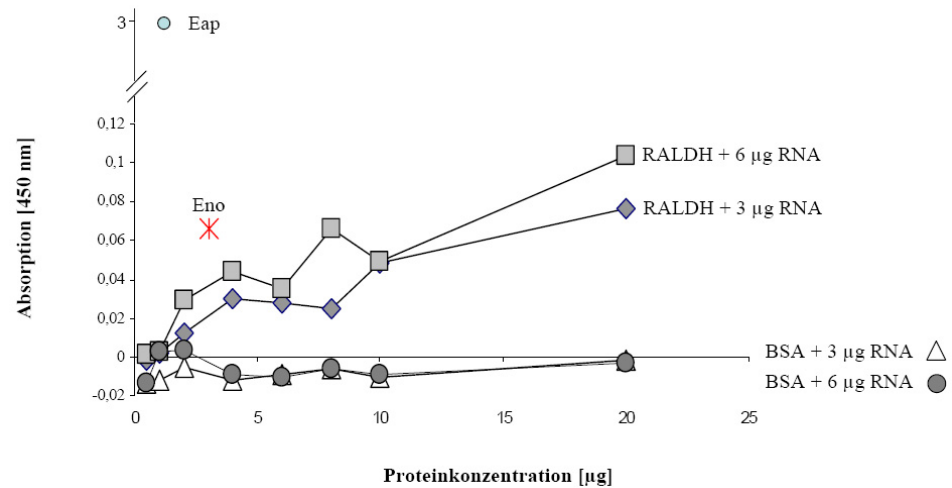


Abb. 26: ELISA für den Nachweis einer RNA-Bindung von RALDH1.

Mit dem rekombinanten Protein RALDH1 (RALDH) wurde in steigender Konzentration eine 96-well Platte beschichtet. Die Proteine Eap (3 µg) und α -Enolase (Eno, 1 µg) wurden als Positivkontrollen eingesetzt, BSA als Negativkontrolle. Biotinylierte RNA wurde in zwei Konzentrationen (3 µg und 6 µg) zu den Proteinen gegeben. Die Detektion erfolgte über den RNA-Biotinhang mit dem *Sekundär*-Antikörper Streptavidin/HRP und einer Substratlösung (TMB-Kit). Die Absorption wurde in einem ELISA-reader bei 450 nm gemessen.

4.3.3.3 DOT Blot mit RALDH1 und biotinylierter RNA

Mittels des *Dot Blot* Verfahrens sollte das Ergebnis des ELISA Tests wiederholt und eine RNA-bindende Funktion von RALDH1 bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde das rekombinante Protein RALDH1 in verschiedenen Konzentrationen auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet (Abb. 27). Als Positivkontrolle wurde Eap in drei Konzentrationen verwendet, BSA diente als Negativkontrolle. Nach einem Waschschrift wurden die Membranen mit 10 µg bzw. 30 µg biotinylierter RNA inkubiert. Danach erfolgte die Detektion einer RNA-Bindung unter Verwendung des *Sekundär*-Antikörpers Streptavidin/HRP.

Das *Dot Blot* Ergebnis bestätigte die schon im ELISA beobachtete Funktion von RALDH1 als RNA-bindendes Protein (Abb. 27). Eap als Positivkontrolle weist eine stärkere RNA-Bindung auf, die sich mit erhöhter RNA-Konzentration steigert (Abb. 27).

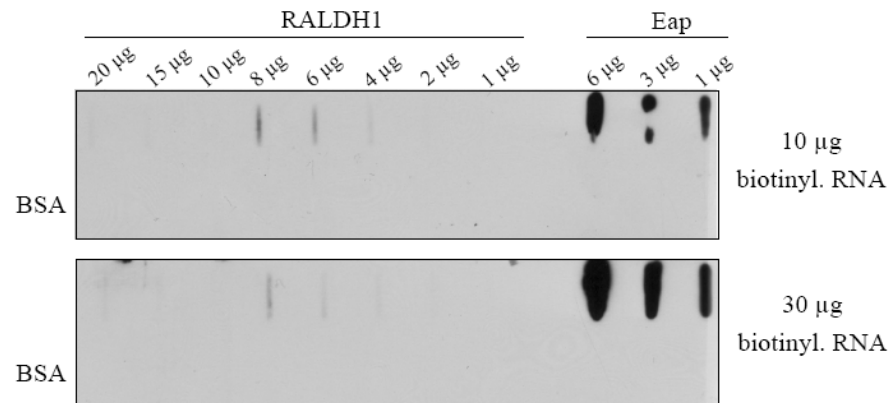


Abb. 27: Dot Blot zur Analyse einer RNA-bindenden Funktion von RALDH1.

Das rekombinante Protein RALDH1 wurde in verschiedenen Konzentrationen auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet. Eap diente als Positivkontrolle, BSA als Negativkontrolle. Die Membran wurde mit 10 bzw. 30 µg biotinylierter RNA inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem *Sekundär*-Antikörper Streptavidin/HRP. Im Bereich von 6 und 8 µg RALDH1 kann eine RNA-Bindung beobachtet werden.

4.3.4 Einfluss von RNA auf die Bindung von Autoantikörpern an RALDH1

Im ELISA Test und auch im *Dot Blot* zeigte sich, dass RALDH1 ein RNA-bindendes Protein ist. Diese RNA-Bindung könnte wiederum einen Einfluss auf die Bindung der nachgewiesenen Autoantikörper in OMS-Seren an das Protein haben, was im Folgenden untersucht werden sollte.

Für den Versuch wurde eine ELISA-Platte mit RALDH1 in einer Konzentration von 8 µg Protein/well beschichtet. Als Negativkontrolle wurde BSA verwendet. Die Patientenseren wurden in dreifachen Ansätzen mit dem Protein allein, in Verbindung mit RNA und mit BSA inkubiert. Sechs OMS-Seren mit Autoantikörpern gegen das Protein RALDH1 und 5 Seren gesunder Probanden wurden getestet. Als Positivkontrolle wurde der Antikörper ALDH1A1 (*rabbit monoclonal*, abcam) verwendet. Die Auswertung erfolgte über eine Absorptionsmessung im Bereich von 450 nm (Abb. 28).

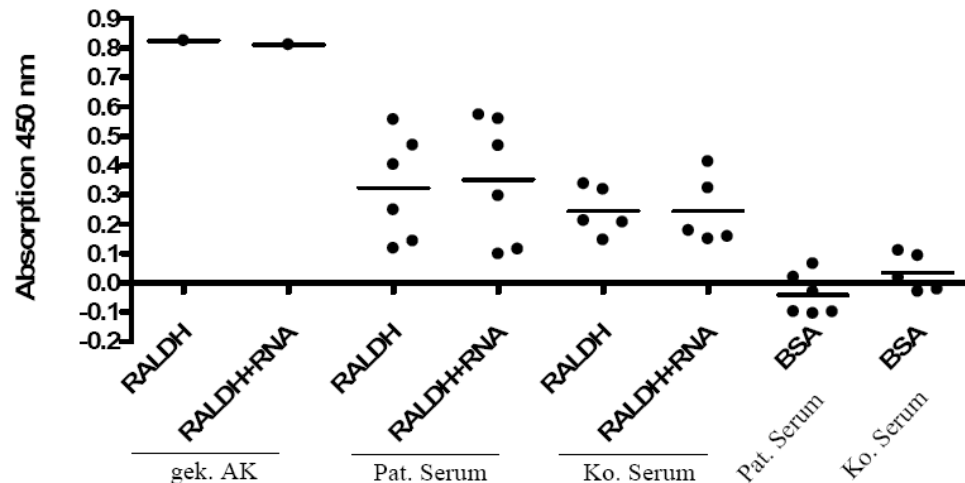


Abb. 28: ELISA-Test für die Untersuchung der Antikörperbindung an RALDH1 unter dem Einfluss von RNA. Eine ELISA-Platte wurde mit dem rekombinanten Protein RALDH1 allein und in Kombination mit RNA beschichtet. BSA diente als Negativkontrolle. Die Bindung an das Protein (RALDH) und den Komplex (RALDH+RNA) wurde mit OMS-Seren (Pat.Serum) und Seren gesunder Probanden (Ko.Serum) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein RALDH1-spezifischer Antikörper (*rabbit monoclonal*, abcam) eingesetzt (gek. AK). Ausgewertet wurde der Versuch über eine Absorptionmessung im Bereich von 450 nm.

Für die verwendeten OMS-Seren wurde eine Bindung an RALDH1 beobachtet, wobei bei 3/6 Seren eine höhere Affinität an das Protein aufwiesen (Abb. 28). Durch die Zugabe von RNA änderte sich die Intensität der Bindung an das Protein nicht ($p > 0,05$). Ähnlich verhielt es sich mit den Kontroll-Seren ($p > 0,05$). Für den gekauften Antikörper war eine erwartete hohe Bindung zu beobachten.

4.3.5 Expression von RALDH1 in Neuroblastom-Zellen: RT-PCR

Die Grundidee für diesen Versuch war, einen Überblick über das Expressionsmuster von Retinaldehydrogenasen (RALDH) in Neuroblastomzellen zu bekommen. Retinaldehydrogenasen liegen in drei Formen vor: RALDH1 (*ALDH1A1*), RALDH2 (*ALDH1A2*) und RALDH3 (*ALDH1A3*). Sie sind an der Synthese von Retinolsäure (RA) beteiligt. Die RA-Konzentration in den Zellen wird durch eine weitere Gruppe von Enzymen mit dem Namen CYP26s kontrolliert. Diese Enzymgruppe ist auch in drei Formen unterteilt, mit den Bezeichnungen CYP26A, 26B und 26C.

Die Untersuchung auf RNA-Ebene wurde mit zwei Neuroblastomzelllinien durchgeführt, SKN-SH-Zellen und SH-SY5Y-Zellen. Neben unbehandelten Zellen wurden diese auch mit 5 bzw. 10 μM RA behandelt, um mögliche Veränderungen im Express-

sionsmuster zu untersuchen. Nach 24 h Inkubation wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und mit Hilfe einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung genspezifischer Primer wurde mit der cDNA eine PCR durchgeführt (Xi and Yang 2008). Die einzelnen Ansätze wurden danach auf einem 2%igen Agarosegel analysiert (Abb. 29 und 30).

Eine Expression der Enzyme RALDH1 und 2 konnte in SKN-SH-Zellen unter keiner der gewählten Bedingungen nachgewiesen werden (Abb. 29). RALDH3 dagegen wurde von den Zellen exprimiert, unbeeinflusst von den einzelnen Behandlungen: In gleichbleibender Konzentration war eine Bande im erwarteten Bereich von 480 bp erkennbar. Für die Enzyme CYP26A und 26B konnte eine Expression in RA-stimulierten SKN-SH-Zellen beobachtet werden. CYP26C war weder in RA-behandelten noch in unstimulierten Neuroblastomzellen nachweisbar. Erwartete Banden im Bereich von 140 bp für CYP26A und 148 bp für CYP26B waren auf dem Gel sichtbar (Abb. 29). GAPDH und β -Actin wurden als Ladekontrollen verwendet und sind im Gel als gleichmäßige Bande sichtbar. (Abb. 29). Als Negativkontrolle wurde der Mastermix mit β -Actin-Primern ohne cDNA verwendet.

Das gleiche Experiment wurde mit RNA, isoliert aus der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, durchgeführt. Auch hier wurden die Zellen vor der RNA-Präparation mit 5 bzw. 10 μ M RA behandelt, um nach einer RT-PCR unter Verwendung der bereits beschriebenen genspezifischen Primer eine PCR durchzuführen und die Proben auf einem 2%igen Agarosegel zu analysieren (Abb. 30).

Das Expressionsmuster der einzelnen Enzyme ist in diesen Zellen im Vergleich zu den SKN-SH Zellen verändert. RALDH1 konnte auch hier nicht nachgewiesen werden, im Vergleich zu RALDH2: Im erwarteten Bereich von 508 bp war für unbehandelte Zellen und nach einer 10 μ M RA-Behandlung eine schwache Bande sichtbar (Abb. 30), während sich bei 5 μ M RA eine etwas stärkere Bande zeigte. Für das Enzym RALDH3 konnte eine gleichbleibende Bande in Höhe von 480 bp beobachtet werden.

Im Gegensatz zu CYP26C konnten die Enzyme CYP26A und 26B auch in dieser Zelllinie nach einer RA-Behandlung nachgewiesen werden. Für CYP26B war im Bereich von 148 bp eine stärkere Bande sichtbar, im Vergleich zu CYP26A. GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet und war als gleichbleibend starke Bande in allen Proben sichtbar, mit Ausnahme der Negativkontrolle.

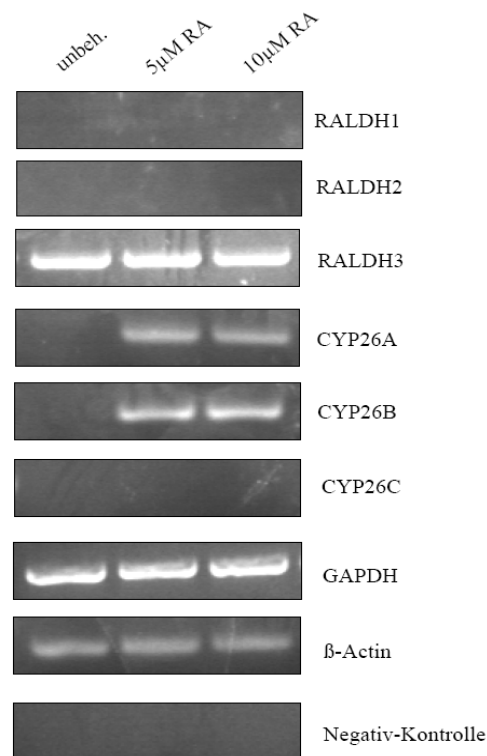


Abb. 29: 2%iges Agarosegel der PCR-Analyse der Fragmente von RALDH 1-3 und CYP26 A-C in SKN-SH-Zellen. Verwendet wurde in cDNA transkribierte Gesamt-RNA aus unbehandelten und behandelten Zellen (5 bzw. 10 μ M RA), die mit genspezifischen Primern auf das Vorhandensein verschiedener Transkripte hin untersucht wurden. Es wurden 10 μ l von jeder Probe auf das Gel geladen. Die Fragmente RALDH3 (480 bp), CYP 26A (140 bp) und CYP 26B (148 bp) sowie GAPDH (431 bp) und β -Actin (149 bp) als Ladekontrollen konnten nachgewiesen werden.

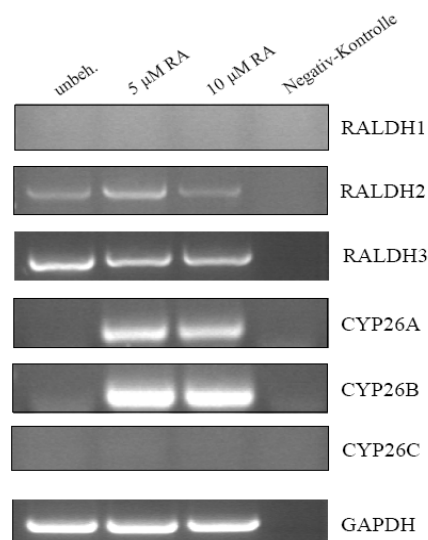


Abb. 30: 2%iges Agarosegel zur Analyse der PCR-Fragmente von RALDH1-3 und CYP26A-C in SH-SY5Y-Zellen. Verwendet wurde in cDNA transkribierte Gesamt-RNA aus unbehandelten und behandelten (5 bzw. 10 μ M RA) Zellen, welche mit spezifischen Primern auf das Vorhandensein verschiedener Transkripte hin untersucht wurde. Von jedem Ansatz wurden 10 μ l geladen. Die Fragmente RALDH2, RALDH3, CYP26A, CYP26B und GAPDH, als Ladekontrolle, konnten nachgewiesen werden.

4.3.6 Expression von RALDH1 auf der Oberfläche von Neuroblastom-Zellen

Wie bereits in Punkt 4.2.5 für Enolase beschrieben, konnte in verschiedenen Versuchen gezeigt werden, dass Autoantikörper in OMS-Seren an Oberflächenstrukturen von Neuroblastomzellen binden. Aus diesem Grund wurde parallel zu den Analysen auf RNA-Ebene untersucht, ob RALDH1 auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen exprimiert wird und dadurch von Antikörpern gebunden werden kann.

Dafür wurden die Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y in Vollmedium kultiviert, wobei SKN-SH-Zellen für einen Teil des Versuches auch in FCS-reduziertem Medium gehalten wurden (0,4% FCS). Die Zellen wurden für 24 h mit 5 bzw. 10 μ M RA behandelt. Im Folgenden wurden Membranproteine durch einen Biotinanhang markiert und unter Verwendung von Streptavidin-*Beads* von den zytoplasmatischen Proteinen getrennt (siehe Punkt 3.7.1.2). Die Analyse der Proteinfractionen fand über ein 10%iges SDS-Gel und eine *Western Blot* Analyse statt. Als Positivkontrolle wurde in einer Spur das rekombinante Protein RALDH1 mit 1 μ g geladen (Abb. 32). Die *Blot*-Membran wurde neben dem spezifischen RALDH1-Antikörper auch mit den Antikörpern NCAM und 20S-Proteasom UE, als Kontrollen für eine reine Membranfraktion, ohne Kontamination durch Zytoplasma-Proteine, inkubiert.

In der *Western Blot* Analyse mit Proteinextrakt aus SKN-SH Zellen wurde NCAM in der Membranfraktion im erwarteten Bereich von 180 kDa detektiert. Die 20S Proteasom Untereinheit zeigte sich nur im Zytoplasma bei 30 kDa. Im Gegensatz dazu war für RALDH1 weder in der Membranfraktion noch im zytoplasmatischen Teil eine Bande bei 55 kDa sichtbar (Abb. 31), wodurch die Resultate der RT-PCR bestätigt wurden.

Gleiche Untersuchungen, wie für SKN-SH-Zellen beschrieben, wurden auch für die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y durchgeführt. Die Zellen wurden in Vollmedium kultiviert und mit 5 bzw. 10 μ M RA behandelt. Nach einer Markierung der Membranproteine durch einen Biotinanhang wurden Membran- und Zytoplasmaproteine voneinander getrennt. Im Anschluss daran wurden die Proteinfractionen auf einem *Western Blot* analysiert (Abb. 32). Das rekombinante Protein RALDH1 wurde als Positivkontrolle in der ersten Spur des *Blots* geladen und ist als 57 kDa-Bande sichtbar (Abb. 32).

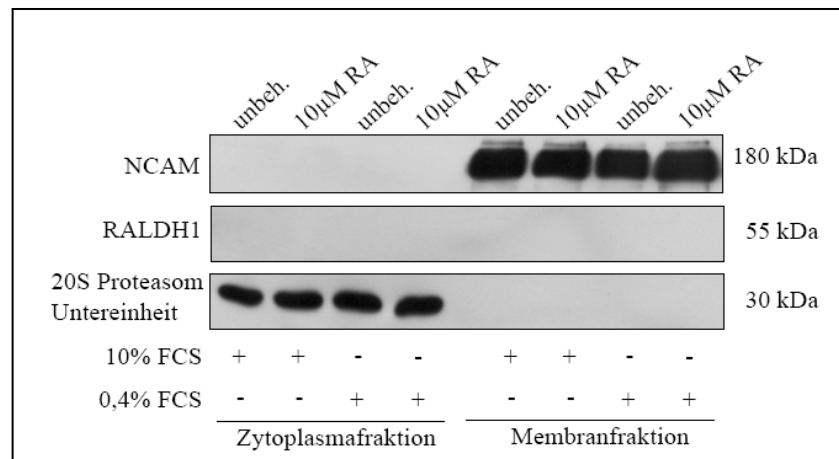


Abb. 31: Western Blot Analyse der Oberflächenexpression von RALDH1 auf SKNSH-Zellen. Die Zellen wurden in RPMI-Vollmedium (10% FCS) und reduziertem Medium (0,4% FCS) kultiviert. Ausgehend von 150 µg Gesamtprotein un behandelter und behandelter (10 µM RA, 24 h Inkubation) Zellen, wurden nach der Trennung die Membranproteine mit 30 µl 1 x SDS-Puffer von den *Beads* gelöst. Davon wurden 15 µl Proteinextrakt pro Spur geladen. Von der Zytoplasmafraktion wurden 10 µl verwendet. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern gegen NCAM (180 kDa), RALDH1 (55 kDa) und die 20S Proteasom-Untereinheit (30 kDa).

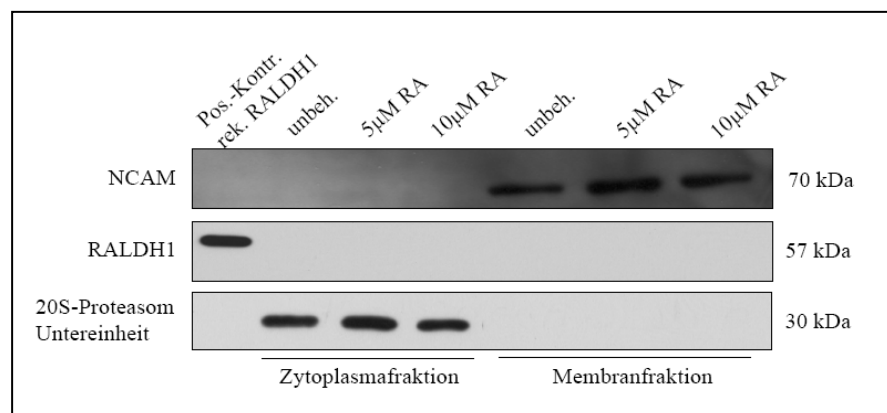


Abb. 32: Western Blot Analyse der Oberflächenexpression von RALDH1 auf SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit RA (5 bzw. 10 µM) behandelt. Für die Isolierung wurden 150 µg Gesamtproteinextrakt eingesetzt. An *Beads* gebundene Membranproteine wurden mit 30 µl 1 x SDS-Puffer abgelöst. Davon wurden pro Ansatz für das Gel 15 µl in der Membranfraktion verwendet. Vom zytoplasmatischen Teil wurden 10 µl eingesetzt. Das rekombinante Protein RALDH1 (rek. RALDH1) diente als Positivkontrolle. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern gegen NCAM (70 kDa), RALDH1 (55 bzw. 57 kDa) und die 20S-Proteasom-Untereinheit (30 kDa).

In der *Western Blot* Analyse zeigte sich für die 20S-Proteasom Untereinheit erwartungsgemäß eine Bande in der Zytoplasmafraktion bei 30 kDa (Abb. 32). Das Adhäsions-

onsmolekül NCAM wurde mit einem alternativen CD56-Antikörper (Sigma) nachgewiesen, auf dem Blot als 70 kDa-Bande sichtbar.

Eine Expression des Proteins RALDH1 konnte auch hier nicht nachgewiesen werden. Auf dem *Blot* mit Proteinextrakt aus SH-SY5Y-Zellen war weder in der Zytoplasmafraktion noch in der Membranfraktion eine Bande im Bereich von 55 kDa sichtbar (Abb. 32).

4.4 Funktionelle Effekte von Autoantikörpern im OMS in Zusammenhang mit Retinolsäure

Untersuchungen mit OMS-Seren haben gezeigt, dass darin enthaltene Autoantikörper einen antiproliferativen Effekt auf Neuroblastomzellen haben (Korfei et al. 2005). Zusätzlich wurde beobachtet, dass diese Antikörper Apoptose in Neuroblastomzellen induzieren (Korfei et al. 2005). Ein genauer Wirkmechanismus dieser Autoantikörper ist aber unbekannt. Aus diesem Grund sollen folgende Versuche Aufschluss über weitere funktionelle Effekte dieser Antikörper geben.

4.4.1 Wirkung von Retinolsäure auf die Differenzierung von Neuroblastom-Zellen

Mittels 2D-*Western Blot* Analyse wurde das Enzym RALDH1 als neues Autoantigen in OMS nachgewiesen. RALDH1 ist am entscheidenden Schritt der Synthese von Retinolsäure (RA) aus Retinol (Vitamin A) beteiligt.

In der Zellkultur hat RA eine differenzierungsfördernde Wirkung auf Zellen, welche im Folgenden an den Neuroblastomzelllinien SH-SY5Y und SKN-SH untersucht wurde. Die Zellen wurden unter Verwendung von Vollmedium in 6-well Platten kultiviert und über einen Zeitraum von insgesamt 72 h mit RA (10 μ M) behandelt. Danach wurde der Proteinextrakt aus den Zellen isoliert und über ein 12,5%iges SDS-Gel und einen anschließenden *Western Blot* analysiert. Die Detektion fand unter Verwendung des Bcl-2-Antikörpers (*rabbit polyclonal*, Cell Signaling) statt, der Antikörper gegen β -Actin diente als Ladekontrolle. Bcl-2 als anti-apoptotisches Protein wird als Marker für eine Differenzierung der Zellen eingesetzt.

Die *Western Blot* Analyse zeigte, dass es bei SH-SY5Y-Zellen im Verlauf der RA-Behandlung (0, 24, 48 und 72 h) zu einem Anstieg der Bcl2-Konzentration kommt, was sich in einer Zunahme der Bandenintensität zeigte (Abb. 33). Im Vergleich dazu wurde bei SKN-SH-Zellen nur eine schwache Bande bei 28 kDa beobachtet, welche mit steigender Inkubationszeit nur gering an Intensität zunahm (Abb. 33). Für beide Zelllinien wurde β -Actin als Ladekontrolle verwendet und war in gleichbleibender Intensität als Bande im Bereich von 42 kDa erkennbar (Abb. 33).

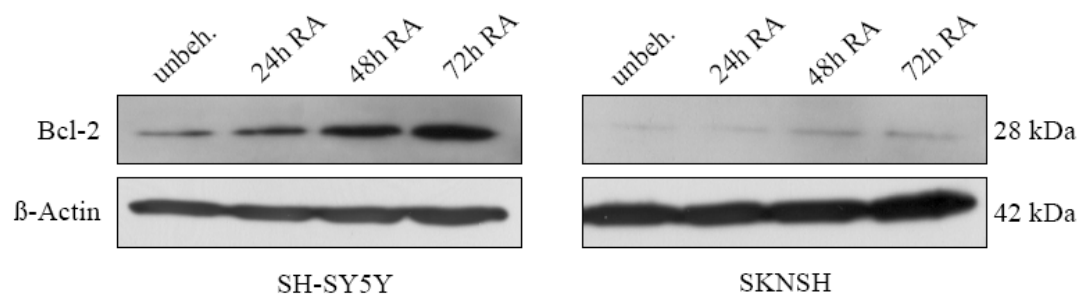


Abb. 33: *Western Blot* Analyse mit Proteinextrakt aus SH-SY5Y- und SKN-SH-Zellen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h mit 10 μ M RA behandelt. Anschließend wurde der Proteinextrakt aus behandelten und unbehandelten Zellen isoliert und in einer Konzentration von 20 μ g/Spur eingesetzt. Die folgende *Western Blot* Analyse wurde mit den Antikörpern Bcl-2 (28 kDa, *rabbit polyclonal*, abcam) und β -Actin (42 kDa, *mouse monoclonal*, abcam), als Ladekontrolle, durchgeführt.

Für SH-SY5Y-Zellen zeichnet sich eine stärkere Differenzierung der Zellen unter einer RA-Behandlung ab. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche nur noch SH-SY5Y-Zellen verwendet.

4.4.2 Dendriten-Wachstum : Retinolsäure-Behandlung

Die Differenzierung, induziert durch RA, zeichnet sich unter anderem durch Änderungen in der Morphologie der Zellen aus. SH-SY5Y-Zellen weisen nach kurzer Zeit einen verlängerten Zellkörper auf. Auffällig ist auch eine starke Verlängerung der Dendriten. Mikroskopisch gut sichtbar, wurden die Dendritenlängen der Zellen ausgemessen, um diese Form der Differenzierung der Zellen zu bestimmen.

In einer 24-well Platte wurden die Zellen mit einer Konzentration von 15.000 Zellen pro well kultiviert. Die folgende Behandlung mit RA (5 bzw. 10 μ M) wurde über einen Zeitraum von 24 und 48 h durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Zellen unter Verwendung einer 4%igen PFA-Lösung an die Platte fixiert. Für die Ausmessung der

Dendritenlängen wurden pro well 8 Photos aus verschiedenen Bereichen gemacht. Im Anschluss daran konnte mit einem speziellen Programm namens *NIS-Elements* die Dendritenlänge der einzelnen Zellen bestimmt werden. Pro Photo wurden 10 Zellen ausgemessen. Die zusammengefassten Mittelwerte der 8 Messungen sind in Abbildung 34 und 35 graphisch dargestellt.

Die Behandlung mit RA für 24 bzw. 48 h resultierte in einem signifikanten Anstieg der Dendritenlänge. Durch die Zugabe von 5 μM RA kam es zu einem mehr als doppelt so langen Auswuchs der Zellfortsätze im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Für 10 μM RA wurden ähnliche Dendritenlängen beobachtet ($p < 0,01$). DMSO als Negativkontrolle zeigte keine Wirkung auf die Zellen und die Dendritenlänge war vergleichbar mit den gemessenen Längen unbehandelter Zellen (Abb. 34 und 35, $p > 0,05$). Unterschiede zwischen den Inkubationszeiten von 24 und 48 h konnte nicht beobachtet werden. Gleiches zeigte sich auch für die beiden verwendeten RA-Konzentrationen.

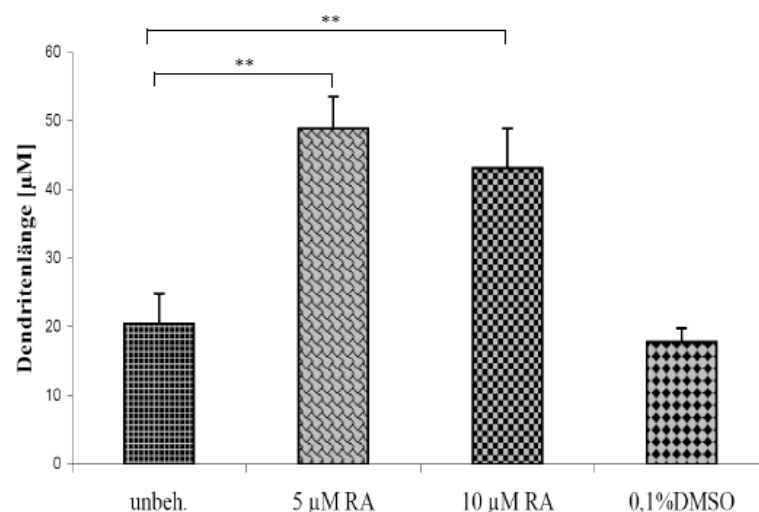


Abb. 34: Ausmessung der Dendritenlänge bei SH-SY5Y-Zellen nach 24 h RA-Behandlung. SH-SY5Y-Zellen wurden für 24h mit RA (5 bzw. 10 μM) behandelt. Im Anschluss daran wurden die Dendritenlängen un behandelter und behandelter Zellen ausgemessen. Diese Abbildung gibt die gemittelten Werte der Dendritenlängen [μm] an. Durch eine RA-Behandlung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Dendritenlänge, unabhängig von der RA-Konzentration ($p < 0,01$). Zwischen un behandelten Zellen und einer DMSO-Behandlung zeigt sich keine Signifikanz hinsichtlich der Dendritenlänge ($p > 0,05$).

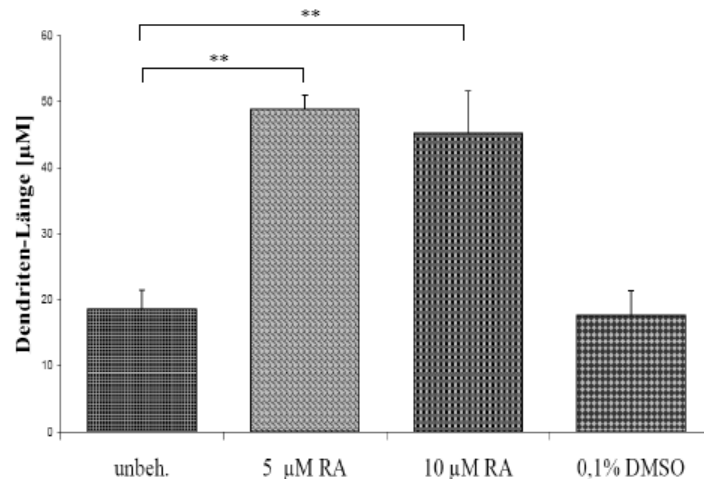


Abb. 35: Ausmessung der Dendritenlänge bei SH-SY5Y-Zellen nach 48 h RA-Behandlung. SH-SY5Y-Zellen wurden für 48h mit RA (5 bzw. 10 µM) behandelt. Anschließend wurde die Dendritenlänge unbehandelter (unbeh.) und behandelter Zellen ausgemessen. Diese Abbildung gibt die gemittelten Werte der Dendritenlängen [µm] an. Durch die RA-Behandlung kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Dendritenlänge, unabhängig von der verwendeten RA-Konzentration ($p < 0,01$). Zwischen unbehandelten Zellen und einer DMSO-Behandlung zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Länge der Dendriten ($p > 0,05$).

4.4.3 Dendriten-Wachstum unter dem Einfluss von Autoantikörpern aus OMS-Seren

Weitere Untersuchungen dendritischer Auswüchse sollten Aufschluss über einen möglichen Einfluss von Autoantikörpern auf diese Form der Differenzierung geben.

Zu diesem Zweck wurden Zellen wie bereits beschrieben in 24-well Platten kultiviert. Für die Behandlung der Zellen wurden 5 IgG-Fractionen aus OMS-Seren (OMS⁺/NB⁺) und 4 IgG-Fractionen aus Seren gesunder Probanden isoliert und in einer Konzentration von 100 µg/ml zu den Zellen gegeben, welche nach dieser Inkubationszeit von 9 h zusätzlich mit RA (10 µM) behandelt wurden. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen (unbeh.) und Zellen, inkubiert mit DMSO (0,1% DMSO) bzw. RA (10 µM RA). Die folgende Ausmessung der Zellen erfolgte, wie bereits unter Punkt 4.4.2 beschrieben.

Für die gemittelten Werte der Dendritenlängen der Kontrollen (unbehandelt, 10 µM RA, 0,1% DMSO) zeigten sich ähnliche Ergebnisse, wie sie bereits in Abb. 34 und 35, zu beobachten waren. Durch die Zugabe von RA kam es zu einer Verdopplung der Dendritenlänge im Vergleich zu den anderen beiden Kontrollen (Abb. 36). Eine Behandlung der Zellen mit OMS-IgG-Fractionen (OMS-IgG) hatte keine Auswirkung auf

deren dendritische Fortsätze und es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Länge im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 36). Durch die Zugabe von RA kommt es hingegen wieder zu einer Verdopplung in der Länge der Dendriten. Die Werte, resultierend aus einer Inkubation mit Gesund-IgGs (Ko.-IgG) liegen geringfügig höher im Vergleich zu denen mit OMS-IgGs ($p < 0,05$). Die Zugabe von RA führt bei Gesund-IgGs sogar zu einem verstärkten Anstieg der Dendritenlänge (Ko.-IgG/RA, $p < 0,01$, Abb. 36). Mit durchschnittlich $61,5 \mu\text{M}$ Länge sind die Zellfortsätze $20 \mu\text{M}$ länger als bei Zellen nach einer RA-Behandlung ohne IgGs ($10 \mu\text{M}$ RA).

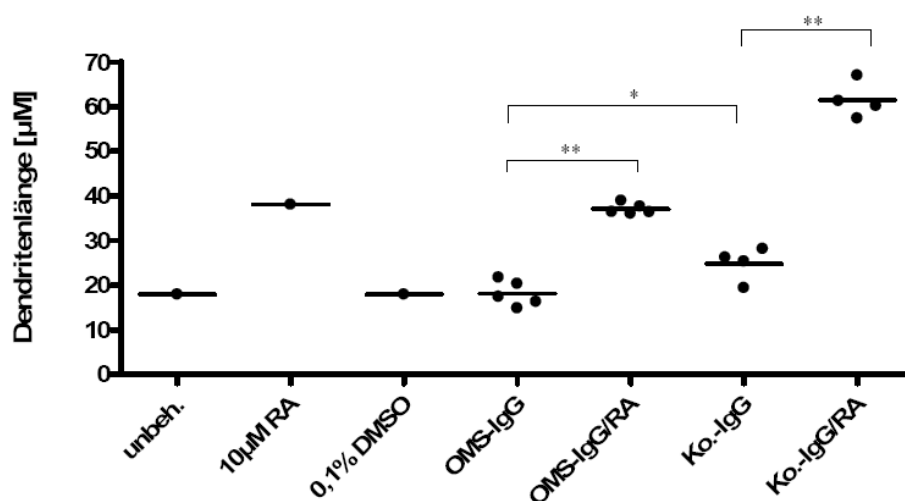


Abb. 36: Ausmessungen der Dendritenlängen bei SH-SY5Y-Zellen nach einer Inkubation mit IgG-Fraktionen. SH-SY5Y-Zellen wurden mit RA und IgG-Fraktionen, isoliert aus OMS-Seren (OMS-IgG) und Kontroll-Seren (Ko.-IgG), inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit RA ($10 \mu\text{M}$ RA) behandelt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen und Zellen behandelt mit 0,1% DMSO. Zwischen einer Behandlung mit OMS-IgG-Fraktionen im Vergleich zu Ko.-IgG-Fraktionen zeichnet sich eine geringe Signifikanz ab ($p < 0,05$). Hingegen führt die zusätzliche Gabe von RA zu einem gesteigerten Dendritenwachstum ($p < 0,01$).

4.4.4 Migrations-Assay mit SH-SY5Y-Zellen

Die Zellmigration, auch Zellbewegung genannt, findet in vielen physiologischen Prozessen unter verschiedenen Bedingungen statt, unter anderem auch bei der Ausbreitung von Tumoren in Form einer Metastasierung. Ob und in welcher Form Neuroblastomzellen invitro die Fähigkeit haben, zu migrieren, war Teil dieser Untersuchungen.

In verschiedenen Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen für dieses Experiment ermittelt. Die Migrations-Membran (Porengröße 5 μm) wurde mit Collagen Typ I in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ beschichtet und in eine *Boyden Chamber* (Migrationskammer) eingebaut. Als chemotaktisches Reagenz für den unteren Teil der Kammer wurde in diesem Fall RPMI-Vollmedium mit 10% FCS verwendet.

SH-SY5Y-Zellen in einer Konzentration von 55.000 Zellen/50 μl sind im Gegensatz zu SKN-SH-Zellen (Abbildung nicht gezeigt) in der Lage, zu migrieren und wurden für diesen Versuch verwendet. Vor dem eigentlichen Migrationsversuch wurden die Zellen für 24 h in einem serumarmen Medium (0,4% FCS) inkubiert. Ähnlich wie im vorangegangenen Versuch, konnte hier die Migration der Zellen durch eine zusätzliche 9 stündige Inkubation mit RA (5 bzw. 10 μM) gesteigert werden (Abb. 37).

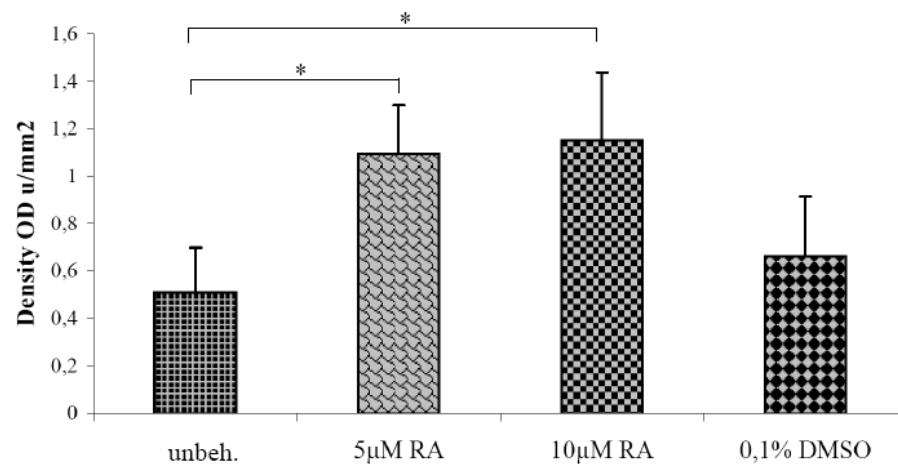


Abb. 37: Densitometrische Auswertung der Migration mit SH-SY5Y-Zellen. SH-SY5Y-Zellen wurden für 24 h in 0,4% FCS-Medium vorinkubiert und für 9 h zusätzlich mit RA behandelt. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte Zellen und Zellen, behandelt mit 0,1% DMSO, verwendet. Das Ergebnis der Migration mittels *Boyden Chamber* wurde densitometrisch ausgewertet. Diese Abbildung gibt die gemittelten Werte der densitometrischen Auswertung der Migrationen an. Durch die Zugabe von RA erhöht sich die Migration der Zellen ($p < 0,05$), im Vergleich zu unbehandelten Zellen und nach einer DMSO-Behandlung ($p > 0,05$).

4.4.5 Migrations-Assay unter dem Einfluss von Autoantikörpern

Funktionsanalysen mit OMS-Autoantikörpern haben ergeben, dass diese Apoptose in Neuroblastomzellen auslösen (Korfei et al. 2005). Eine damit verbundene Einschränkung des Tumorwachstums und einer Metastasierung in Folge einer Einschränkung der

Migration der Tumorzellen erscheint daher möglich. Im folgenden Versuch sollte dies an SH-SY5Y-Zellen untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen behandelt, wie bereits in Punkt 4.4.4 beschrieben und zunächst in 0,4%igem RPMI-Medium vorinkubiert. Zu diesen Ansätzen wurden dann isolierte IgG-Fractionen in einer Konzentration von 100 µg/ml gegeben und das Ganze für 9 h inkubiert. Neben den verwendeten IgG-Fractionen aus 21 OMS-Seren (OMS) wurden IgG-Fractionen aus 13 Kontrollseren gesunder Probanden verwendet (Kontr.). Nach dieser Inkubation wurden die Zellen über Nacht zusätzlich mit RA (10 µM) behandelt (OMS+RA, Kontr.+RA). Der Migrationsversuch wurde mit 55.000 Zellen/50 µl durchgeführt und erfolgte mit Hilfe einer *Boyden Chamber* für 6 h im Brutschrank.

Die densitometrische Auswertung der Migrationspunkte zeigte keinen hemmenden Einfluß von Autoantikörpern auf die Migration der Zellen (Abb. 38). Die Zellmigration, nach einer Behandlung mit OMS-IgGs (OMS), war genauso hoch, wie die nach einer zusätzlichen RA-Behandlung (OMS+RA). Gleiche Resultate zeigten sich nach einer Inkubation mit Kontroll-IgGs (Kontr.) (Abb. 38). Die zusätzliche Gabe von RA hatte keinen steigernden Effekt auf die Migration der Zellen im Vergleich zu einer reinen IgG-Behandlung (Abb. 38).

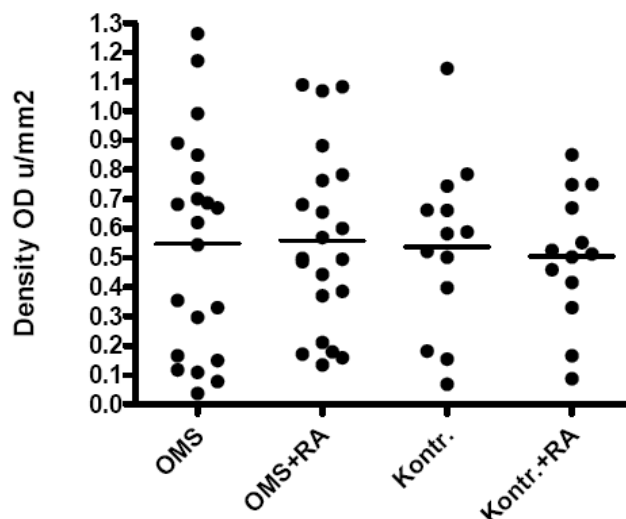


Abb. 38: Densitometrische Auswertung des Migrations-Assays mit SH-SY5Y-Zellen. SH-SY5Y-Zellen wurden in einer Konzentration von 55.000 Zellen/50 µl in 0,4%igem RPMI-Medium vorinkubiert und mit OMS-IgG-Fractionen (OMS) und Kontroll-IgGs behandelt (Kontr.). Nach 9 h Inkubation folgte eine zusätzliche RA-Behandlung. Der eigentliche Migrationsversuch wurde in einer Boyden-Chamber mit Hilfe einer Migrationsmembran (Porengröße 5 µm) durchgeführt. Die Membran wurde im Anschluss an den Versuch gefärbt und densitometrisch ausgewertet (OD u/mm²). Ein Vergleich aller Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Migration der Zellen ($p > 0,05$).

4.5 Screening einer cDNA-Bank mit OMS-Seren

Eine alternative Methode zu den 2D-Gelen, für die Identifizierung neuer Antigene, stellt das *Screening* einer cDNA-Bank dar. Auch als cDNA-Bibliothek bezeichnet, enthält diese eine Sammlung verschiedener cDNAs aus einem Gewebe, im speziellen Gehirngewebe. Aus insgesamt 24 Gehirnen männlicher und weiblicher verstorbener Personen wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Die cDNA wurde in den Vektor pTriplEx2 kloniert, welcher flankiert durch loxP-Sequenzen in ein λ Phagen genom integriert wurde. Der daraus resultierende Vektor λ TriplEx2 enthält für die Expression verschiedener Proteine zwei Ribosomenbindestellen (RBS-ATG_{ompA}, RBS-ATG_{lacZ}), durch welche die Sequenz in zwei Leserahmen abgelesen werden kann (Abb. 39). Zusätzlich ist eine sogenannte *slip site* in Form einer (dT)₁₃-Verlängerung in den Vektor integriert. Diese kann zu einem Verrutschen des Ribosoms und somit zu einer Verschiebung im Leseraster führen. Mit dieser Form des Vektors λ TriplEx2 verdreifacht sich die Anzahl der Identifizierung möglicher positiver Klone und somit auch positiver Plaques. Die Klonierung und Integration in das Phagen genom wurde von der Firma clontech durchgeführt.

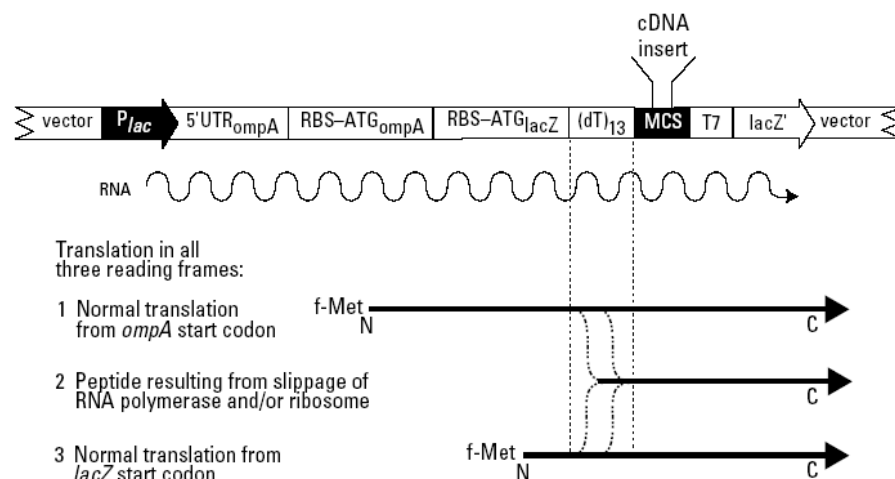


Abb. 39: Schematische Darstellung eines rekombinanten λ TriplEx Klon.

Das Plasmid λ TriplEx2 enthält zwei RBS in verschiedenen Leserahmen, RBS-ATG_{ompA} und RBS-ATG_{lacZ}. Eine Erweiterung des Vektors durch eine dT₁₃ *slip site* kann zu einem Verrutschen des Ribosoms führen und somit zu einer Leserahmenverschiebung, was die Möglichkeit, einen positiven Plaque zu identifizieren, erhöht.

4.5.1 Herstellung von Masterplatten

Im ersten Schritt wurden mit Hilfe des Phagen-Lysates und dem *E. coli*-Stamm XL-1 Blue Masterplatten hergestellt. Über eine Titerbestimmung wurde die Konzentration des Lysates bestimmt und betrug 30^9 pfu/ml. Ausgehend von dieser Konzentration wurden für die Masterplatten 2×10^4 pfu/ml berechnet. Aus einer 1:10.000 Verdünnung des Phagenlysates wurden 0,6 µl pro Platte eingesetzt.

Die Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes XL1-Blue wurde in 10 mM MgSO₄ resuspendiert, mit dem Phagenlysate gemischt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Phagen/Bakteriensuspension mit Soft-top Agar gemischt und schnell auf einer gut getrockneten LB/MgSO₄-Platte verteilt. Durch eine folgende Inkubation bei 42°C konnten sich die Phagen vermehren und wurden nach einer Lyse der *E. coli*-Zellen als Plaques auf der Platte sichtbar. Eine Inkubation bei 42°C für 6 h stellte sich als optimal heraus und wurde für weitere Platten übernommen.

Eine Expression der Proteine wurde durch die Zugabe von IPTG induziert. Dafür wurde eine runde Nitrozellulose-Membran (Ø 132 mm) in einer 10 mM IPTG-Lösung angefeuchtet und vorsichtig auf die LB-Platte gelegt. Die Platte wurde danach für weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran vorsichtig von der Platte genommen und in TBS-T überführt. Sie stellt einen Negativabdruck der Plaqueplatte dar. Die Masterplatte wurde im Anschluss daran für die Herstellung einer zweiten Membran verwendet.

Die mehrfach in TBS-T gewaschene Membran wurde wie eine *Western Blot* Membran weiterbehandelt. Als *Primär*-Antikörper wurde OMS-Serum bzw. Gesundserum in einer Verdünnung von 1:200, in einer 5%igen Milchlösung, eingesetzt. Proteine, welche durch Antikörper aus dem Serum der OMS-Patienten und der Kontrollen erkannt wurden, konnten über einen HRP-gekoppelten anti-human Antikörper detektiert werden (Abb. 40).

In Abb. 40 sind die *Blot*-Membranen von Masterplatte 14 exemplarisch dargestellt. Die auf der linken Seite gezeigte Membran wurde mit OMS-Serum (Patient1, siehe Anhang Tabelle I) inkubiert, für die rechte Membran wurde Gesund-Serum verwendet. Auf beiden Membranen konnten viele positive Signale nachgewiesen werden, was sich in einem gleichen Muster in der Verteilung der Spots zeigt und zur Verdeutlichung für zwei gleiche Bereiche auf den Membranen durch einen Kasten markiert und hervorgehoben ist (Abb. 40). Mögliche OMS-Antigene allerdings sind nur auf der Membran,

inkubiert mit OMS-Serum, sichtbar, im Vergleich zur 2. Membran (in orange farbigen Kreisen markiert).

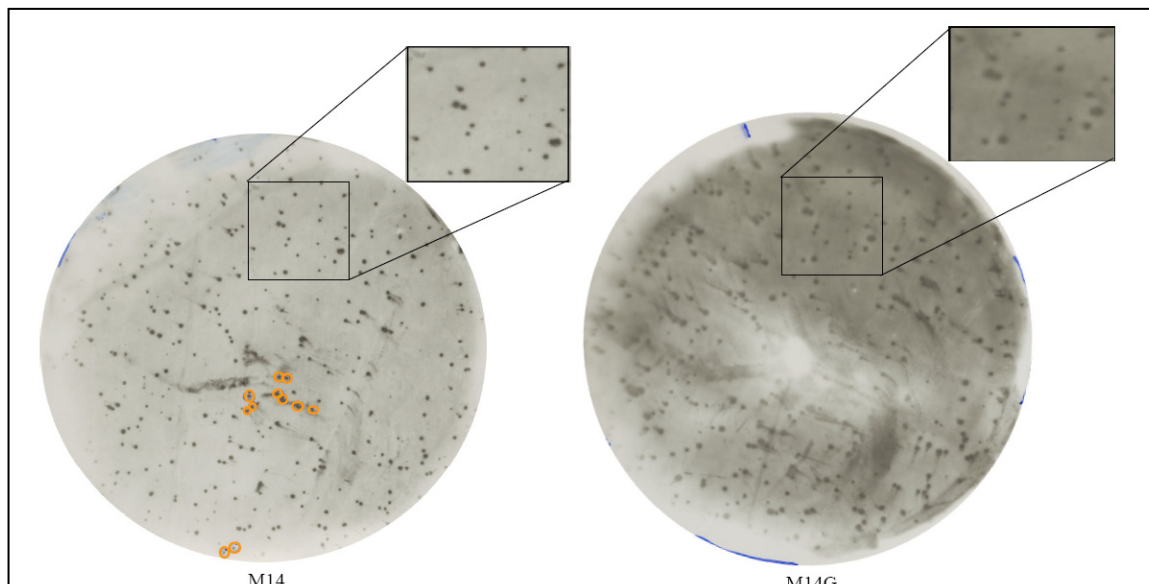


Abb. 40: Western Blot Analysen von Masterplatte 14 (M14). Von der mit Hilfe des Phagenlysates und des *E.coli*-Stammes XL1-1 Blue hergestellten Masterplatte wurden zwei Negativabdrücke mit Nitrocellulose-Membranen gemacht. Die linke Membran wurde mit OMS-Serum (Pat.1), 1:200 verdünnt, inkubiert. Auf der rechten Seite wurde eine Mischung aus 5 Seren gesunder Probanden als Kontrolle verwendet. Die Detektion der durch Serum-Antikörper erkannten Proteine erfolgte mit dem *Sekundär*-Antikörper anti-Human-HRP. Neben vielen auf beiden Membranen vorliegenden Spots (schwarzer Kasten) konnten einige nur auf der linken Membran, inkubiert mit OMS-Serum, detektiert werden (orange farbene Kreise).

Mit Hilfe der Membran konnten so im Folgenden positive Plaques auf der Masterplatte identifiziert werden. Insgesamt wurden von dieser Platte 19 Plaques isoliert, welche nur durch das verwendete OMS-Serum, aber nicht durch die Kontrollen identifiziert wurden. Die isolierten Phagen wurden in 500 μ l 1 x λ Dilution buffer überführt. Basierend auf diesem Protokoll wurden insgesamt 33 Masterplatten hergestellt und entsprechend analysiert.

4.5.2 Herstellung von Plaque-Platten

Bei den von der Masterplatte isolierten Plaques besteht die Möglichkeit, dass es sich nicht nur um einen einzelnen handelt, eine Überlagerung positiver Plaques ist möglich. Aus diesem Grund werden die von der Masterplatte isolierten Phagenlysate zur Verein-

zelung erneut auf LB/MgSO₄-Platten ausplattiert und nach dem gleichem Protokoll, wie bei den Masterplatten, behandelt. Dafür wird je 1 µl des Lysates, resultierend aus dem isolierten Plaque (500 µl), verwendet.

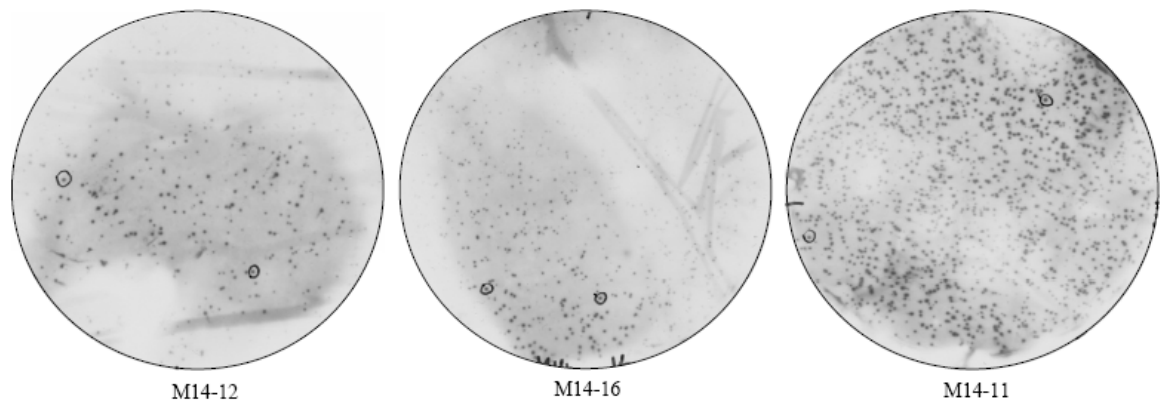


Abb. 41: Western Blot Analyse der von Masterplatte 14 zur Vereinzelung isolierten Plaques. Die Abbildung zeigt exemplarisch die *Western Blot* Analyse für 3/19 isolierten und neu ausplattierten Plaques unter Verwendung von OMS-Serum von Patient 1 (OMS⁺/NB⁺). Die Detektion der durch Serum-Antikörper erkannten Proteine fand unter Verwendung des Antikörpers anti-Human-HRP statt.

Abb. 41 zeigt exemplarisch 3 der 19 Membranen, resultierend aus den erneut ausplattierten Phagen. Mit Hilfe des verwendeten OMS-Serums (Patient 1, siehe Anhang Tabelle I) konnte eine große Anzahl positiver Plaques detektiert werden. Von jeder Platte wurden 2 positive Plaques isoliert (schwarz eingekreist), welche nur nach einer Inkubation mit OMS-Seren sichtbar waren, nicht aber bei den Kontrollen (Abbildung nicht gezeigt). Die Plaques wurden in 350 µl 1 x λ Dilution buffer überführt.

Insgesamt wurden auf diesem Weg ausgehend von den verschiedenen Masterplatten 90 kleine Membranen (Ø 82 mm) hergestellt und mit OMS-Serum, aber auch Serum gesunder Kontrollen inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Phagenlysate verwendet, bei welchem die Sequenz für das humane β_2 -Mikroglobulin in den Vektor λ TriplEx2 kloniert wurde (Abbildung nicht gezeigt). Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines anti-human β_2 -Mikroglobulin-Antikörpers. Als Negativkontrolle wurde eine Membran mit dem *Sekundär*-Antikörper inkubiert ohne einen *Primär*-Antikörper. Erwartungsgemäß konnte für diese Kontrolle kein Signal beobachtet werden (Abbildung nicht gezeigt).

4.5.3 Umwandlung von λ TriplEx2-Klonen in pTriplEx2-Klone

Eine genauere Analyse isolierter Plaques sollte Aufschluss über die exprimierten Proteinsequenzen geben. Dafür musste das in das Phagengenom eingelassene Plasmid pTriplEx2 mit der enthaltenen cDNA-Sequenz aus dem Phagen isoliert werden. Wie bereits beschrieben ist das Plasmid im Phagengenom durch zwei loxP-*sites* flankiert. Der für diesen Teilversuch verwendete *E. coli*-Stamm BM25.8 exprimiert die Rekombinase cre, welche spezifisch die loxP-*sites* erkennt und das Plasmid aus dem Wirtsgenom schneidet. Das so isolierte Plasmid kann für weitere Untersuchungen verwendet werden. Die Freisetzung des Plasmids wurde nach in Punkt 3.2.6 angegebenem Protokoll durchgeführt.

4.5.4 Kolonie-PCR mit positiven pTriplEx2-Klonen

Nach der Rezirkularisierung zu Plasmiden und einer Expression durch den *E. coli*-Wirtstamm waren positive Klone auf der LB/Carb-Platte sichtbar. Für den Nachweis des Plasmids pTriplEx2 mit einer enthaltenen cDNA-Sequenz wurden mehrere Klone einer Platte über einen PCR-Schnelltest unter Verwendung der für den Vektor spezifischen Primer 5' Sequencing primer und 3' Sequencing primer, welche die klonierte Sequenz flankieren, analysiert. Die resultierenden Fragmentgrößen der PCR liegen nach den Angaben des Herstellers in einem Bereich von ≥ 2000 bp, können aber nicht in Form einer erwarteten Größe angegeben werden, weil sie abhängig von der Länge der klonierten cDNA sind.

In Abb. 42 ist exemplarisch die Analyse von 13 getesteten Klonen dargestellt. Neben falsch positiven Klonen, ohne ein sichtbares Fragment auf dem Gel, konnten auch echt positive Klone identifiziert werden. Im Bereich von 900 bp ist bei Klon 1 und 2 eine Bande sichtbar. Bei den Klonen 9 – 13 zeigt sich eine Bande im Bereich von 2200 bp und für Klon 4 ist eine schwache Bande im Bereich von 5000 bp zu erkennen (durch Kästchen markiert, Abb. 42). Über eine solche Kolonie-PCR unter Verwendung der angegebenen Primer wurden insgesamt mehr als 300 Klone getestet.

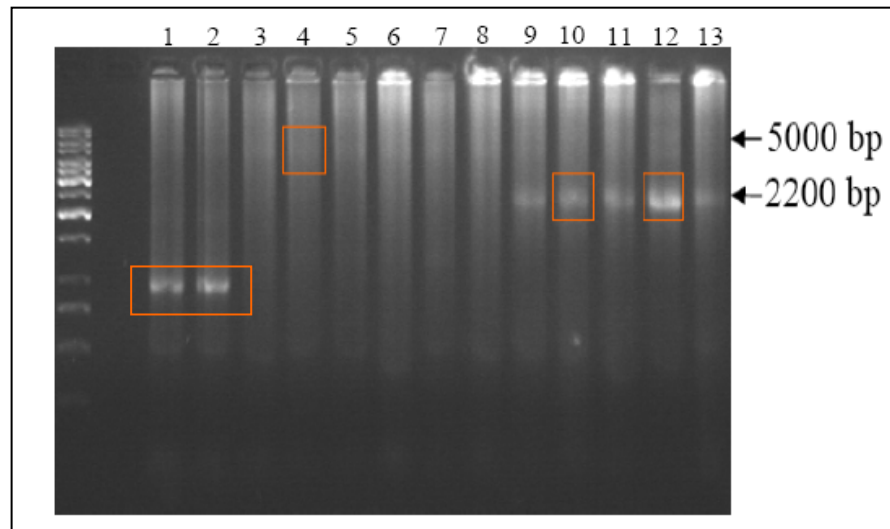


Abb. 42: 1%iges Agarosegel mit der Analyse einer Kolonie-PCR

pTriplEx2-Klone wurden über eine Kolonie-PCR mit den für den Vektor spezifischen Primern 5`Sequencing primer und 3`Sequencing primer untersucht und über ein 1%iges Agarosegel analysiert. Neben falsch positiven Klonen sind echt positive Klone mit einem enthaltenen Fragment durch ein rotes Kästchen markiert.

Von den als positiv identifizierten Klonen wurden Flüssigkulturen angelegt, um anschließend die Plasmid-DNA zu isolieren. Dabei stellte sich heraus, daß das im Protokoll empfohlene Antibiotikum Carbenicillin nicht besonders gut geeignet war. Alternativ mit besser wachsenden Kulturen wurde Ampicillin verwendet.

4.5.5 Restriktionsverdau mit isolierten Plasmiden

Mit den isolierten Plasmiden aus den Klonen 2, 4, 10 und 12 (Abb. 42) wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *Sfi*I durchgeführt. Die Schnittstellen für das Enzym wurden bei der Klonierung der cDNA in λ TriplEx2 an das Fragment amplifiziert. Das Enzym *Sfi*I schneidet dabei nur zweimal im Plasmid.

Neben dem unverdauten Plasmid ist jeweils der Verdau mit dem Enzym *Sfi*I zu sehen (Abb. 43). Für die Klone 4, 10 und 12 bestätigt sich das Ergebnis der Kolonie-PCR und zeigt die identifizierten Fragmentgrößen. Neben der erwarteten 3500 bp großen Vektorbande zeigte sich ein Fragment, das der inserierten cDNA Sequenz entspricht und zur Identifizierung sequenziert werden kann. Für Klon 2 sind nach dem Verdau mehrere kleinere und größere Nebenprodukte erkennbar und kein Hauptfragment, weshalb dieser Klon nicht weiter verwendet wurde.

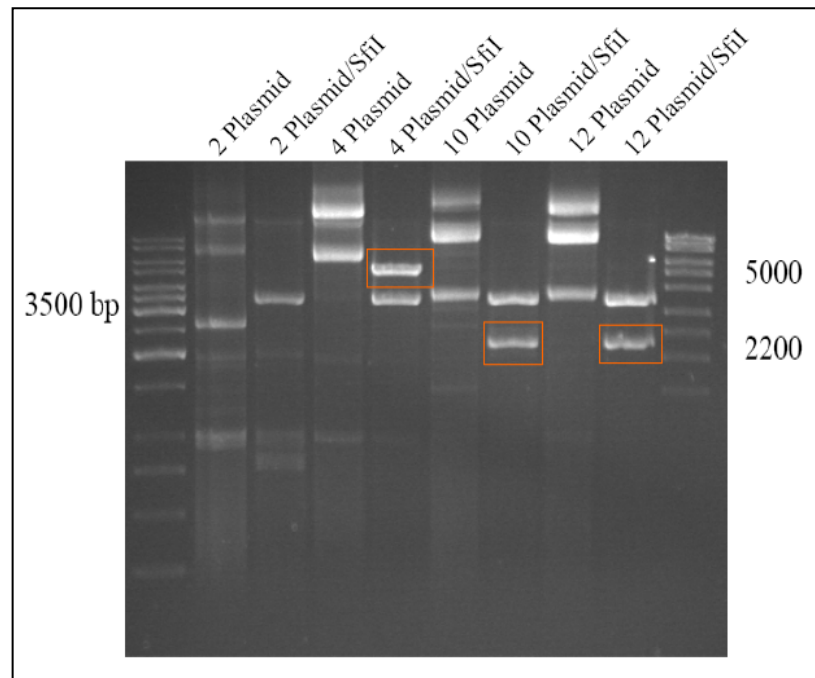


Abb. 43: 1%iges Agarosegel mit der Analyse des Restriktionsverdaus positiver pTripl-Ex2-Klone. Aus im PCR-Schnelltest als positiv auf das Vorhandensein eines Fragmentes identifizierten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit dem Enzym *Sfi*I geschnitten. Neben den unverdauten Plasmiden ist jeweils der Restriktionsverdau mit *Sfi*I abgebildet und zeigt neben der Vektorbande von 3500 bp ein Fragment, welches der inserierten cDNA entspricht (durch einen roten Kasten gekennzeichnet).

4.5.6 Identifizierte Proteine

Gab es eine Übereinstimmung in den Ergebnissen der Kolonie-PCR und dem Restriktionsverdau, wurden die Plasmide zur Identifizierung der inserierten cDNA sequenziert (*GATC-Sequenzierung*). Dafür wurden die Primer T7 und TriplEx5`LD verwendet, wodurch das klonierte Fragment von beiden Seiten analysiert werden konnte. In den meisten Fällen war aber die Verwendung des T7-Primers ausreichend, um eine Sequenz zu erhalten.

Die erhaltenen Sequenzen wurden über eine Datenbanksuche (NCBI) analysiert. Oft konnte die Sequenz nicht eindeutig einem Protein zugeordnet werden. Es wurden aber auch 6 spezifische Proteine identifiziert, aufgelistet in Tabelle 8. Als Positivkontrolle wurde β_2 -Mikroglobulin eingesetzt und die Sequenz durch eine Sequenzierung bestätigt. Bei den neu identifizierten Proteinen handelte es sich zum Beispiel um den GABA-A-Rezeptor, welcher als wichtigster inhibitorischer Rezeptor im Zentralnervensystem funktioniert und besondere Funktionen im Kleinhirn ausübt. Weiterhin wurde die alpha2-Untereinheit des Na-Kanals identifiziert, welcher spannungsabhängig eine wichtige

Rolle bei der Bildung von Aktionspotentialen in Neuronen spielt. Interessant ist auch das Protein RHD11, welches, wie das bereits als Antigen im OMS identifizierte Protein RALDH1, an der Synthese von Retinolsäure beteiligt. Zusätzlich wurden die Proteine NFYB, SCD und ALS2 identifiziert, deren Funktion der unten stehenden Tabelle zu entnehmen ist.

Tabelle 8: Identifizierte Proteine nach dem *Screenen* der cDNA-Bank

Identifiziertes Protein	Bemerkung
β_2 -Mikroglobulin	kleine lösliche UE von MHC I, nicht membranverankert
NFYB	Untereinheit eines Transkriptionsfaktors, bindet spezifisch Sequenz CCAAT in der Promotor-Region verschiedener Gene
SCD	Enzym, beteiligt an der Synthese ungesättigter Fettsäuren
ALS2	beteiligt an Rac1-aktivierter Endozytose, Mutationen im ALS2-Gen bei Erkrankungen der Motoneuronen
GABA-A-Rezeptor Alpha1	Homo sapiens gamma aminobutyric acid (GABA) A receptor alpha1: Liganden-abhängiger Chlorid-Kanal, GABA als Ligand ist ein inhibitorischer Neurotransmitter
Na-Kanal (<i>voltage gated type II, alpha 2</i>)	spannungsabhängiger Kanal, verantwortlich für Aktionspotentiale in Neuronen und Muskeln
RHD11	Retinol-dehydrogenase 11, katalysiert Oxidation von cis-Retinol zu Retinal, an Synthese von RA beteiligt

4.5.7 Positive Plaques gespottet

Bei den mit Hilfe von einem OMS-Serum identifizierten Antigenen kann keine Aussage über deren tatsächliche Funktion als Autoantigen im OMS getroffen werden. Aus diesem Grund müssen Untersuchungen mit mehreren OMS-Seren und entsprechenden Kontrollen durchgeführt werden. Als problematisch erwies sich dabei die Untersuchung positiv identifizierter Plaques mit mehreren OMS-Seren.

Positiv identifizierte Phagenlysate (2 μ l) wurden, ohne die Konzentration der Lysate genau zu bestimmen, auf LB/MgSO₄ Platten gespottet, welche zuvor mit den *E. coli* Zellen XL1 Blue überschichtet worden waren. Nach ca. 9 h Inkubation bei 42°C waren für die einzelnen Lysate Plaques sichtbar. Dabei waren einige Plaques abhängig von der Phagenkonzentration weniger stark als andere (Abb. 44).

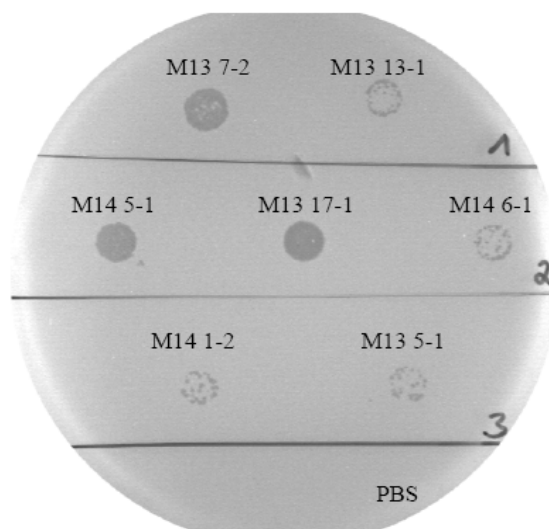


Abb. 44: LB/MgSO₄-Platte mit gespotteten positiven Phagenlysaten

Sieben isolierte, positive Phagenlysate von den Masterplatten M13 und M14 (2 µl) wurden auf zuvor mit *E. coli*-Zellen überschichtete LB-Platten gespottet. Nach einer Inkubation der Platten bei 42°C für 9 h waren Plaques, verschieden konzentriert, sichtbar. PBS wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Die Platten wurden im Anschluss daran mit verschiedenen Membranen, getränkt in IPTG, inkubiert. Unter Verwendung von 7 OMS-Seren und 7 Kontrollseren wurden positive Plaques detektiert. Tabelle 9 zeigt exemplarisch die Auswertung der Membranen für den GABA-Rezeptor und die Untereinheit des Na-Kanals. Wurde das Protein durch das Serum erkannt, konnte dies mit einem + gekennzeichnet werden, ein fehlendes Signal wurde mit einem – in die Tabelle markiert.

Die Auswertung macht deutlich, dass eine Überprüfung mehrere Seren auf Antikörper gegen die Proteine in dieser Form nicht möglich ist. Für die Untereinheit des Na-Kanals zeigte sich kein Unterschied in der Inkubation mit OMS-Seren oder Gesund-Seren. Genau wie OMS-Seren reagierte auch eine hohe Anzahl der Kontrollseren positiv mit den durch Lyse freigesetzten Proteinen. Als vielversprechender erwies sich das Ergebnis für den GABA-Rezeptor, der von 5/7 der getesteten OMS-Seren, aber nur 1/7 Kontrollen erkannt wurde (Tabelle 9). Für die Überprüfung weiterer Patienten ist es aber unabdingbar, die identifizierten Proteine rekombinant herzustellen und zunächst über *Line blots* zu testen. Dies war jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeitlich nicht mehr möglich.

Tabelle 9: Auswertung der gespotteten Phagenlysate exemplarisch für zwei Proteine dargestellt. Die Membranen wurden dafür mit Seren 7 gesunder Probanden (G) sowie 7 OMS-Seren (K) inkubiert. Eine positive Reaktion mit den durch Lyse freigesetzten Proteinen wurde mit einem + gekennzeichnet, negative durch ein -.

Plaque	M13 13-1 GABA-Rezeptor	M14 1-2 Na-Kanal
1-K	+	-
2-K	+	+
3-K	+	+
4-K	+	+
5-K	-	-
6-K	-	+
7-K	+	+
8-G	-	-
9-G	-	-
10-G	-	-
11-G	-	+
12-G	-	+
13-G	+	+
14-G	-	+

5. Diskussion

5.1 OMS als Autoimmunkrankheit

Das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS) kann als seltene, neurologische Erkrankung sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen beobachtet werden. Neben einer idiopathischen Form kann OMS durch Infektionen oder Toxine ausgelöst werden (Cohen and Cohen 1974; Blain et al. 1982; Posner and Furneaux 1990; Bataller et al. 2003; Darnell and Posner 2003). Als paraneoplastisches Syndrom (PNS) ist ein OMS aber in ca. 50% der Fälle mit einer Tumorerkrankung assoziiert (Pranzatelli 1996). Einem bei Kindern diagnostizierten OMS liegt fast immer ein Neuroblastom zugrunde (Bray et al. 1969; Altman and Baehner 1976; Pranzatelli 1996; Rudnick et al. 2001). Erwachsene OMS-Patienten haben im Vergleich dazu häufig kleinzellige Lungenkarzinome oder Brustkrebs (Pranzatelli 1996; Bataller et al. 2003).

Auf Grund der begleitenden Symptome sowie pathologischer und neurophysiologischer Untersuchungen werden Schädigungen im Bereich des Kleinhirns als Ursache eines Opsoklonus vermutet (Tuchman et al. 1989). Darüber hinaus geben verschiedene Beobachtungen und labortechnische Untersuchungen von Patientenproben Hinweise darauf, dass OMS Folge einer Autoimmunreaktion ist (Stefansson et al. 1985; Cooper et al. 2001; Darnell and Posner 2003). Tumore im Zusammenhang mit einem OMS sind oft klein und begrenzt (Altman and Baehner 1976). Beobachtete immunologische Veränderungen im Serum und Liquor betroffener Patienten deuten auf eine Antitumorimmunreaktion hin. Dies zeigt sich auch in der Aussage, dass OMS-Patienten mit einem assoziierten Neuroblastom im Bezug auf die Tumorerkrankung eine bessere Prognose haben, im Vergleich zu Patienten mit einem Neuroblastom ohne ein begleitendes Syndrom (Altman and Baehner 1976). Möglicherweise ist eine Immunreaktion gegen den Tumor Grund für diese positive Prognose. Die primär gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion kann aber sekundär in das Nervensystem generalisieren und zu pathologischen Auswirkungen führen (Pranzatelli 1996).

Eine paraneoplastische OMS-Erkrankung bei Erwachsenen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Folge einer kreuzreagierenden Autoimmunreaktion zwischen dem Tumor und neuronalen Antigenen, nachweisbar durch kreuzreaktive Autoantikörper. Im Serum betroffener kindlicher OMS-Patienten konnten ebenfalls Autoantikörper gegen neuronale Strukturen nachgewiesen werden (Connolly et al. 1997; Greenlee et al. 2001; Pranzatelli et al. 2002). Proteine, deren Expression in einem gesunden Organismus auf

neuronale Zellen beschränkt ist, werden auch im Tumorgewebe exprimiert und als onconeuronale Antigene bezeichnet (Darnell 1996). Eine Immunreaktion gegen den Tumor richtet sich also auch gegen gleiche Proteine in neuronalen Zellen und führt so zu Entzündungsprozessen im Gehirn betroffener Patienten (Darnell and Posner 2003). Bei erwachsenen OMS-Patienten wurden bis heute verschiedene kreuzreaktive Autoantikörper nachgewiesen, welche einen Hinweis auf den zugrundeliegenden Tumor geben. Anti-Hu Antikörper sind zum Beispiel mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom assoziiert (Dalmau et al. 1990). Brustkrebspatienten haben Anti-Ri-Antikörper in ihrem Blut und Anti-Yo-Antikörper können bei Patienten mit Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden (Anderson et al. 1988; Furneaux et al. 1990b; Hammack et al. 1990; Luque et al. 1991).

Kreuzreaktive Antikörper werden auch als Grundlage für die Pathogenese bei einem kindlichen OMS angenommen (Abb. 45). Immunologische Veränderungen im Liquor sowie der Nachweis von Anti-Hu-Antikörpern beim kindlichen OMS stützen diese Annahme (Fisher et al. 1994; Korfei et al. 2005). Bis heute konnte aber kein gemeinsames Antigen identifiziert und charakterisiert werden. Basierend auf diesen Informationen standen die Identifizierung und Charakterisierung neuer Autoantigene sowie mögliche funktionelle Effekte ermittelter Autoantikörper im Mittelpunkt der Untersuchungen.

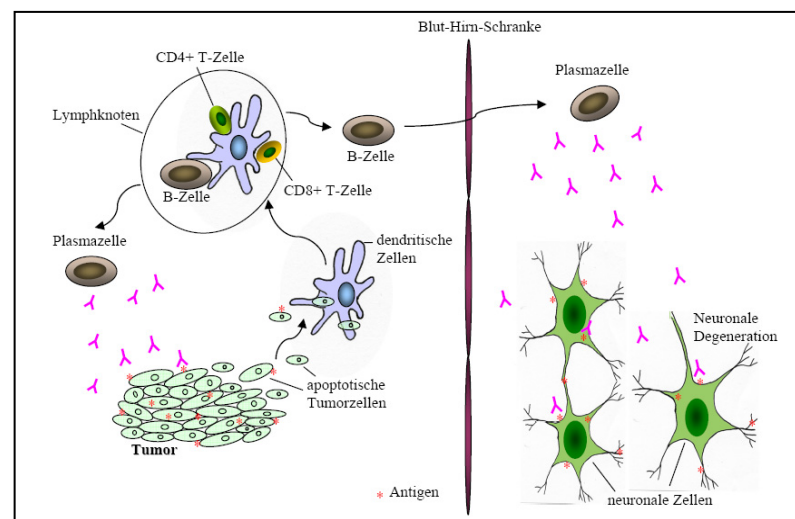


Abb. 45: Schematische Darstellung einer möglichen Pathogenese beim kindlichen Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom. Apoptotische Tumorzellen werden von Dendritischen Zellen aufgenommen, welche daraufhin in periphere Lymphknoten migrieren. Eine dort ausgelöste adaptive Immunantwort hat unter anderem die Reifung von B-Zellen in Plasmazellen zur Folge. Von Plasmazellen synthetisierte Antikörper reagieren mit Tumorantigenen und grenzen das Wachstum des Tumors ein. Diese Antikörper reagieren aber auch mit gleichen Antigenen auf/in neuronalen Zellen und führen zu Schädigungen neuronaler Zellen im Bereich des Kleinhirns.

5.2 Identifizierung neuer Autoantikörper beim OMS

Bisher konnten beim kindlichen OMS nur wenige Autoantikörper überhaupt identifiziert werden und deren Vorkommen war meist nur auf einzelne Patienten beschränkt. Daher stand im ersten Teil dieser Studie die Identifizierung neuer Antigene mittels Proteomanalyse im Zentrum der Untersuchungen. Eine dieser Arbeit vorangegangene 2D-*Western Blot* Analyse mit Proteinextrakt aus Neuroblastomzellen wurde unter Verwendung von 4 OMS-Seren durchgeführt (M. Korfei). Mit Hilfe der darin enthaltenen Autoantikörper und einer anschließenden MALDI-TOF Analyse konnten neben HuD 12 weitere Antigene identifiziert werden, darunter auch α -Enolase und KSRP (Kirsten et al. 2007). *Western-Blot* Voruntersuchungen zeigten bei neun OMS-Patienten eine Reaktivität im Bereich von 55 kDa und deuteten bereits auf α -Enolase als potentiell Antigen in OMS hin (Dissertation, (Fühlhuber 2007)). Das Protein α -Enolase wurde durch 3/4 OMS-Patienten auf 2D-Ebene erkannt und im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht.

Darüber hinaus wurde auf Grund der Annahme kreuzreaktiver Antikörper eine weitere 2D-Analyse mit Kleinhirn als Antigenquelle durchgeführt. Seren von 4 kindlichen OMS-Patienten assoziiert mit einem Neuroblastom wurden auf Autoantikörper gegen neuronale Proteine hin untersucht. Die Verwendung von Serum für die *Western-Blot* Analyse erschwerte, auf Grund zu starker Hintergrundentwicklung, in einigen Fällen oft die genaue Zuordnung positiver Spots. Aus diesem Grund wurden pro Patient zwei *Blot*-Membranen verwendet. Zeigte sich für beide Inkubationen eine positive Reaktion in Bezug auf ein Protein, wurde es als potentiell Antigen angesehen. Bei den meisten der 78 identifizierten Proteine handelte es sich um verschiedene metabolische Enzyme (Triosephosphat, ATP-Synthase), Zellstrukturproteine (Aktin, Zytokeratin 10) und Transkriptionsregulatoren (Protein DJ-1). Sie wurden von einem oder nur zwei Patienten erkannt, stellten in dem Zusammenhang keine potentiell gemeinsamen Autoantigene im OMS dar und wurden nicht weiter untersucht. In der Liste identifizierter Proteine befand sich auch α -Enolase. Für α -Enolase und ein weiteres Protein RALDH1 wurde eine Reaktivität bei allen vier OMS-Patienten beobachtet (Spot 26 und 22/23, siehe Anhang Tabelle V). Die nachgewiesene Bindung autoreaktiver Antikörper an α -Enolase und RALDH1 sowohl in Neuroblastomzellen als auch in humanem Kleinhirn bestätigte damit die Annahme kreuzreaktiver Autoantikörper im OMS.

Zusammenfassend konnten also mittels 2D-Analyse zwei Kandidaten-Antigene identifiziert werden: α -Enolase und RALDH1, über deren pathogene Rolle beim OMS im Weiteren diskutiert wird.

5.2.1 α -Enolase als Autoantigen

Als zytoplasmatisches Protein ist α -Enolase ein Enzym der Glykolyse und katalysiert die Dehydratation von 2-Phospho-D-Glycerat (PGA) zu Phosphoenolpyruvat (PEP) in katabolischer Richtung (Pancholi 2001; Piast et al. 2005). In Vertebraten liegt Enolase hoch konserviert in drei Isoformen vor: α -Enolase ist ubiquitär vorhanden (auch *non-neuronal-enolase*, NNE); β -Enolase kann nur in Muskelgewebe detektiert werden und die Expression von γ -Enolase ist auf neuronale Zellen begrenzt (auch *neuron-specific-enolase*, NSE) (Marangos et al. 1978; Pancholi 2001; Piast et al. 2005).

Die Untersuchung weiterer OMS-Seren mittels 1D-*Western Blot* Analyse hat ergeben, dass Autoantikörper gegen α -Enolase im Serum von 22,6% der OMS-Patienten identifiziert werden konnten. Auffällig dabei war, dass bei den meisten der α -Enolase positiv getesteten Seren OMS assoziiert mit einem Neuroblastom vorlag. In nur zwei Fällen wurden Autoantikörper bei OMS-Patienten ohne eine begleitende Tumorerkrankung identifiziert. Damit bestätigt sich einmal mehr die Hypothese kreuzreaktiver Autoantikörper in der Pathogenese eines OMS. Kreuzreaktive Antikörper gegen das glykolytische Protein wurden aber auch im Zusammenhang mit anderen paraneoplastischen Autoimmunerkrankungen und Autoimmunerkrankungen ohne einen zugrundeliegenden Tumor beschrieben. So wurden bei Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses (SLE), systemischer Sklerose (SSc) und rheumatoider Arthritis (RA) anti- α -Enolase-Antikörper identifiziert (Pratesi et al. 2000; Kemp et al. 2002; Mosca et al. 2006). Ihre klinische Relevanz im Zusammenhang mit diesen Krankheitsbildern ist jedoch noch nicht bekannt (Pratesi et al. 2000; Mosca et al. 2006). Bei Hashimoto-Enzephalopathien und Hashimoto-Thyroiditis konnten ebenfalls Autoantikörper gegen α -Enolase nachgewiesen werden. Dabei binden Autoantikörper von Patienten mit Hashimoto's Enzephalopathien ein anderes antigenes Epitop im N-terminalen Bereich des Proteins, wodurch diese Autoantikörper ein hilfreicher diagnostischer Marker sein können (Ochi et al. 2002; Fujii et al. 2005). Autoimmune und paraneoplastische Retinopathien sowie eine autoimmune Hepatitis wurden auch im Zusammenhang mit Autoan-

tikörpern gegen α -Enolase beschrieben (Adamus et al. 1998; Bogdanos et al. 2004; Dot et al. 2005; Weleber et al. 2005; Magrys et al. 2007).

In einer weiteren Analyse konnte nachgewiesen werden, dass Autoantikörper in OMS-Seren spezifisch gegen α -Enolase gerichtet sind. Eine Bindung an die neuronal spezifische γ -Enolase konnte für kein OMS-Serum beobachtet werden. Diese Spezifität gegen α -Enolase zeigte sich auch bei anti- α -Enolase-Antikörper im Serum von Patienten mit SLE, SSc und RA (Pratesi et al. 2000).

Allgemein sind OMS-Autoantikörper sowohl gegen intrazelluläre Antigene als auch gegen Oberflächenstrukturen von Neuroblastom- und Kleinhirnzellen gerichtet (Blaes et al. 2005; Korfei et al. 2005). Neben seiner enzymatischen Funktion wird α -Enolase auch auf der Oberfläche verschiedener eukaryotischer Zellen exprimiert, wie hämatopoetischen Zellen (Neutrophile, B- und T-Zellen, Monozyten), endothelialen und epithelialen Zellen sowie neuronalen Zellen und Krebszellen (Miles et al. 1991; Dudani et al. 1993; Nakajima et al. 1994; Pancholi and Fischetti 1998; Pancholi 2001; Dale et al. 2006). Als Oberflächenprotein hat α -Enolase verschiedene Funktionen. Zum Einen wirkt es als starker Plasminogenrezeptor (Miles et al. 1991; Dudani et al. 1993; Nakajima et al. 1994; Pancholi and Fischetti 1998). Plasminogen als Schlüsselenzym des fibrinolytischen Systems kann, aktiviert, auf der Zelloberfläche eine Kaskade an Proteaseaktivitäten auslösen und hat so Auswirkung auf physiologische und pathophysiologische Ereignisse, wie Wundheilung, Embryogenese und die Ausbreitung transformierter Tumorzellen (Plow et al. 1995). Die Überexpression von Enolase auf solchen Zellen unter kanzerogenen Bedingungen kann zu einer vermehrter Plasminbildung führen und folglich zur Invasion und Ausbreitung des Tumors (Miles et al. 1991; Redlitz et al. 1995). Plasminogen kann aber auch als neurotroper Faktor wirken und so das Neuritenwachstum neuronaler Zellen positiv beeinflussen. Ähnlich einem Wachstumsfaktor bindet Plasminogen auf der Oberfläche neuronaler Zellen und aktiviert so verschiedene Signalwege (Nakajima et al. 1993; Dale et al. 2006). Autoantikörper, gegen Oberflächenproteine von Zellen gerichtet, können pathogene Auswirkungen haben (Sanz and Capra 1988). Durch ihre Bindung können z.B. Rezeptorfunktionen blockiert werden.

Aus diesem Grund wurde die Oberflächenexpression des glykolytischen Proteins auch auf Neuroblastomzellen untersucht. Die Analyse mit unbehandelten Zellen zeigte keine Expression von α -Enolase auf der Oberfläche der Zellen. Aber auch eine Differenzierung mit Retinolsäure sowie eine Behandlung mit inflammatorischen Bedingungen (INF γ , LPS) führten bei beiden in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzellli-

nien (SKN-SH, SH-SY5Y) nicht zu einer Oberflächenexpression des Proteins. Eine gesteigerte Expression des Proteins auf der Oberfläche von Monozyten, T- und B-Zellen zeigte sich nach einer Behandlung mit LPS (Fontan et al. 2000). Damit ist das hier identifizierte Autoantigen α -Enolase nicht Angriffspunkt pathogen wirkender Autoantikörper auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen. Die meisten im Zusammenhang mit OMS beschriebenen Autoantikörper binden an intrazelluläre Antigene, wie das Hu-Protein, KSRP, Neuroleukin und Antigene im Zytoplasma von Purkinjezellen, was sich auch für α -Enolase zeigt. Intrazellulär gebunden kann es in seiner Funktion als Glykolyseenzym gestört werden, was wiederum Auswirkungen auf die Zellfunktion haben kann (Adamus et al. 1998; Magrys et al. 2007). Patienten mit rheumatischen Erkrankungen haben Autoantikörper gegen α -Enolase, unter anderem als *Heat shock* Protein im Zentrosom lokalisiert (Rattner et al. 1991; Pancholi 2001; Saulot et al. 2002; Kinloch et al. 2005).

Die Bindung von Plasminogen an α -Enolase kann Einfluss auf die Bindung von Autoantikörpern an das Protein haben. Umgekehrt kann aber auch eine Antikörperbindung die Bindung von Plasminogen blockieren (Adamus et al. 1998). Der ELISA-Test hat gezeigt, dass OMS-Antikörper α -Enolase auch in Gegenwart von Plasminogen binden. Dabei zeigte sich eine erhöhte Bindung dieser Antikörper an den Enolase/Plasminogen-Komplex sowie Plasminogen für OMS- und Kontroll-IgGs, so dass ein unspezifischer, allgemein bindungssteigernder Effekt des Plasminogens auf die IgG-Bindung im Allgemeinen anzunehmen ist.

Ursache einer OMS-Erkrankung kann, neben der paraneoplastischen Form, auch eine bakterielle Infektion sein. Ein OMS wurde als Folge einer Streptokokkeninfektion beschrieben (Bataller et al. 2001; Dale 2005; Candler et al. 2006). Pädiatrische OMS-Patienten wiesen im Liquor und Serum Autoantikörper gegen Neuroleukin auf (Candler et al. 2006). Neuroleukin hat wie α -Enolase intra- und extrazelluläre Funktionen. Intrazellulär ist Neuroleukin (GPI) auch Teil der Glykolyse und wirkt extrazellulär regulatorisch während der Tumorerkrankung und Metastasierung (Candler et al. 2006). Ein dem humanen Neuroleukin ähnliches Protein wurde auch auf der Oberfläche von Streptokokken nachgewiesen. Sequenzhomologien und Autoantikörper gegen Neuroleukin sind möglicherweise die Folge molekularem Mimikries und somit Auslöser einer Autoimmunreaktion (Pranzatelli 1996; Candler et al. 2006). Autoantikörper gegen α -Enolase wurden unter anderem im Zusammenhang mit einer post-streptokokkalen Autoimmunerkrankung beschrieben (Dale et al. 2006). Streptokokken exprimieren Glykolyseenzyme

auf ihrer Oberfläche, welche Sequenzhomologien zu humanen Proteinen aufweisen (Dale et al. 2006). Das auch bei einem OMS identifizierte Antigen α -Enolase weist zu 47% Sequenzhomologien mit der bakteriellen Enolase auf. Molekulares Mimikry und kreuzreaktive Autoantikörper können also als möglicher pathogener Mechanismus in post-streptokokkalen Erkrankungen des Zentralnervensystems angesehen werden. Auf der Zelloberfläche von Streptokokken fungiert α -Enolase auch als Plasminogenrezeptor. Durch diese Bindung können Bakterien leichter in Gewebe eindringen und pathogen wirken (Plow et al. 1995; Fontan et al. 2000; Bergmann et al. 2001; Dale 2005). Für die Mehrzahl der in dieser Arbeit gegen bakterielle Enolase getesteten OMS-Seren konnte eine Reaktion mit dem nativen Protein α -Enolase aus *Streptococcus pneumoniae* beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte sich aber auch bei den getesteten Seren gesunder Probanden, bis auf ein Serum, eine positive Reaktion in Bezug auf das bakterielle Protein. Natürlich vorkommende autoreaktive Antikörper gegen evolutionär konservierte Moleküle mit Sequenzhomologien zu bakteriellen Proteinen wie α -Enolase können dabei Teil des Immunsystems sein (Pranzatelli 1996; Gitlits et al. 2001). Eine unspezifische Bindung der Antikörper in OMS-Seren und Kontrollseren an das bakterielle Protein ist in diesem Fall wahrscheinlicher, weil das in einer weiterführenden *Western Blot* Analyse verwendete rekombinante Protein weder von OMS-Seren noch von den Kontrollen erkannt wurde. Im Gegensatz dazu konnten aber in OMS-Seren Autoantikörper gegen das humane Protein nachgewiesen werden; diese binden möglicherweise eine Sequenz des Proteins, welche in der bakteriellen Enolase nicht vorliegt. Weiterhin zeigte sich in der *Western Blot* Analyse mit bakteriellen Proteinen für OMS-Seren aber auch für Kontrollseren eine positive Reaktion mit verschiedenen Proteinen aus *Streptococcus pneumoniae*. Da der Durchseuchungsgrad mit Streptokokken insgesamt sehr hoch ist, kann ein bereits vorhandener Kontakt mit diesen Bakterien nach einer Infektion oder einer Impfung diese starke Reaktion gegen verschiedene Proteine aus *Streptococcus pneumoniae* erklären. Auf Grund fehlender signifikanter Unterschiede in der Bindung von α -Enolase durch OMS-Seren im Vergleich zu den Kontrollen ist eine bakterielle Infektion als Ursache für die Bildung von anti- α -Enolase Antikörpern eher unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse sowie Autoantikörper gegen α -Enolase bei überwiegend paraneoplastischen OMS-Patienten deuten eher auf eine humorale Immunantwort in Form kreuzreaktiver Antikörper hin. Dies bestätigt sich auch in der Identifizierung von Enolase als Antigen in Neuroblastomzellen und Kleinhirngewebe mittels der 2D-Analyse.

5.2.2 Pathogene Effekte von Autoantikörpern

Die aus OMS-Seren isolierten IgG-Fraktionen haben einen anti-proliferativen Effekt auf Neuroblastomzellen und können Apoptosevorgänge induzieren (Korfei et al. 2005). In vitro Studien haben gezeigt, dass Autoantikörper gegen glykolytische Enzyme apoptotisch auf neuronale Zellen wirken (Dale et al. 2006). Unter anderem werden Autoantikörper gegen α -Enolase bei CAR-Patienten (*cancer-associated retinopathy*) mit einer retinalen Degeneration als Auslöser apoptotischer Vorgänge und Ursache des visuellen Verlustes diskutiert (Adamus et al. 1998; Magrys et al. 2007). Antikörper binden α -Enolase und blockieren so deren katalytische Funktion. Eine daraus resultierende Verminderung von glykolytischem ATP sowie ein Anstieg intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen führen zu einem CytochromC-Freilass und über die Aktivierung von Kaspase 3 zur Apoptose der Zellen (Magrys et al. 2007). Ein bei OMS-Patienten beobachteter Verlust von Purkinjezellen könnte in einer pro-apoptotischen Wirkung von Autoantikörpern speziell gegen α -Enolase begründet liegen. Für Enolase-Antikörperpositive IgG-Fraktionen konnte aber keine zytotoxische Wirkung auf Neuroblastomzellen beobachtet werden. Folglich müssen der beobachteten pro-apoptotischen Wirkung von OMS-Autoantikörpern noch andere Mechanismen zu Grunde liegen. Die in diesem Versuch verwendeten Gesamt-IgG-Fraktionen konnten nicht durch Untersuchungen mit rein gegen α -Enolase gerichteten OMS-Antikörpern ergänzt werden. Auf Grund der Seltenheit dieser Erkrankung und einem Patienten-Durchschnittsalter von 2 Jahren stehen nur geringe Serummengen zur Verfügung und erschweren die Untersuchung spezifischer Autoantikörper.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in 22,6% der getesteten OMS-Seren Autoantikörper spezifisch gegen α -Enolase nachgewiesen werden konnten. Anti- α -Enolase-Autoantikörper konnten aber auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen identifiziert werden, wodurch sie unspezifisch für eine OMS-Erkrankung sind.

α -Enolase weist eine 97%ige Sequenzhomologie zu einem Tumorsuppressorprotein namens MBP1 (*myc binding protein 1*) auf (Feo et al. 2000). Wie bereits in der Einleitung kurz erwähnt, wird die Untersuchung der *n-myc*-Expression als diagnostischer Marker bei einer Neuroblastomerkkrankung eingesetzt und gibt Aufschluss über die Prognose einzelner Patienten. Eine mögliche Verbindung zwischen α -Enolase und dem Oncogen *n-myc* im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und der Ausbildung von Tumoren wird diskutiert und muss durch weitere Untersuchungen genauer analy-

siert werden (Adamus et al. 1998; Feo et al. 2000; Subramanian and Miller 2000; Ejeskar et al. 2005; Magrys et al. 2007).

5.2.3 Retinaldehydrogenase 1 (RALDH1) als Autoantigen im OMS

Neben Antikörpern gegen α -Enolase konnten auch Autoantikörper gegen das Enzym Retinaldehydrogenase 1 (RALDH1) in allen vier auf 2D-Ebene getesteten OMS⁺/NB⁺ Seren nachgewiesen werden. Autoantikörper gegen RALDH1 waren in 39% der getesteten OMS-Seren nachweisbar. RALDH1 als zytoplasmatisches Protein ist am entscheidenden Schritt der Retinolsäuresynthese beteiligt und katalysiert die irreversible Oxidation von Retinal zu Retinolsäure (RA). Retinolsäure als aktives Derivat des Vitamin A (Retinol) kann an Rezeptoren im Kern binden und so aktiv die Expression verschiedener Zielgene beeinflussen (Blomhoff et al. 1991; Napoli 1996a; Napoli 1996b; Maden 2001). Autoantikörper gegen Enzyme des Vitamin A Stoffwechsels waren bisher nicht bekannt und konnten hier erstmals bei OMS-Patienten nachgewiesen werden. Im Verlauf der Untersuchungen wurde das Enzym dabei nicht nur unter Verwendung von Kleinhirn als Antigenquelle identifiziert, sondern auch in für die 2D-Analyse verwendeten Neuroblastomzellen, wodurch sich wieder kreuzreaktive Autoantikörper beim kindlichen OMS bestätigen.

Autoantikörper im Serum von OMS-Patienten binden nachweislich an Oberflächenstrukturen von Neuroblastomzellen, erkennen aber auch intrazelluläre Proteine (Blaes et al. 2005; Korfei et al. 2005). Ob RALDH1 als bisher unbekanntes Oberflächenprotein auf Neuroblastomzellen von Autoantikörpern gebunden werden kann, wurde parallel zu den Untersuchungen auf RNA-Ebene ermittelt. *Western Blot* Analysen mit beiden in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzelllinien haben gezeigt, dass das Enzym weder nach einer RA-Behandlung noch bei unbehandelten Zellen auf der Oberfläche vorhanden ist. Auch intrazellulär konnte RALDH1 in Neuroblastomzellen nicht nachgewiesen werden, was aber den Ergebnissen der 2D-Analyse widerspricht, möglicherweise aber in verschiedenen Entwicklungs- und Differenzierungsstadien der jeweils verwendeten Zellen begründet liegen kann. Bisher gibt es keine Untersuchungen darüber, ob RALDH1 in peripheren Neuronen exprimiert wird. Lediglich die positive Wirkung von der durch das Enzym synthetisierten RA auf Neuroblastomzellen wurde beschrieben (Joshi et al. 2007).

Beim Menschen sind drei RALDH-Enzyme für die Synthese von RA bekannt: RALDH1 (*ALDH1A1*), RALDH2 (*ALDH1A2*) und RALDH3 (*ALDH1A3*) (Napoli 1996a; Duester 2001). Die durch diese Enzymgruppe katalysierte Synthese von Retinolsäure und dessen hormonähnliche Wirkung spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen Prozessen wie der Embryogenese, der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen, dem Wachstum und in der Immunantwort (Morriss-Kay and Ward 1999; Blomhoff 2004; Huq et al. 2006; Liden and Eriksson 2006; Mora et al. 2008). Retinaldehydrogenasen werden dabei organspezifisch, im Verlauf der Entwicklung und bei Erwachsenen, unterschiedlich exprimiert (Xi and Yang 2008). Expressionsstudien über die Verteilung der einzelnen RALDH-Enzyme im Fötus, Erwachsenen und verschiedenen Tumoren haben gezeigt, dass RALDH1 in einem fötalen Gehirn nur sehr schwach exprimiert wurde, im Vergleich zu einer starken Expression bei Erwachsenen. RALDH2 und 3 wurden in fötalem Gehirngewebe nicht nachgewiesen, konnten aber in einem erwachsenen Gehirn detektiert werden (Xi and Yang 2008). Studien einer anderen Gruppe hingegen haben gezeigt, dass RALDH2 während der frühen Embryonalentwicklung das Hauptenzym in der RA-Synthese darstellt (Zhao et al. 1996; Huq et al. 2006).

Für eine mögliche Verbindung kreuzreaktiver Antikörper gegen RALDH1 im Tumor und neuronalem Gewebe wurden Expressionsstudien über die Verteilung der RALDH-Enzyme auch in Neuroblastomzellen durchgeführt. Die Analyse ergab, dass RALDH1 in keiner der zwei getesteten Neuroblastomzelllinien nachgewiesen werden konnte, und bestätigt damit das Ergebnis der parallel durchgeführten *Western Blot* Analyse in Bezug auf die Oberflächenexpression des Proteins. Hingegen zeigte sich eine Expression von RALDH2 in einer der Zelllinien (SH-SY5Y). RALDH3 wurde in beiden Zelllinien detektiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RALDH1 in einem fötalen Gehirn nur schwach exprimiert wird und in Neuroblastomzellen nicht nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich dazu zeigte sich keine Expression von RALDH2 in fötalem Gehirngewebe im Vergleich zu einem Nachweis der Transkripte in Neuroblastomzellen. Beide Enzyme, RALDH1 und 2 weisen eine Sequenzhomologie von 72% auf (Duester 2001). Die in OMS-Seren nachgewiesenen Autoantikörper gegen RALDH1 binden möglicherweise an eine in beiden Enzymen vorliegende Sequenz und können dadurch sowohl RALDH1 als auch RALDH2 erkennen, wodurch sich eine Bindung an das Enzym trotz einer beobachteten heterogenen Verteilung erklären lassen könnte.

Die in Verbindung mit den RALDH untersuchte Expression der metabolischen Enzyme CYP26 hat gezeigt, dass CYP26A und B erst durch die Zugabe von RA exprimiert werden und in beiden Neuroblastomzelllinien nachweisbar waren, im Gegensatz zu CYP26C. Das RA-abbauende Enzym CYP26A wurde auch in fötalem Gehirngewebe detektiert, im Vergleich zu den Enzymen CYP26B und C (Xi and Yang 2008). Eine kontrollierte Balance zwischen beiden Enzymen, RALDH und CYP26, ist entscheidend für die Wirkung von RA als Rezeptorligand (Liden and Eriksson 2006; Xi and Yang 2008). Auf eine zu hohe RA-Konzentration reagieren verschiedene Organe sehr empfindlich, besonders das Kleinhirn (Yamamoto et al. 1999). RA kann in zu hohen Konzentrationen neurotoxisch und krankheitsauslösend wirken (Yamamoto et al. 1999). Autoantikörper gegen das RA-synthetisierende Enzym RALDH1 haben möglicherweise durch ihre Bindung an das Protein Einfluss auf dessen Funktion und könnten so die RA-Konzentration positiv oder negativ beeinflussen und zu Schädigungen führen.

Autoantikörper gegen RALDH1, als Schlüsselenzym im Vitamin A Stoffwechsels, stellen also auf Grund verschiedener Aspekte einen interessanten Ansatzpunkt für ein besseres Verständnis der Pathogenese im OMS dar. Vitamin A und seine Derivate, unter anderem in Form von RA, sind in ihrer Funktion entscheidend an verschiedenen physiologischen Prozessen, wie der Zelldifferenzierung, dem Gewebewachstum und der Entwicklung beteiligt. Weiterhin hat RA Einfluss auf verschiedene Bereiche der adaptiven Immunantwort, welche auch im Zusammenhang mit der Pathogenese im OMS diskutiert wird (Furieux et al. 1990a; Stephensen et al. 2002; Blomhoff 2004; Pranzatelli et al. 2004a; Pranzatelli et al. 2004b; Mora et al. 2008; Pranzatelli et al. 2008). RA und andere Derivate des Vitamin A, auch als Retinoide bezeichnet, werden unter anderem auch zur Behandlung verschiedener Tumore, wie Neuroblastomen, eingesetzt und können die Proliferation von Krebszellen hemmen (Yamamoto et al. 1999; Crowe et al. 2003; Messi et al. 2008). Ein dadurch begrenztes Tumorwachstum sowie die Regression des Tumors könnten im Zusammenhang mit den bei OMS-Patienten beobachteten oft kleinen und begrenzten Neuroblastomen stehen.

5.3 OMS-Autoantigene als RNA-Bindungsproteine

Onconeuronale Antigene im Zusammenhang mit einer OMS-Erkrankung bei Erwachsenen und/oder Kindern werden häufig als RNA-Bindungsproteine beschrieben (Musunuru and Darnell 2001; Bataller et al. 2003). In dieser Funktion können sie regu-

latorisch auf die Genexpression in verschiedenen Bereichen Einfluss nehmen. Eine mögliche Funktion als RNA-Bindungsprotein wurde auch für die im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Autoantigene α -Enolase und RALDH1 untersucht. Über einen 2D-North Western Blot wurden RNA-bindende Proteine in einem Proteinextrakt aus Neuroblastomzellen identifiziert und neben den bekannten RNA-Bindeproteinen HuD, eIF2 β und KSRP konnte auch α -Enolase als bisher unbekanntes RNA-bindendes Protein ermittelt werden. Enolase ist als Nukleinsäure-bindendes Protein in Form einer DNA-Bindung bekannt. Als Transkriptionsregulator hat α -Enolase ähnlich dem MBP (*myc binding protein*) Einfluss auf die Expression des Protooncogens c-myc und wird als potentieller Tumorsuppressor angesehen (Feo et al. 2000; Subramanian and Miller 2000). In einem weiteren Versuch (*Dot blot*) stellte sich heraus, dass die Fähigkeit RNA zu binden auf α -Enolase begrenzt ist. Für die neuronal-spezifische γ -Enolase konnte keine Interaktion mit RNA beobachtet werden. Über die *Dot Blot* Technik und einen ELISA-Test wurde auch das zweite neu identifizierte Autoantigen RALDH1 als bisher unbekanntes RNA-bindendes Protein identifiziert. Der ELISA-Test mit RALDH1 zeigte aber auch, dass α -Enolase eine höhere Affinität zu RNA hat als RALDH1, für welches nur eine schwache Bindung an RNA beobachtet werden konnte. Mögliche funktionelle Effekte dieser RNA-Bindung sind noch unbekannt und bedürfen weiterer Untersuchungen. Die bei paraneoplastischen Erkrankungen nachgewiesenen Antigene Nova und Hu wurden als RNA-bindende Proteine bisher am besten untersucht. Hu-Proteine binden an AU-reiche Elemente (ARE) in der 3' untranslateden Region spezifischer mRNAs, wodurch diese stabilisiert werden (Fan and Steitz 1998; Musunuru and Darnell 2001; Cuadrado et al. 2002; Perrone-Bizzozero and Bolognani 2002). Im Zytoplasma sind sie an der RNA-Lokalisation beteiligt (Antic et al. 1999; Keene 1999). Die Antigene Nova1 und Nova2 sind im Kern lokalisiert und binden RNA über ein K homologes (KH) Motif (Musunuru and Darnell 2001). In dieser Verbindung sind sie an *Splicing*-Vorgängen spezifischer Pre-mRNAs beteiligt (Buckanovich et al. 1993; Musunuru and Darnell 2001). Eine ähnliche Funktion der RNA-Stabilisierung und -Lokalisation ist auch für α -Enolase und RALDH1 möglich.

Autoantikörper sind häufig gegen funktionelle Domänen des Proteins gerichtet (Tan 1991; Manley et al. 1995). Anti-Hu-Antikörper binden an zwei für die RNA-Bindung essentielle Domänen des Proteins und haben so möglicherweise Einfluss auf die Funktion des Hu-Proteins als RNA-Bindeprotein (Manley et al. 1995). Gleiche Untersuchungen, ob eine RNA-Bindung Einfluss auf die Bindung von Autoantikörpern an das Prote-

in hat, wurden auch für α -Enolase und RALDH1 durchgeführt. Für α -Enolase und RALDH1 zeigte sich aber keine Änderung in der Bindung durch Autoantikörper in An- bzw. Abwesenheit von RNA. Durch eine RNA-Bindung an das Antigen wird die Bindung von Autoantikörpern an das Protein nicht blockiert, was auf unterschiedliche Bindungsdomänen der Antikörper und der RNA an das Protein hindeutet. Im Vergleich zu den beschriebenen Antigenen Hu und Nova, welche auf neuronale Zellen begrenzt sind, werden α -Enolase und RALDH1 ubiquitär exprimiert und haben als RNA-Bindeproteine möglicherweise auch auf die Genexpression in anderen Bereichen außerhalb des Nervensystems Einfluss.

5.4 Funktionelle Effekte von Autoantikörpern im OMS

Ausgehend von den bereits bekannten funktionellen Effekten der OMS-Autoantikörper (Korfei et al. 2005) wurden im Rahmen dieser Arbeit weiterführende Untersuchungen in Bezug auf die Funktion dieser Antikörper im Zusammenhang mit einer Antitumorimmunreaktion durchgeführt. Ein Neuroblastom zeichnet sich durch eine hohe Aggressivität aus und hat zum Zeitpunkt der Diagnose oft bereits Metastasen gebildet. Die Metastasenbildung schließt Prozesse der Differenzierung und Migration von Tumorzellen ein. Im Gegensatz dazu ist ein bei OMS-Patienten diagnostizierter Tumor oft klein und begrenzt (Altman and Baehner 1976) und liegt im Fall der für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Patientenproben überwiegend in Stadium I und II vor, selten in Stadium III (siehe Anhang Tabelle I; siehe Einleitung Punkt 1.1.1.1). Möglich wäre, dass Autoantikörper hemmend auf die durch RA gesteigerte Migration und Differenzierung von Tumorzellen wirken (Joshi et al. 2007).

Für die Untersuchung einer solchen Wirkung auf morphologische Änderungen, als Form der Differenzierung, wurden Neuroblastomzellen mit IgG-Fractionen, isoliert aus OMS-Seren und Kontrollseren, vorinkubiert, wodurch Autoantikörper möglicherweise an Zelloberflächenstrukturen binden und dadurch ihre Funktionen negativ oder positiv beeinflussen. Im Folgenden wurde eine RA-Behandlung durchgeführt und sollte zeigen, ob die durch RA beobachtete positive Wirkung auf die Differenzierung durch Autoantikörper beeinflusst wurde. Eine erwartete Differenzierung durch ein verstärktes Dendritenwachstum für beide in dieser Arbeit verwendeten Neuroblastomzelllinien unter der Wirkung von RA (Joshi et al. 2007; Messi et al. 2008) konnte nur für SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden, im Gegensatz zu SKN-SH-Zellen, welche kaum Änderungen in der

Morphologie zeigten, was sich auch in einer geringen Expression des Bcl2-Proteins bestätigte. Durch die beschriebene Vorinkubation von SH-SY5Y-Zellen mit OMS-IgG-Fraktionen zeigte sich kein Einfluss auf die Differenzierung der Zellen in Folge einer RA-Behandlung, wodurch sich der vermutete negative Einfluss auf morphologische Änderungen der Zellen in Form dendritischer Auswüchse nicht bestätigt hat. Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz dazu nach einer Behandlung mit Kontroll-IgG-Fraktionen eine geringfügig höhere Dendritenlänge, im Vergleich zu mit OMS-IgG-Fraktionen behandelten Zellen. Durch eine zusätzliche RA-Behandlung konnten sogar längere Zellfortsätze beobachtet werden, als bei Zellen, welche nur mit RA behandelt wurden. Der Effekt eines gesteigerten Dendritenwachstums durch IgG-Fraktionen von gesunden Kontrollen kann derzeit nicht erklärt werden. Unspezifische Effekte von IgG auf verschiedene Zellfunktionen wurden jedoch in der Literatur beschrieben (Kondo et al. 1994; Le Pottier et al. 2007). Darüber hinaus sind Untersuchungen weiterer IgG-Fraktionen nötig, um eine genauere Aussage über die beobachteten Effekte auf Neuroblastomzellen machen zu können.

Die bei einer fortgeschrittenen Neuroblastomerkrankung beobachtete Metastasierung schließt die Migration von Tumorzellen in entlegene Bereiche, entfernt vom Primärtumor, ein. Dieses Migrationsverhalten kann auch für Neuroblastomzellen invitro beobachtet werden und lässt sich durch eine vorangegangene RA-Behandlung steigern (Joshi et al. 2007; Messi et al. 2008). Die Beobachtungen bestätigten sich für die hier verwendete Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Im Gegensatz dazu konnte für SKN-SH-Zellen keine Migration gezeigt werden, auch nicht nach einer RA-Behandlung. Eine vermutete hemmende Wirkung von OMS-Autoantikörpern auf die Tumorzellen und ihr Migrationsverhalten wurde unter den gleichen Bedingungen, wie für die Differenzierung der Zellen beschrieben, untersucht. Im Unterschied zu den Analysen der Dendritenlängen zeigte sich für das Migrationsverhalten der Zellen kein Unterschied in der Behandlung mit OMS-IgG-Fraktionen oder Kontrollen. Durch die starke Streuung der einzelnen Messwerte kann nur schwer eine genaue Aussage in Bezug auf den Einfluss der OMS-Autoantikörper auf die Migration von Neuroblastomzellen getroffen werden, eine geringe Tendenz in Form einer Migrationssteigerung ist aber ersichtlich und zeigt so ein den Erwartungen entgegengesetztes Ergebnis. Auf Grund der Auswertungen sind aber weitere Untersuchungen der Wirkung von Autoantikörpern im Zusammenhang mit dem Migrationsverhalten von Neuroblastomzellen erforderlich. Änderungen in der RA-Konzentration oder den IgG-Fraktionen könnten zu einer eindeutigeren Aussage der

Wirkung von Autoantikörpern führen, müssen aber in weiterführenden Untersuchungen getestet werden (Crowe et al. 2003).

5.5 Eine cDNA-Bank als Antigenquelle im OMS

Die Identifizierung neuer Antigene oder eines möglicherweise gemeinsamen Antigens im kindlichen OMS war Ziel der vorliegenden Arbeit. Neben der erfolgreich durchgeführten 2D-Analyse und zwei dadurch neu identifizierten Antigenen im OMS sollten mit Hilfe einer zu den 2D-Gelen alternative Methode neue Antigene identifiziert werden. Dafür wurde eine *cerebellum Large-Insert cDNA Library* verwendet, welche zusätzliche Möglichkeiten der Antigenidentifizierung gab. Die Analyse neuronaler Antigene schließt bei dieser Methode auch die Identifizierung gering exprimierter Sequenzen, wie zum Beispiel die von Rezeptoren, ein und gibt so ein größeres Spektrum möglicher Autoantigene im Vergleich zu der bei den 2D-Gelen beschriebenen Problematik. Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek, ausgehend von Gehirngewebe, wurden cDNA-Fragmente mit einer Größe von 2 – 3 kb verwendet, welche die Identifizierung von *full-length* Klonen, mit einer kompletten Gensequenz, ermöglichen. Durch den Einbau einer sogenannten *slip site*, einer Verlängerung durch eingefügte Thymin-Reste, kann es zu einer Verschiebung im Leseraster kommen und damit zu einer Expression neuer Sequenzen, was die Anzahl weiterer potentieller Antigene zusätzlich erhöht (Wagner et al. 1990).

Die Identifizierung neuer Antigene über die cDNA-Bibliothek erfolgte mittels einem *Immunoscreening* unter Verwendung von OMS-Serum und Serum gesunder Kontrollen. Mit Hilfe der darin enthaltenen Antikörper wurden Proteine, als Folge der Lyse der *E. coli* Zellen, erfolgreich detektiert. Im Anschluss daran erfolgte die Selektion positiver Plaques, welche die cDNAs erkannter Proteine enthielten, die nur über Antikörper in OMS-Seren ermittelt werden konnten. Über das *cre/lox*-System und unter Verwendung des *E. coli*-Stammes BM25.8 wurde das Plasmid aus dem Phagengenom isoliert und rezirkularisiert (siehe Punkt 4.5.3). Eine Selektion plasmidtragender Klone fand dabei unter Verwendung des Antibiotikums Carbenicillin statt, erwies sich aber nicht als sehr effizient. In einem folgenden PCR-Schnelltest stellte sich ein Großteil der getesteten Klone als falsch positiv heraus und nur ein geringer Teil enthielt Fragmente verschiedener Größen. Möglich wäre, dass viele der isolierten *E. coli*-Klone das Plasmid und damit die Antibiotikaresistenz haben, das Fragment aber fehlt oder sie eine

natürliche Resistenz gegen das Antibiotikum aufweisen. Positiv identifizierte Klone wurden für weitere Analysen, unter Verwendung von Carbenicillin, in Flüssigkulturen angeimpft, zeigten aber am folgenden Tag kein oder sogar ein fehlendes, gleichmäßiges Wachstum. Unter Verwendung eines dem Carbenicillin in der Wirkung ähnlichen Antibiotikums, Ampicillin, zeigten sich diese Probleme nicht, wodurch sich das Antibiotikum Carbenicillin als ungeeignet erwies.

Plasmide mit einem cDNA-Insert wurden sequenziert und die Sequenz über eine Datenbanksuche bekannten Proteinen zugeordnet. Auf diesem Weg konnten sechs potentiellen Antigene im OMS identifiziert werden (siehe Tabelle 9, Punkt 4.5.6). Bei den darüber hinaus erhaltenen Sequenzen konnten diese nicht eindeutig einem Protein zugeordnet werden, oft zeigten sich nur Übereinstimmungen mit einem Sequenzbereich auf verschiedenen Chromosomen ohne die Angaben zu einem Protein, wodurch möglicherweise bis dahin unbekannte Gensequenzen ermittelt wurden (Hoog 1991). In der Arbeitsgruppe um Bataller konnten bereits über das *Screenen* einer Hirnstamm cDNA-Bibliothek neue Antigene im OMS identifiziert werden, führten aber zu keinem gemeinsamen Antigen (Bataller et al. 2003). Verschiedene cDNA-Bibliotheken wurden auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen zur Identifizierung noch unbekannter Antigene erfolgreich eingesetzt (Becker et al. 1997; Sioud and Hansen 2001; Kollnberger et al. 2002).

Die Identifizierung von Proteinen mit Hilfe einzelner Seren betroffener Patienten lässt aber keine Aussage über eine Funktion der Proteine in der Pathogenese dieser Krankheiten zu. Dafür müssen mehrere Patienten auf Antikörper gegen das entsprechende Protein getestet werden. Ein solcher Versuch unter Verwendung der isolierten positiven Plaques war nicht möglich (siehe Punkt 4.5.7). Für die meisten der getesteten OMS-Seren, aber auch für die verwendeten Kontrollseren, zeigte sich eine positive Reaktion mit den nach der Lyse von *E. coli*-Zellen freigesetzten Proteinen. Nur unter Verwendung des Phagenlysates mit der cDNA der GABA_A- α 1-Rezeptor-Untereinheit konnte ein vielversprechendes Ergebnis beobachtet werden, bei dem 5/7 getestete OMS-Seren, aber nur 1/7 Kontrollseren mit dem Plaque eine positive Reaktion zeigten. Durch die Lyse der Bakterien werden nicht nur gesuchte Antigene freigesetzt, sondern auch bakterielle Proteine, an welche Antikörper unspezifisch binden können und so eine zu starke Hintergrundreaktion verursachen, wodurch das eigentliche Signal mit dem Antigen nicht mehr sichtbar oder falsch positiv ist. Die Frage, ob es sich bei den isolierten Proteinen um potentielle Antigene im OMS handelt, kann mit dieser Methode nicht aus-

reichend geklärt werden. Um eine genaue Aussage über die Verteilung und Funktion der Proteine in der Pathogenese vom OMS treffen zu können, müssen diese rekombinant hergestellt, über *Line Blots* mit weiteren OMS-Seren sowie Kontrollen analysiert werden (Bataller et al. 2003).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das *Immunoscreening* einer cDNA-Bibliothek mit Patientenseren zur Identifizierung von Antigenen eine alternative Methode zu den 2D-Gelen darstellt. In der Durchführung erwiesen sich aber einige Punkte als problematisch. Die Identifizierung von Antigenen erwies sich als sehr zeitaufwendig im Vergleich zu der durchgeführten 2D-Analyse. Weiterhin war die Selektion positiver, Plasmid-tragender *E. coli*-Klone mittels einer plasmidgekoppelten Resistenz ineffektiv und brachte viele falsch positive Klone hervor. Eine solche cDNA-Bibliothek stellt eine sehr komplexe Sammlung von im Gehirn exprimierten Genen dar, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung eines speziell in der Pathogenese eines OMS wichtigen Proteins sehr gering ist. Hingegen ist die Identifizierung sonst im Gewebe nur gering exprimierter Sequenzen mittels dieser Methode eher möglich, als bei der Durchführung einer 2D-Analyse. Mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit verwendeten *cerebellum Large-Insert cDNA Library* konnten verschiedene potentielle Autoantigene identifiziert werden, wobei sich die GABA_A- α 1-Rezeptor- und Na-Kanal- α 2 Untereinheiten als interessanteste Kandidatenantigene erwiesen. Die GABA_A- α 1-Rezeptor-Untereinheit ist Teil des wichtigsten inhibitorischen Rezeptors im Zentralnervensystem. Sie wird sowohl in Neuroblastomzelle als auch in Zellen des Cerebellums, im speziellen in Purkinjezellen exprimiert (Laurie et al. 1992; Wisden et al. 1992; Tyndale et al. 1994). Der Verlust von Purkinjezellen im Verlauf einer OMS-Erkrankung steht möglicherweise im Zusammenhang mit kreuzreaktiven, pathogen wirkenden Autoantikörpern gegen den Rezeptor (Ziter et al. 1979). Der spannungsabhängige Na-Kanal setzt sich aus mehreren Untereinheiten, wie der α 2-Untereinheit, zusammen und ist entscheidend an der Weiterleitung elektrischer Impulse (Aktionspotential) im Nervensystem beteiligt. Na-Kanäle werden in Neuroblastomzellen und cerebellären Purkinjezellen exprimiert und können so Angriffspunkt kreuzreagierender, pathogen wirkender Autoantikörper sein (Narahashi et al. 1995; Hirsh and Quandt 1996).

Zusammenfassend konnten mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten OMS-Seren und einer 2D-Analyse zwei neue Autoantigene beim OMS identifiziert werden: α -Enolase und RALDH1. In 7/31 (22,6%) OMS-Seren wurden Autoantikörper gegen Enolase nachgewiesen und bei 15/39 (39%) OMS-Patienten zeigten sich Antikörper gegen RALDH1. Durch den Nachweis beider Antigene in Neuroblastomzellen und Kleinhirngewebe bestätigte sich die Annahme kreuzreaktiver Antikörper in einer immunvermittelten Pathogenese eines OMS. In weiteren Untersuchungen wurden sowohl α -Enolase als auch RALDH1 als bisher unbekannte RNA-bindende Proteine identifiziert.

Durch das *Screenen* einer cDNA-Bibliothek konnten zwei weitere möglicherweise interessante Antigene im OMS identifiziert werden: die α 1-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors und die α 2-Untereinheit des Na-Kanals.

6. Anhang

6.1 Übersicht verwendeter Serum-Proben

Tabelle I: Klinische Daten und Charakteristika der Seren kindlicher OMS-Patienten sowie eine Übersicht der getesteten Antigene.

Nr.	Alter*	Geschl.	Diagnose	Tumor/Stadium	Autoantigene		
					α -Eno	γ -Eno	RALDH1
1	18	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I	+	-	+
2	18	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I		-	+
3	49	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/III	-	-	
4	23	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/III	+	-	+
5	16	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I	-	-	+
6	16	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/II	-	-	+
7	29	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I	-		-
8	35	m	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/II	+	-	-
9	25	m	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/II	-	-	-
10	18	m	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I	+	-	+
11	26	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/II	-	-	-
12	51	w	OMS ⁺ /NB ⁺	GNB/I	-	-	+
13	25	m	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I	+	-	
14	28	m	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I	-	-	-
15	38	m	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I	-	-	-
16	48	m	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/III	-	-	-
17	15	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/I			-
18	75	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--			+
19	16	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/IIa			-
20	15	w	OMS ⁺ /NB ⁺	NB/III			-
21	36	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-	-	-
22	30	w	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-	-	+
23	40	w	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-	-	-
24	48	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		
25	17	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-	-	-
26	84	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		-
27	22	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	+		-
28	18	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		+
29	13	w	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		-

30	15	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		-
31	25	w	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		+
32	23	w	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	+		-
33	24	w	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		-
34	30	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		-
35	66	w	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		-
36	28	m	OMS ⁺ /NB ⁻	--/--	-		+
37	79 J	w	OMS ⁺ adult	--/--			+
38	23 J	w	OMS ⁺ adult	--/--			+
39	75 J	m	OMS ⁺ adult	--/--			-
40	60 J	m	OMS ⁺ adult	--/--			-
41	34 J	m	OMS ⁺ adult	--/--			-
42	58 J	w	OMS ⁺ adult	--/--			+

Abkürzungen: Geschl. = Geschlecht; OMS = Opsoklonus-Myoklonus Syndrom; NB = Neuroblastom; OMS⁺/NB⁺ = OMS mit Neuroblastom; OMS⁺/NB⁻ = OMS ohne Neuroblastom; GBN = Ganglioneuroblastom; Eno = Enolase; m = männlich; w = weiblich; J = Jahre; RALDH1 = Retinaldehydrogenase 1; * = Alter bei Ausbruch der Krankheit in Monaten angegeben

Tabelle II: Klinische Daten und Charakteristika verwendeter Seren gesunder Probanden sowie eine Übersicht der getesteten Autoantigene

Nr.	Geb.dat.	Geschl.	Diagnose	Autoantigene		
				α -Eno	γ -Eno	RALDH1
1	21.11.1998	m	gesund	-	-	-
2	08.06.2001	m	gesund	-	-	-
3	13.02.1999	m	gesund			+
4	11.05.1997	m	gesund	-	-	-
5	29.01.2001	m	gesund	-	-	-
6	11.05.2004	w	gesund	-	-	-
7	22.10.2003	m	gesund			-
8	29.03.2002	w	gesund			+
9	08.07.1997	w	gesund			-
10	28.06.2000	m	gesund			-
11	20.07.1997	m	gesund			-
12	19.04.2003	m	gesund			-
13	29.10.2006	w	gesund			-
14	21.11.1998	w	gesund			-
15	27.09.1998	w	gesund	-		-

16	21.09.2004	m	gesund	-		-
17	12.03.2001	w	gesund			-
18	27.09.1999	m	gesund			-
19	28.01.2000	m	gesund	-		-
20	11.01.2002	w	gesund			-
21	12.04.1998	m	gesund	-	-	-
22	31.10.2005	m	gesund	-	+	+
23	05.07.2002	m	gesund	-	-	+
24	30.05.2005	m	gesund			-
25	19.08.2004	w	gesund	-	-	-
26	07.08.2002	w	gesund	-	-	-
27	14.02.2004	m	gesund	-	-	+
28	23.11.1999	w	gesund			-
29	01.09.2002	w	gesund			-
30	06.11.2002	m	gesund			-
31	23.04.2005	w	gesund			-
32	02.03.2001	w	gesund			-
33	09.09.1999	m	gesund			-
34	06.12.2003	w	gesund			-
35	16.04.1998	m	gesund			-
36	06.06.2006	m	gesund			-
37	12.11.2002	w	gesund			-
38	02.07.1990	m	gesund			-
39	17.07.1990	w	gesund			-
40	18.04.2003	w	gesund			-
41	03.07.2003	w	gesund	-	-	-
42	08.10.1999	m	gesund	-	-	-

Abkürzungen: Geb.dat. = Geburtsdatum; Geschl. = Geschlecht; m = männlich; w = weiblich; Eno = Enolase; RALDH1 = Retinaldehydrogenase 1

Tabelle III: Klinische Daten und Charakteristika der Seren verwendeter NB-Patienten sowie eine Übersicht getesteter Antigene

Nr.	Patient	Alter	Geschl.	Tumor/Stadium	Autoantigene		
					α -Eno	γ -Eno	RALDH1
1	542009	8	m	NB/I	-	-	-
2	389692	9	w	NB/IV	-	-	-
3	611273	21	m	NB/I	-	-	+
4	492079	47	w	NB/IV	-	-	-
5	469994	32	w	NB/IIa	-	-	-
6	471728	46	w	NB/IV	-	-	-
7	501083	34	m	NB/III	-	-	-
8	494825	21	w	NB/IV	-	-	+
9	391723	9	w	NB/IIa	+	-	-
10	489872	18	w	NB/IV	-	-	-
11	604859	24	m	NB/IV	-	-	-
12	501609	26	w	NB/IIb	-	-	-
13	501093	34	m	NB/III	-	-	-

Abkürzungen: Eno = Enolase, NB = Neuroblastom ohne OMS, RALDH1 = Retinaldehydrogenase 1; Geschl. = Geschlecht

6.2 Übersicht über identifizierte potentielle Antigene

Tabelle IV: Übersicht identifizierter potentieller Antigene in Neuroblastomzellen

Nr.	Protein	M	M	pI	pI	Referenz (Protein-Funktion)
		(kDa) exp.	(kDa) theor.	exp.	theor.	
1	Heat shock 90 kDa protein 1 beta + Heat shock 90 kDa protein 1 alpha	95	83,5	5,0	5,0	(Dou et al. 2003)
2	KSRP protein (KH-type splicing regulatory protein)	93	73,3	7,0	8,0	(Min et al. 1997)
3	CCT (chaperonin containing TCP1 subunit 5, epsilon) CCT (Chaperonin containing TCP1 subunit 8, theta)	63	60	5,6	5,5	(Sternlicht et al. 1993)

4	TCP1-protein	70	60,8	6,4	5,7	(Sternlicht et al. 1993)
5	Stress-induced-Phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	70	63,2	6,6	6,4	(Siligardi et al. 2004)
6	ENO1 protein (alpha enolase)	51	47,5	6,4	7,7	(Pancholi 2001)
7	Aldolase C, fructose biphosphate	42	39,8	6,6	6,4	(Hawley et al. 2000)
8	3-phosphoglycerate dehydrogenase	60	57,4	6,3	6,3	Biosynthese von Serin
9	Inosine monophosphate (IM) dehydrogenase 2	60	56,2	6,5	6,4	De novo pathway der Guanin-Nukleotid-Biosynthese
10	Calponin 3	40	36,6	5,8	5,7	(Ishikawa et al. 2003)
11	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta	39	36,9	5,7	5,4	eIF3 bindet das 40S Ribosom während der Initiation der Transl.
12	GAPDH	37	36,2	5,8	8,3	Glykolyse
13	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform (hnRNPB1)	35	37,5	8,5	9,0	(Griffin et al. 2004)

Abkürzungen: M = Molekulargewicht, theor. = theoretisch, exp. = experimentell

Tabelle V: Übersicht identifizierter Target-Antigene in humanem Kleinhirn und das Ergebnis aus dem Vergleich der 2D-Western Blot Analysen mit OMS⁺/NB⁺-Patienten

Nr.	Proteinname	Patient 4	Patient1	Patient 15	Patient 14
1	Gamma Enolase	+	-	-	+
2	Aktin	++	-	++	+
3	Rab GDP dissos.	++	-	++	++
4	ATPsynthase	+	-	+	+
5	protein kinase C	+	-	-	+
6	Transkr. EPR ATPase	+	+	-	-
7	Serum albumin+DRP-2, CRMP-2	++	+	+	-
8	Serum albumin	++	-	+	-
9	Serum albumin	++	-	+	-
10	CRMP-2	+	+	-	-
11	stress induced phosphoprotein1	+	+	-	+
12	neg.	-	-	+	-
13	neg.	-	-	+	-
14	Pyruvate kinase isoenz.,	+	-	-	-

15	CRMP-2	+	-	-	-
16	CRMP-2+VATB2 (brain iso- form)	+	-	-	-
17	TMABADH	+	-	-	-
18	AL9A1+Actin-related Protein 3 + ODO2	+	-	-	-
19	AL9A1	+	-	-	-
20	Aldehyde dehydrogenase class 2	+	+	+	-
21	Retinal dehydrogenase 1 + SCOT	+	+	+	++
22	Retinal dehydrogenase 1	+	+	+	++
23	Retinal dehydrogenase 1	+	+	+	++
24	Alpha-enolase	+	+	-	+
25	Alpha-enolase	++	+	-	+
26	Alpha-enolase	++	+	+	+
27	Alpha-enolase	++	+	-	+
28	Alpha-enolase + FUMH	++	+	-	+
29	Alpha-enolase	++	+	+	+
30	Adenosylhomocysteinase	+	-	-	-
31	ACTY + PUR6 + SAHH	+	-	-	-
32	ALDOC	+	-	-	-
33	ALDOC	++	-	-	+
34	ALDOC	++	-	-	+
35	ALDOC + AATC	++	-	-	+
36	ALDOC	++	+	-	+
37	AATC + ALDOC	++	-	-	-
38	PP2AA + GBB1	+	-	-	-
39	GBB1 + LDHB	++	-	-	-
40	LDHB + GBB1 + TALDO	++	-	-	+
41	LDHB + CAZA2	++	-	-	+
42	LDHB	+	-	-	+
43	DDAH1	++	-	-	+
44	DDAH1 + TALDO	++	-	-	+
45	DDAH1 + TALDO + IDH3A	++	-	-	+
46	Transaldolase (TALDO)	++	-	-	-
47	TALDO + BIEA	++	-	-	+
48	Biliverdin reductase A prec. (BIEA)	++	-	-	+
49	BIEA + TALDO	++	-	-	+
50	GRHPR + TALDO + ACY2	++	-	+	+
51	Malate dehydrogenase (MDHC)	++	+	-	+
52	ALDR + MDHC	++	+	+	-
53	GAPDH (G3P)	+	-	+	-
54	GAPDH (G3P)	+	-	+	-
55	GAPDH (G3P)	+	-	+	-

56	GAPDH (G3P)	+	-	+	-
57	PRP2 (PGK1)	-	-	-	-
58	ALDOA + AATM	+	-	-	-
59	Ketosamine-3-kinase	++	-	-	-
60	neg.	++	-	-	+
61	Cytokeratin-10 (K1C10)	++	-	-	+
62	neg.	+	-	-	+
63	neg.	+	-	-	+
64	3HIDH	+	-	-	-
65	PNPO + PGAM1	+	-	-	+
66	Phosphoglycerate+Peroxiredoxin	++	-	-	+
67	Phosphoglyceratemitase1	++	-	-	+
68	Phosphoglyceratemitase 1	+	-	-	+
69	Carbonic anhydrase 1	+	-	-	-
70	neg.	++	-	+	+
71	Triosephosphate/PRDX6	+	-	-	-
72	Growth factor receptorbound Protein 2	+	-	-	-
73	PRDX6+TPIS+HPRT+GSTM1	++	-	+	-
74	GSTM2+NT5C	++	-	+	-
75	TPIS+DHPR	++	-	+	-
76	Proteasome subunit alpha type 2	+	-	+	-
77	Glutathione S-transferase P	++	+	-	-
78	PRDX2	++	-	-	-
79	Protein DJ-1 (Oncogen DJ1)	+	-	-	-
80	Peroxiredoxin-2	+	-	-	-
81	Glutathione S-transferase P+PRDX3	++	-	-	-
82	neg.	+	-	-	-
83	PEBP1+SODM	+	-	-	-
84	PRDX1	++	-	-	-
85	neg.	++	-	-	-
86	neg.	++	-	-	-
87	neg.	+	-	-	-
88	neg.	++	-	-	-
89	neg.	++	-	-	-
90	PRPS1	++	-	-	-

Bezeichnung: + = normal positives Signal auf dem Film; ++ = verstärkt positives Signal auf dem Film; - = kein Signal auf dem Film; neg. = negativ (dem Spot konnte kein Protein zugeordnet werden)

6.3 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
add	auffüllen auf
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
APC	Antigen-präsentierende Zelle (Cell)
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Calcium
Cam	Chloramphenicol
Carb	Carbenicillin
°C	Grad Celsius
d.h.	das heißt
Da	Dalton
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser (hier: Reinstwasser)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5`-triphosphat
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
et al.	et alteri (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
ETOH	Ethanol
g	Gramm; Erdbeschleunigung
G	Guanin
h	Stunde
His	Histidin
i.d.R.	in der Regel
IFN γ	Interferon gamma
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

k	Kilo
Ka	Kalium
Kann	Kanamycin
kb	Kilobasen
l	Liter
<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase Gen
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
μ	mikro
m	Meter, milli
M	Molar (Mol pro Liter)
Mg	Magnesium
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min	Minute
mol	Mole ($6,023 \times 10^{23}$)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nano, Anzahl
Na	Natrium
NB	Neuroblastom
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
OMS	Opsoklonus-Myoklonus Syndrom
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNS	Paraneoplastisches Neurologisches Syndrom
RA	Retinolsäure
RBS	Ribosomale-Bindungs-Stelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	ribosomale Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolution per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
W.	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

- Adamus G, Amundson D, Seigel GM, Machnicki M (1998) Anti-enolase-alpha autoantibodies in cancer-associated retinopathy: epitope mapping and cytotoxicity on retinal cells. *J Autoimmun* 11:671-7
- Albert ML, Darnell RB (2004) Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 4:36-44
- Altman AJ, Baehner RL (1976) Favorable prognosis for survival in children with coincident opso-myoclonus and neuroblastoma. *Cancer* 37:846-52
- Anderson NE, Budde-Steffen C, Wiley RG, Thurman L, Rosenblum MK, Nadeau SE, Posner JB (1988) A variant of the anti-Purkinje cell antibody in a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neurology* 38:1018-26
- Antic D, Lu N, Keene JD (1999) ELAV tumor antigen, Hel-N1, increases translation of neurofilament M mRNA and induces formation of neurites in human teratocarcinoma cells. *Genes Dev* 13:449-61
- Bataller L, Graus F, Saiz A, Vilchez JJ (2001) Clinical outcome in adult onset idiopathic or paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *Brain* 124:437-43
- Bataller L, Rosenfeld MR, Graus F, Vilchez JJ, Cheung NK, Dalmau J (2003) Autoantigen diversity in the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Ann Neurol* 53:347-53
- Beck S, Fuhlhuber V, Krasenbrink I, Tschernatsch M, Kneifel N, Kirsten A, Jaeger C, Kaps M, Preissner KT, Lang B, Rostasy K, Blaes F (2007) IgG subclass distribution of autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *J Neuroimmunol* 185:145-9
- Becker KG, Mattson DH, Powers JM, Gado AM, Biddison WE (1997) Analysis of a sequenced cDNA library from multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* 77:27-38
- Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, Hammerschmidt S (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* 40:1273-87
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23
- Blaes F, Fuhlhuber V, Korfei M, Tschernatsch M, Behnisch W, Rostasy K, Hero B, Kaps M, Preissner KT (2005) Surface-binding autoantibodies to cerebellar neurons in opsoclonus syndrome. *Ann Neurol* 58:313-7
- Blain PG, Nightingale S, Stoddart JC (1982) Strychnine poisoning: abnormal eye movements. *J Toxicol Clin Toxicol* 19:215-7
- Blomhoff HK (2004) Vitamin A regulates proliferation and apoptosis of human T- and B-cells. *Biochem Soc Trans* 32:982-4
- Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR (1991) Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* 71:951-90

- Bogdanos DP, Gilbert D, Bianchi I, Leoni S, Mitry RR, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D (2004) Antibodies to soluble liver antigen and alpha-enolase in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmune Dis* 1:4
- Bray PF, Ziter FA, Lahey ME, Myers GG (1969) The coincidence of neuroblastoma and acute cerebellar encephalopathy. *Trans Am Neurol Assoc* 94:106-9
- Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11:1466-77
- Buckanovich RJ, Posner JB, Darnell RB (1993) Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 11:657-72
- Buckanovich RJ, Yang YY, Darnell RB (1996) The onconeural antigen Nova-1 is a neuron-specific RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies. *J Neurosci* 16:1114-22
- Candler PM, Dale RC, Griffin S, Church AJ, Wait R, Chapman MD, Keir G, Giovannoni G, Rees JH (2006) Post-streptococcal opsoclonus-myoclonus syndrome associated with anti-neuroleukin antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:507-12
- Carpentier AF, Voltz R, DesChamps T, Posner JB, Dalmau J, Rosenfeld MR (1998) Absence of HuD gene mutations in paraneoplastic small cell lung cancer tissue. *Neurology* 50:1919
- Cawley LP, James VL, Minard BJ, Bryant SA (1984) Antibodies to Purkinje cells and peripheral nerve in opoclonia. *Lancet* 1:509-10
- Clerico A, Tenore A, Bartolozzi S, Remotti D, Ruco L, Dominici C, Properzi E, Castello MA (1993) Adrenocorticotrophic hormone-secreting ganglioneuroblastoma associated with opsomyoclonic encephalopathy: a case report with immunohistochemical study. *Med Pediatr Oncol* 21:690-4
- Cohen WJ, Cohen NH (1974) Lithium carbonate, haloperidol, and irreversible brain damage. *Jama* 230:1283-7
- Collins T, Korman AJ, Wake CT, Boss JM, Kappes DJ, Fiers W, Ault KA, Gimbrone MA, Jr., Strominger JL, Pober JS (1984) Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4917-21
- Connolly AM, Pestronk A, Mehta S, Pranzatelli MR, 3rd, Noetzel MJ (1997) Serum autoantibodies in childhood opsoclonus-myoclonus syndrome: an analysis of antigenic targets in neural tissues. *J Pediatr* 130:878-84
- Cooper R, Khakoo Y, Matthay KK, Lukens JN, Seeger RC, Stram DO, Gerbing RB, Nakagawa A, Shimada H (2001) Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: histopathologic features-a report from the Children's Cancer Group. *Med Pediatr Oncol* 36:623-9

- Crowe DL, Kim R, Chandraratna RA (2003) Retinoic acid differentially regulates cancer cell proliferation via dose-dependent modulation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cancer Res* 1:532-40
- Cuadrado A, Navarro-Yubero C, Furneaux H, Kinter J, Sonderegger P, Munoz A (2002) HuD binds to three AU-rich sequences in the 3'-UTR of neuroserpin mRNA and promotes the accumulation of neuroserpin mRNA and protein. *Nucleic Acids Res* 30:2202-11
- Dale RC (2005) Post-streptococcal autoimmune disorders of the central nervous system. *Dev Med Child Neurol* 47:785-91
- Dale RC, Candler PM, Church AJ, Wait R, Pocock JM, Giovannoni G (2006) Neuronal surface glycolytic enzymes are autoantigen targets in post-streptococcal autoimmune CNS disease. *J Neuroimmunol* 172:187-97
- Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB (1990) Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol* 27:544-52
- Dalmau J, Furneaux HM, Rosenblum MK, Graus F, Posner JB (1991) Detection of the anti-Hu antibody in specific regions of the nervous system and tumor from patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *Neurology* 41:1757-64
- Dalmau J, Graus F, Cheung NK, Rosenblum MK, Ho A, Canete A, Delattre JY, Thompson SJ, Posner JB (1995) Major histocompatibility proteins, anti-Hu antibodies, and paraneoplastic encephalomyelitis in neuroblastoma and small cell lung cancer. *Cancer* 75:99-109
- Dalmau J, Posner JB (1994) Neurologic paraneoplastic antibodies (anti-Yo; anti-Hu; anti-Ri): the case for a nomenclature based on antibody and antigen specificity. *Neurology* 44:2241-6
- Darnell RB (1996) Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4529-36
- Darnell RB, Posner JB (2003) Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med* 349:1543-54
- Davidson A, Shefner R, Livneh A, Diamond B (1987) The role of somatic mutation of immunoglobulin genes in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 5:85-108
- Deconinck N, Scaillon M, Segers V, Groswasser JJ, Dan B (2006) Opsoclonus-myoclonus associated with celiac disease. *Pediatr Neurol* 34:312-4
- Dot C, Guigay J, Adamus G (2005) Anti-alpha-enolase antibodies in cancer-associated retinopathy with small cell carcinoma of the lung. *Am J Ophthalmol* 139:746-7
- Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H (2003) Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:721-6
- Dudani AK, Cummings C, Hashemi S, Ganz PR (1993) Isolation of a novel 45 kDa plasminogen receptor from human endothelial cells. *Thromb Res* 69:185-96

- Duester G (2001) Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem Biol Interact* 130-132:469-80
- Ejeskar K, Krona C, Caren H, Zaibak F, Li L, Martinsson T, Ioannou PA (2005) Introduction of in vitro transcribed ENO1 mRNA into neuroblastoma cells induces cell death. *BMC Cancer* 5:161
- Fabris M, Visentini D, De Re V, Picierno A, Maieron R, Cannizzaro R, Villalta D, Curcio F, De Vita S, Tonutti E (2007) Elevated B cell-activating factor of the tumour necrosis factor family in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 42:1434-9
- Fan XC, Steitz JA (1998) Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *Embo J* 17:3448-60
- Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, Giallongo A (2000) ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett* 473:47-52
- Fisher PG, Wechsler DS, Singer HS (1994) Anti-Hu antibody in a neuroblastoma-associated paraneoplastic syndrome. *Pediatr Neurol* 10:309-12
- Fontan PA, Pancholi V, Nociari MM, Fischetti VA (2000) Antibodies to streptococcal surface enolase react with human alpha-enolase: implications in poststreptococcal sequelae. *J Infect Dis* 182:1712-21
- Fühlhuber V (2007) Autoantikörper und deren pathogener Effekt auf neuronale Zellen beim kindlichen Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom. VVB Laufersweiler Verlag
- Fujii A, Yoneda M, Ito T, Yamamura O, Satomi S, Higa H, Kimura A, Suzuki M, Yamashita M, Yuasa T, Suzuki H, Kuriyama M (2005) Autoantibodies against the amino terminal of alpha-enolase are a useful diagnostic marker of Hashimoto's encephalopathy. *J Neuroimmunol* 162:130-6
- Furieux HF, Reich L, Posner JB (1990a) Autoantibody synthesis in the central nervous system of patients with paraneoplastic syndromes. *Neurology* 40:1085-91
- Furieux HM, Rosenblum MK, Dalmau J, Wong E, Woodruff P, Graus F, Posner JB (1990b) Selective expression of Purkinje-cell antigens in tumor tissue from patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *N Engl J Med* 322:1844-51
- Gitlits VM, Toh BH, Sentry JW (2001) Disease association, origin, and clinical relevance of autoantibodies to the glycolytic enzyme enolase. *J Investig Med* 49:138-45
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21:1037-53
- Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Smitt PS, Vedeler C, Verschuuren JJ, Vincent A, Voltz R (2004) Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1135-40

- Greenlee JE, Boyden JW, Pingree M, Brashear HR, Clawson SA, Keeney PM (2001) Antibody types and IgG subclasses in paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Sci* 184:131-7
- Griffin ME, Hamilton BJ, Roy KM, Du M, Willson AM, Keenan BJ, Wang XW, Nichols RC (2004) Post-transcriptional regulation of glucose transporter-1 by an AU-rich element in the 3'UTR and by hnRNP A2. *Biochem Biophys Res Commun* 318:977-82
- Hammack JE, Kimmel DW, O'Neill BP, Lennon VA (1990) Paraneoplastic cerebellar degeneration: a clinical comparison of patients with and without Purkinje cell cytoplasmic antibodies. *Mayo Clin Proc* 65:1423-31
- Hawley SB, Green MA, Miles LA (2000) Discriminating between cell surface and intracellular plasminogen-binding proteins: heterogeneity in profibrinolytic plasminogen-binding proteins on monocytoid cells. *Thromb Haemost* 84:882-90
- Hirsh JK, Quandt FN (1996) Down-regulation of Na channel expression by A23187 in N1E-115 neuroblastoma cells. *Brain Res* 706:343-6
- Honorat J, Antoine JC (2007) Paraneoplastic neurological syndromes. *Orphanet J Rare Dis* 2:22
- Hoog C (1991) Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res* 19:6123-7
- Hughes M, Marsden HB, Palmer MK (1974) Histologic patterns of neuroblastoma related to prognosis and clinical staging. *Cancer* 34:1706-11
- Huq MD, Tsai NP, Gupta P, Wei LN (2006) Regulation of retinal dehydrogenases and retinoic acid synthesis by cholesterol metabolites. *Embo J* 25:3203-13
- Ishikawa R, Sakamoto T, Ando T, Higashi-Fujime S, Kohama K (2003) Polarized actin bundles formed by human fascin-1: their sliding and disassembly on myosin II and myosin V in vitro. *J Neurochem* 87:676-85
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002) *Immunologie*. 5. Auflage. Spektrum, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin
- Joshi S, Guleria RS, Pan J, Dipette D, Singh US (2007) Heterogeneity in retinoic acid signaling in neuroblastomas: Role of matrix metalloproteinases in retinoic acid-induced differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1772:1093-102
- Keene JD (1999) Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5-7
- Keime-Guibert F, Graus F, Fleury A, Rene R, Honorat J, Broet P, Delattre JY (2000) Treatment of paraneoplastic neurological syndromes with antineuronal antibodies (Anti-Hu, anti-Yo) with a combination of immunoglobulins, cyclophosphamide, and methylprednisolone. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 68:479-82
- Kemp EH, Herd LM, Waterman EA, Wilson AG, Weetman AP, Watson PP (2002) Immunoscreening of phage-displayed cDNA-encoded polypeptides identifies B cell targets in autoimmune disease. *Biochem Biophys Res Commun* 298:169-77

- Kinloch A, Tatzer V, Wait R, Peston D, Lundberg K, Donatien P, Moyes D, Taylor PC, Venables PJ (2005) Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:R1421-9
- Kinsbourne (1962) Myoclonic encephalopathy of infants. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 25:271-279
- Kirsten A, Beck S, Fuhlhuber V, Kaps M, Kreutz T, Korfei M, Schmitt S, Preissner KT, Blaes F (2007) New autoantibodies in pediatric opsoclonus myoclonus syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1110:256-60
- Koh PS, Raffensperger JG, Berry S, Larsen MB, Johnstone HS, Chou P, Luck SR, Hammer M, Cohn SL (1994) Long-term outcome in children with opsoclonus-myoclonus and ataxia and coincident neuroblastoma. *J Pediatr* 125:712-6
- Kollnberger SD, Gutierrez-Castaneda B, Foster-Cuevas M, Corteyn A, Parkhouse RM (2002) Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody. *J Gen Virol* 83:1331-42
- Kondo N, Kasahara K, Kameyama T, Suzuki Y, Shimozawa N, Tomatsu S, Nakashima Y, Hori T, Yamagishi A, Ogawa T, et al. (1994) Intravenous immunoglobulins suppress immunoglobulin productions by suppressing Ca(2+)-dependent signal transduction through Fc gamma receptors in B lymphocytes. *Scand J Immunol* 40:37-42
- Korfei M, Fuhlhuber V, Schmidt-Woll T, Kaps M, Preissner KT, Blaes F (2005) Functional characterisation of autoantibodies from patients with pediatric opsoclonus-myoclonus-syndrome. *J Neuroimmunol* 170:150-7
- Kostulas VK, Link H, Lefvert AK (1987) Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal fluid. Principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients. *Arch Neurol* 44:1041-4
- Lampson LA, Fisher CA, Whelan JP (1983) Striking paucity of HLA-A, B, C and beta 2-microglobulin on human neuroblastoma cell lines. *J Immunol* 130:2471-8
- Laurie DJ, Seeburg PH, Wisden W (1992) The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* 12:1063-76
- Le Pottier L, Bendaoud B, Dueymes M, Daridon C, Youinou P, Shoenfeld Y, Pers JO (2007) BAFF, a new target for intravenous immunoglobulin in autoimmunity and cancer. *J Clin Immunol* 27:257-65
- Liden M, Eriksson U (2006) Understanding retinol metabolism: structure and function of retinol dehydrogenases. *J Biol Chem* 281:13001-4
- Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, Rosenblum MK, Wray SH, Schold SC, Jr., Glantz MJ, Jaekle KA, Biran H, Lesser M, et al. (1991) Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol* 29:241-51
- Maden M (2001) Role and distribution of retinoic acid during CNS development. *Int Rev Cytol* 209:1-77

- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000) Brock Mikrobiologie, Spektrum , Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin
- Magrys A, Anekonda T, Ren G, Adamus G (2007) The role of anti-alpha-enolase auto-antibodies in pathogenicity of autoimmune-mediated retinopathy. *J Clin Immunol* 27:181-92
- Manley GT, Smitt PS, Dalmau J, Posner JB (1995) Hu antigens: reactivity with Hu antibodies, tumor expression, and major immunogenic sites. *Ann Neurol* 38:102-10
- Marangos PJ, Zis AP, Clark RL, Goodwin FK (1978) Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons. *Brain Res* 150:117-33
- Marusich MF, Furneaux HM, Henion PD, Weston JA (1994) Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J Neurobiol* 25:143-55
- Messi E, Florian MC, Caccia C, Zanisi M, Maggi R (2008) Retinoic acid reduces human neuroblastoma cell migration and invasiveness: effects on DCX, LIS1, neurofilaments-68 and vimentin expression. *BMC Cancer* 8:30
- Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF (1991) Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 30:1682-91
- Min H, Turck CW, Nikolic JM, Black DL (1997) A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev* 11:1023-36
- Mitchell WG, Davalos-Gonzalez Y, Brumm VL, Aller SK, Burger E, Turkel SB, Borchert MS, Hollar S, Padilla S (2002) Opsoclonus-ataxia caused by childhood neuroblastoma: developmental and neurologic sequelae. *Pediatrics* 109:86-98
- Mitchell WG, Snodgrass SR (1990) Opsoclonus-ataxia due to childhood neural crest tumors: a chronic neurologic syndrome. *J Child Neurol* 5:153-8
- Mora JR, Iwata M, von Andrian UH (2008) Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*
- Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Wahl SM (1992) Cytokines and neuropathology. *Trends Pharmacol Sci* 13:286-91
- Morriss-Kay GM, Ward SJ (1999) Retinoids and mammalian development. *Int Rev Cytol* 188:73-131
- Mosca M, Chimenti D, Pratesi F, Baldini C, Anzilotti C, Bombardieri S, Migliorini P (2006) Prevalence and clinico-serological correlations of anti-alpha-enolase, anti-C1q, and anti-dsDNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 33:695-7
- Musunuru K, Darnell RB (2001) Paraneoplastic neurologic disease antigens: RNA-binding proteins and signaling proteins in neuronal degeneration. *Annu Rev Neurosci* 24:239-62

- Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S (1994) Plasminogen binds specifically to alpha-enolase on rat neuronal plasma membrane. *J Neurochem* 63:2048-57
- Nakajima K, Nagata K, Hamanoue M, Takemoto N, Shimada A, Kohsaka S (1993) Plasminogen-binding protein associated with the plasma membrane of cultured embryonic rat neocortical neurons. *FEBS Lett* 333:223-8
- Napoli JL (1996a) Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 80:S52-62
- Napoli JL (1996b) Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *Faseb J* 10:993-1001
- Narahashi T, Carter DB, Frey J, Ginsburg K, Hamilton BJ, Nagata K, Roy ML, Song JH, Tatebayashi H (1995) Sodium channels and GABAA receptor-channel complex as targets of environmental toxicants. *Toxicol Lett* 82-83:239-45
- Noetzel MJ, Cawley LP, James VL, Minard BJ, Agrawal HC (1987) Anti-neurofilament protein antibodies in opsoclonus-myoclonus. *J Neuroimmunol* 15:137-45
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-21
- Ochi H, Horiuchi I, Araki N, Toda T, Araki T, Sato K, Murai H, Osoegawa M, Yamada T, Okamura K, Ogino T, Mizumoto K, Yamashita H, Saya H, Kira J (2002) Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. *FEBS Lett* 528:197-202
- Oguro K, Kobayashi J, Aiba H, Hojo H (1997) Opsoclonus-myoclonus syndrome with abnormal single photon emission computed tomography imaging. *Pediatr Neurol* 16:334-6
- Palazzolo MJ, Hamilton BA, Ding DL, Martin CH, Mead DA, Mierendorf RC, Raghavan KV, Meyerowitz EM, Lipshitz HD (1990) Phage lambda cDNA cloning vectors for subtractive hybridization, fusion-protein synthesis and Cre-loxP automatic plasmid subcloning. *Gene* 88:25-36
- Pancholi V (2001) Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci* 58:902-20
- Pancholi V, Fischetti VA (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* 273:14503-15
- Perrone-Bizzozero N, Bolognani F (2002) Role of HuD and other RNA-binding proteins in neural development and plasticity. *J Neurosci Res* 68:121-6
- Piast M, Kustrzeba-Wojcicka I, Matusiewicz M, Banas T (2005) Molecular evolution of enolase. *Acta Biochim Pol* 52:507-13
- Pingoud A, Urbanke C (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie. De-Gruyter-Lehrbuch*, Berlin; New York
- Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL (1995) The cell biology of the plasminogen system. *Faseb J* 9:939-45
- Posner JB, Furneaux HM (1990) Paraneoplastic syndromes. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 68:187-219

- Pranzatelli MR (1996) The immunopharmacology of the opsoclonus-myoclonus syndrome. *Clin Neuropharmacol* 19:1-47
- Pranzatelli MR, Tate ED, Dukart WS, Flint MJ, Hoffman MT, Oksa AE (2005) Sleep disturbance and rage attacks in opsoclonus-myoclonus syndrome: response to trazodone. *J Pediatr* 147:372-8
- Pranzatelli MR, Tate ED, Hoefgen ER, Swan JA, Colliver JA (2008) Therapeutic down-regulation of central and peripheral B-cell-activating factor (BAFF) production in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *Cytokine* 44:26-32
- Pranzatelli MR, Tate ED, Wheeler A, Bass N, Gold AP, Griebel ML, Gumbinas M, Heydemann PT, Holt PJ, Jacob P, Kotagal S, Minarcik CJ, Schub HS (2002) Screening for autoantibodies in children with opsoclonus-myoclonus-ataxia. *Pediatr Neurol* 27:384-7
- Pranzatelli MR, Travelstead AL, Tate ED, Allison TJ, Moticka EJ, Franz DN, Nigro MA, Parke JT, Stumpf DA, Verhulst SJ (2004a) B- and T-cell markers in opsoclonus-myoclonus syndrome: immunophenotyping of CSF lymphocytes. *Neurology* 62:1526-32
- Pranzatelli MR, Travelstead AL, Tate ED, Allison TJ, Verhulst SJ (2004b) CSF B-cell expansion in opsoclonus-myoclonus syndrome: a biomarker of disease activity. *Mov Disord* 19:770-7
- Pratesi F, Moscato S, Sabbatini A, Chimenti D, Bombardieri S, Migliorini P (2000) Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders. *J Rheumatol* 27:109-15
- Rapoport SI, Hori M, Klatzo I (1971) Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Science* 173:1026-8
- Rattner JB, Martin L, Waisman DM, Johnstone SA, Fritzler MJ (1991) Autoantibodies to the centrosome (centriole) react with determinants present in the glycolytic enzyme enolase. *J Immunol* 146:2341-4
- Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, Miles LA (1995) The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem* 227:407-15
- Reichlin M (1998) 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* 11:557-61
- Rudnick E, Khakoo Y, Antunes NL, Seeger RC, Brodeur GM, Shimada H, Gerbing RB, Stram DO, Matthay KK (2001) Opsoclonus-myoclonus-ataxia syndrome in neuroblastoma: clinical outcome and antineuronal antibodies-a report from the Children's Cancer Group Study. *Med Pediatr Oncol* 36:612-22
- Russo C, Cohn SL, Petruzzi MJ, de Alarcon PA (1997) Long-term neurologic outcome in children with opsoclonus-myoclonus associated with neuroblastoma: a report from the Pediatric Oncology Group. *Med Pediatr Oncol* 28:284-8
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, USA

- Sanz I, Capra JD (1988) The genetic origin of human autoantibodies. *J Immunol* 140:3283-5
- Saulot V, Vittecoq O, Charlionet R, Fardellone P, Lange C, Marvin L, Machour N, Le Loet X, Gilbert D, Tron F (2002) Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46:1196-201
- Schmitz S (2007) *Der Experimentator – Zellkultur*. Elsevier GmbH Spektrum, Akademischer Verlag
- Schütt C, Bröker B (2006) *Grundwissen Immunologie*. Elsevier GmbH München, Spektrum, Akademischer Verlag
- Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* 313:1111-6
- Siligardi G, Hu B, Panaretou B, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C (2004) Co-chaperone regulation of conformational switching in the Hsp90 ATPase cycle. *J Biol Chem* 279:51989-98
- Sioud M, Hansen MH (2001) Profiling the immune response in patients with breast cancer by phage-displayed cDNA libraries. *Eur J Immunol* 31:716-25
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85
- Stefansson K, Marton LS, Dieperink ME, Molnar GK, Schlaepfer WW, Helgason CM (1985) Circulating autoantibodies to the 200,000-dalton protein of neurofilaments in the serum of healthy individuals. *Science* 228:1117-9
- Stephensen CB, Rasooly R, Jiang X, Ceddia MA, Weaver CT, Chandraratna RA, Bucy RP (2002) Vitamin A enhances in vitro Th2 development via retinoid X receptor pathway. *J Immunol* 168:4495-503
- Stephenson JB, Graham-Pole J, Ogg L, Cochran AJ (1976) Reactivity to neuroblastoma extracts in childhood cerebellar encephalopathy ("dancing eyes" syndrome). *Lancet* 2:975-6
- Sternlicht H, Farr GW, Sternlicht ML, Driscoll JK, Willison K, Yaffe MB (1993) The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9422-6
- Subramanian A, Miller DM (2000) Structural analysis of alpha-enolase. Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem* 275:5958-65
- Tan EM (1991) Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67:841-2
- Tuchman RF, Alvarez LA, Kantrowitz AB, Moser FG, Llana J, Moshe SL (1989) Opsoclonus-myoclonus syndrome: correlation of radiographic and pathological observations. *Neuroradiology* 31:250-2

- Tyndale RF, Hales TG, Olsen RW, Tobin AJ (1994) Distinctive patterns of GABAA receptor subunit mRNAs in 13 cell lines. *J Neurosci* 14:5417-28
- Vernino S, O'Neill BP, Marks RS, O'Fallon JR, Kimmel DW (2004) Immunomodulatory treatment trial for paraneoplastic neurological disorders. *Neuro Oncol* 6:55-62
- Wagner LA, Weiss RB, Driscoll R, Dunn DS, Gesteland RF (1990) Transcriptional slippage occurs during elongation at runs of adenine or thymine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 18:3529-35
- Weleber RG, Watzke RC, Shults WT, Trzuppek KM, Heckenlively JR, Egan RA, Adamus G (2005) Clinical and electrophysiologic characterization of paraneoplastic and autoimmune retinopathies associated with anti-oligodendrocyte antibodies. *Am J Ophthalmol* 139:780-94
- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH (1992) The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci* 12:1040-62
- Wood WI, Gitschier J, Lasky LA, Lawn RM (1985) Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:1585-8
- Xi J, Yang Z (2008) Expression of RALDHs (ALDH1As) and CYP26s in human tissues and during the neural differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cell. *Gene Expr Patterns* 8:438-42
- Yamamoto M, Ullman D, Drager UC, McCaffery P (1999) Postnatal effects of retinoic acid on cerebellar development. *Neurotoxicol Teratol* 21:141-6
- Yang YY, Yin GL, Darnell RB (1998) The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13254-9
- Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, Drager UC (1996) Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem* 240:15-22
- Zinkernagel (1993) Immunity to viruses. New York Raven Press In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*:1211-50
- Ziter FA, Bray PF, Cancilla PA (1979) Neuropathologic findings in a patient with neuroblastoma and myoclonic encephalopathy. *Arch Neurol* 36:51

Produktbezogene Bücher:

Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins, Juni 2006, Rev. 03, Macherey-Nagel

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

Präsentationen

Ort	International Congress of Autoimmunity, Sorrento, Italien
Art	Vortrag
Thema	New Autoantibodies in Pediatric Opsoclonus- Myoclonus Syndrome
Ort	Biochemisches Institut, Fachbereich Medizin, Gießen
Art	Vortrag
Thema	Präsentation der Ergebnisse in einem Institutsse- minar
Ort	Biochemisches Institut und Neurologische Klinik, Gießen
Art	Vortrag
Thema	Präsentation der Ergebnisse in einem Laborseminar

Publikationen

2007

Beck S, Fuhlhuber V, Krasenbrink I, Tschernatsch M, Kneifel N, Kirsten A, Jaeger C, Kaps M, Preissner KT, Lang B, Rostasy K, Blaes F (2007) IgG subclass distribution of autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. J Neuroimmunol 185:145-9

2007

Kirsten A, Beck S, Fuhlhuber V, Kaps M, Kreutz T, Korfei M, Schmitt S, Preissner KT, Blaes F (2007) New autoantibodies in pediatric opsoclonus myoclonus syndrome. Ann N Y Acad Sci 1110:256-60

Danke...

möchte ich an dieser Stelle allen sagen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben, mir mit Rat und Tat zur Seite standen und letztendlich zur Verwirklichung dieser Arbeit beigetragen haben.

- PD Dr. med. Franz Blaes, der mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte und jederzeit für Fragen, Ratschläge und konstruktive Kritik zur Verfügung stand.
- Prof. Dr. Klaus T. Preissner für die Möglichkeit, diese Arbeit am Biochemischen Institut anzufertigen und die Anmerkungen und Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Prof. Dr. rer. nat. Michael U. Martin für die freundliche Übernahme der Erstkorrektur meiner Dissertation außerhalb des Fachbereiches Biologie und Chemie und das Interesse an meiner Arbeit.
- Meinem Michael für die Unterstützung, Geduld und oft nötige Aufmunterung während der ganzen Zeit. Du bist immer für mich da und hast ein offenes Ohr für meine Probleme und Sorgen. Danke dass du auch meine launischen Phasen ertragen und immer an mich geglaubt hast. Wir sind halt ein Dreamteam.
- Carolin für die Unterstützung und Korrektur meiner Arbeit, mit all den Anregungen und Fragen, für die ich dir sehr sehr dankbar bin! Du hattest immer ein offenes Ohr für mich und hast mich oft motiviert. Unsere Freundschaft bedeutet mir sehr viel.
- Silvia als kompetente Korrekteuse mit guten Anregungen und Ratschlägen, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke für dein Interesse an meiner Arbeit und das geduldige Beantworten all meiner Fragen.
- meiner wunderbaren Familie (allen Kirstens, Röders) und meinem Patenonkel Uli danke ich für die Unterstützung, Hilfe und immer ein offenes Ohr während der ganzen Zeit. Danke, dass ihr mir vertraut und immer an mich geglaubt habt.
- Markus für die Hilfe und Unterstützung. Das lustige Arbeitsklima mit dir und immer ein Spruch auf den Lippen hat so Einiges leichter gemacht.
- Uwe für das tolle Arbeitsklima, die Unterstützung, Hilfe und das Interesse an meiner Arbeit. Danke für die Geduld und immer ein offenes Ohr für all meine Fragen und Probleme.

- Martina für die tolle Übergabe des Themas, die Unterstützung und geduldige Hilfe bei all meinen Fragen.
- Lars für die Geduld mit all meinen Fragen, immer ein offenes Ohr und für die guten Anregungen und Ideen, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Nadine für die tolle Hilfe mit der Phagenbank und das geduldige Beantworten all meiner Fragen.
- Gosia für die Hilfe und Unterstützung.
- Susanne, Thomas, Bärbel, Ute, Sandip, Karin, Aya, Ewa, Miwa, Anke und Edith für die schöne Zeit, eure Hilfe und die tollen Gespräche. Ihr werdet mir fehlen.
- Nina für die Hilfe, Unterstützung, immer ein offenes Ohr und die vielen aufbauenden Gespräche und die tolle Zusammenarbeit. Das wird mir fehlen.
- Sigggi, Michael und Tina für die Hilfe sowie tolle, unkomplizierte und schnelle Umsetzung meiner Ideen, welche zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Jutta, Sandra, Edith, Steffi, Pratibha, Daniel für die Hilfe, Unterstützung und eine tolle Zusammenarbeit.
- Allen aus den Arbeitsgruppen AG Geyer, AG Schmitz und AG Beck für die Hilfe und Unterstützung während der ganzen Zeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Antje Kirsten, geboren am 02.11.1978 in Räckelwitz, dass ich die vorliegende Dissertation, gemäß der Promotionsordnung (vom 05.02.1990), selbständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen Quellen benutzt habe. Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Ort, Datum

Antje Kirsten