

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Detektion von Autoantikörpern gegen Cortactin und Agrin im Serum
von Patient*innen mit Myasthenia gravis**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Antonia Hemprich

aus Leipzig

Würzburg, März 2022

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler

Korreferentin: Prof. Dr. med. habil. rer. nat. Carmen Villmann

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Erkrankung Myasthenia gravis	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Symptomatik	1
1.1.4	Pathophysiologie	2
1.1.5	Diagnostik	4
1.1.6	Therapie	5
1.2	Cortactin und Agrin als Proteine an der neuromuskulären Endplatte	6
1.2.1	Signalkaskade zur Aggregation von Acetylcholinrezeptoren	6
1.2.2	Cortactin	7
1.2.3	Agrin	9
1.3	Eigenschaften von Autoantikörpern bei Myasthenia gravis	11
1.3.1	IgG-Subklassen bei Myasthenia gravis	11
1.3.2	Autoantikörper bei Myasthenia gravis und das Komplementsystem	12
1.4	Ziele der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Ethikvotum	20
2.2	Geschlechtergerechte Sprache	20
2.3	Patient*innen und Kontrollpersonen	21
2.3.1	Probengewinnung	21
2.3.2	Patient*innen	21
2.3.3	Kontrollpersonen	23
2.4	Statistische Auswertung und verwendete Programme	23
2.5	ELISA	23
2.5.1	Funktionsprinzip und zugrundeliegendes Protokoll	23
2.5.2	Anti-Cortactin-ELISA	24
2.5.3	Anti-Agrin-ELISA	25
2.5.4	Auswertungsprinzip der ELISAs	25
2.5.5	Titerbestimmungen	26
2.5.6	Subklassenbestimmungen	27
2.5.7	Komplementbindungsversuche	27

2.5.8 Gesamt-IgG-Bestimmungen	28
2.6 Bindungsversuche an transfizierten HEK-293-Zellen	28
2.6.1 Kultivierung	29
2.6.2 Transfektion	29
2.6.3 Färbung	30
2.6.4 Bindungsversuche an Cortactin-transfizierten HEK-293-Zellen.....	31
2.6.5 Bindungsversuche an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen	31
2.6.6 Auswertungsprinzip der Bindungsversuche an transfizierten HEK-293- Zellen	31
3 Ergebnisse	35
3.1 Detektion und Charakterisierung von Anti-Cortactin-Autoantikörpern	35
3.1.1 Anti-Cortactin-ELISA	35
3.1.2 Bestimmung der Titer der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren	36
3.1.3 Bestimmung der IgG-Subklassen der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren.....	37
3.1.4 Komplementbindungsversuche der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren.....	38
3.1.5 Bestätigung der Spezifität mittels Bindungsversuchen an Cortactin- transfizierten HEK-293-Zellen	39
3.1.6 Bestimmung des Gesamt-IgG-Gehalts aller Proben.....	44
3.1.7 Wiederholte Serumentnahme und -untersuchung bei den Patienten 1, 2 und 3 im Studienverlauf.....	45
3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren.....	46
3.2 Klinische Merkmale der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen	47
3.3 Keine Detektion von Anti-Agrin-Autoantikörpern	52
3.3.1 Anti-Agrin-ELISA	52
3.3.2 Validierung des Anti-Agrin-ELISAs	53
3.3.3 Bindungsversuche an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen	54
4 Diskussion	58
4.1 Cortactin und Agrin als neue Antigene bei Myasthenia gravis.....	58
4.2 Prävalenzen der Autoantikörper und angewandte Detektionsmethoden.....	59
4.2.1 Anti-Cortactin-Autoantikörper	59

4.2.2	Anti-Agrin-Autoantikörper	61
4.2.3	Serum-spezifischer Hintergrund im ELISA	62
4.3	Pathogenität der Autoantikörper	64
4.3.1	Beweis der pathogenetischen Bedeutung	64
4.3.2	Anti-Cortactin-Autoantikörper	64
4.3.3	Anti-Agrin-Autoantikörper	66
4.4	Klinische Charakteristika von Subgruppen innerhalb der Myasthenia gravis	67
4.4.1	Anti-Cortactin-Autoantikörper positive Patient*innen.....	69
4.4.2	Anti-Agrin-Autoantikörper positive Patient*innen	71
4.5	Ausblick	72
5	Zusammenfassung.....	74
6	Literaturverzeichnis.....	75

Appendix

- I. Abkürzungsverzeichnis**
- II. Abbildungsverzeichnis**
- III. Tabellenverzeichnis**
- IV. Danksagung**
- V. Lebenslauf**
- VI. Eigene Veröffentlichung**

1 Einleitung

1.1 Die Erkrankung Myasthenia gravis

1.1.1 Definition

Myasthenia gravis ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Störung der Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte zu einer Schwäche der Muskulatur führt. Sie ist mit verschiedenen Autoantikörpern assoziiert, die sich gegen Proteine der postsynaptischen Membran richten (Gilhus et al. 2015).

1.1.2 Epidemiologie

Die Erkrankung weist eine weltweite Inzidenz von etwa 30/1.000.000 Einwohner*innen auf. Dabei kam es zu einem Anstieg im Verlauf der letzten Jahrzehnte, der vermutlich durch eine verbesserte Diagnostik der Erkrankung zu erklären ist (McGrogan et al. 2010). Die Prävalenz liegt bei etwa 77-200/1.000.000 Einwohner*innen. Bezüglich der Altersverteilung steigt die Inzidenz mit zunehmendem Alter an und zeigt einen Gipfel bei 60-80 Jahren. Bei Frauen gibt es noch einen zusätzlichen Erkrankungsgipfel im jungen Erwachsenenalter (Phillips 2004, Carr et al. 2010). Das Verhältnis der Prävalenz von erkrankten Frauen zu Männern unter 50 Jahren betrug in einer Studie innerhalb der norwegischen Bevölkerung 3:1 (Andersen et al. 2010). In der Gruppe der älteren Neuerkrankten sind Männer stärker vertreten (Kalb et al. 2002).

1.1.3 Symptomatik

Das Hauptsymptom der Myasthenia gravis ist eine meist belastungsabhängige Muskelschwäche. Bei der Erstmanifestation der Erkrankung kommt es in 85% der Fälle zu einer Beeinträchtigung der äußeren Augenmuskulatur, die zu fluktuierenden Doppelbildern und Ptose führen kann. Bei 17% dieser Patient*innen bleibt die Erkrankung auf die äußeren Augenmuskeln und den Musculus orbicularis oculi beschränkt. Die Bezeichnung dieser Verlaufsform lautet isoliert-okulär. Die Symptome verschlechtern sich typischerweise im Tagesverlauf (Grob et al. 2008). Der Übergang in eine generalisierte Form der Erkrankung erfolgt meistens innerhalb von zwei Jahren nach Erstmanifestation. Dabei kann zusätzlich oder ausschließlich die bulbäre, faziale, axiale und Extremitätenmuskulatur betroffen sein. Daraus folgen Symptome wie beispielsweise Dysarthrie, Dysphagie, unvollständiger Lidschluss, Kopfhaltenschwäche und proximal

betonte Muskelschwäche. Eine Beeinträchtigung der Atemmuskulatur kann zu lebensbedrohlichen Ateminsuffizienzen führen und erfordert sofortige therapeutische Maßnahmen (Meriggioli et al. 2009).

1.1.4 Pathophysiologie

Auf der Suche nach der Ursache der Myasthenia gravis konnten in den 1970er Jahren erstmals Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor nachgewiesen werden. Sie finden sich im Serum von 80-90% der Patient*innen mit einer generalisierten Verlaufsform (Lindstrom et al. 1976, Vincent et al. 1985). Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind transmembranäre Proteine aus fünf Untereinheiten, die an der postsynaptischen Membran der Endplatte lokalisiert sind und eine entscheidende Funktion in der Erregungsübertragung zwischen Nerv und Muskel übernehmen. Wenn ein Aktionspotential das Ende des Motoneurons erreicht, wird durch die einhergehende Depolarisation Acetylcholin aus seinen Vesikeln freigesetzt. Es diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an die Acetylcholinrezeptoren an der postsynaptischen Membran. Daraufhin kommt es zur Öffnung dieser ligandengesteuerten Ionenkanäle und der Kationeneinstrom in die Muskelzellen führt schließlich wiederum durch Depolarisation zur deren Kontraktion. Bei der Myasthenia gravis kommt es durch verschiedene Prozesse zur Reduktion der Acetylcholinrezeptoren und Störungen an der neuromuskulären Endplatte, die in Muskelschwäche und –ermüdung resultieren (Sine 2012, Huijbers et al. 2014). Diese verantwortlichen Prozesse werden im nachfolgenden Absatz beschrieben. Im Jahr 2001 wurden dann Autoantikörper gegen die Muskel-spezifische Kinase (MuSK), ein weiteres Protein an der neuromuskulären Endplatte, beschrieben. Sie sind bei 40-70% der Patient*innen ohne Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper nachweisbar (Hoch et al. 2001, Sanders et al. 2003). Bei Patient*innen, die weder Anti-Acetylcholinrezeptor- noch Anti-MuSK-Autoantikörper zeigen, konnte in 2-50% das lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) als eine weitere Zielstruktur von Autoantikörpern an der Endplatte identifiziert werden (Higuchi et al. 2011, Pevzner et al. 2012, Zhang et al. 2012). Die unmittelbare Pathogenität der Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor, MuSK und LRP4 ist jeweils mittels passiver Autoantikörpertransfers bzw. an Tiermodellen mit experimenteller Myasthenia gravis bewiesen worden (Oda et al. 1981, Klooster et al. 2012, Shen et al. 2013, Gilhus et al. 2015). Bei Betrachtung der prozentualen Vorkommen der Autoantikörper verbleiben

folglich 3-5% der Patient*innen, bei denen keiner der drei oben genannten nachweisbar ist. Dies wird als seronegative Myasthenia gravis bezeichnet (Gilhus 2016). Neben Anti-Acetylcholinrezeptor-, Anti-MuSK- und Anti-LRP4-Autoantikörpern wurden auch Autoantikörper gegen verschiedene Muskelproteine wie zum Beispiel Titin und den Ryanodinrezeptor beschrieben. Sie kommen aber meist nur in Kombination mit den anderen Autoantikörpern vor und spielen daher diagnostisch eine untergeordnete Rolle (Romi et al. 2005).

Die pathogenen Autoantikörper beeinträchtigen die Funktion der postsynaptischen Proteine durch verschiedene Mechanismen. Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper führen durch eine Quervernetzung der Acetylcholinrezeptoren zu deren beschleunigten Abbau durch Endozytose. Außerdem verursachen sie durch Komplementaktivierung die Zerstörung der postsynaptischen Membran und blockieren die Acetylcholin-Bindung am Rezeptor (Verschuuren et al. 2013). Die Einteilung der Immunglobulin G (IgG) in Subklassen spielt eine wichtige Rolle und wird in Kapitel 1.3.1 näher beleuchtet. Die pathogenetisch relevanten Anti-MuSK-Autoantikörper gehören zur nicht-komplementaktivierenden IgG4-Subklasse im Gegensatz zu IgG1 und IgG3 bei Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern. Anti-MuSK-Autoantikörper zerstören die prä- und postsynaptische Ultrastruktur der neuromuskulären Endplatte und vermindern die Expression von Acetylcholinrezeptoren (Cole et al. 2010, Richman et al. 2012, Querol et al. 2013). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sie mit der Bindung der Acetylcholinesterase an der neuromuskulären Endplatte interferieren, wodurch das schlechte Ansprechen von Anti-MuSK-Autoantikörper positiven Patient*innen auf Acetylcholinesterasehemmer erklärt werden könnte (Kawakami et al. 2011, Morsch et al. 2013). Das Wirkprinzip von Acetylcholinesterasehemmern wird in Kapitel 1.1.5 erläutert. Autoantikörper gegen LRP4 blockieren durch die Bindung an LRP4 die Signalkaskade, die die Formierung von Acetylcholinrezeptoren ermöglicht. Außerdem lösen sie eine Komplementaktivierung aus und verursachen Schäden an der neuromuskulären Endplatte (Shen et al. 2013, Gilhus et al. 2015).

In der Pathophysiologie der Myasthenia gravis spielt auch der Thymus eine Rolle. So zeigen viele Patient*innen pathologische Thymusveränderungen und 10-15% sogar Thymome. Fast alle dieser Patient*innen mit einer paraneoplastischen Myasthenia gravis

haben eine generalisierte Verlaufsform mit Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper-Nachweis. Entgegengesetzt entwickeln etwa 30% der Patient*innen mit einem Thymom eine Myasthenia gravis (Marx et al. 2013).

1.1.5 Diagnostik

Neben einer gezielten Anamnese bezüglich Myasthenie-typischer Symptome, erfolgt die weitere Diagnostik in verschiedenen Bereichen. In der körperlichen Untersuchung lassen sich beispielsweise Belastungstests durchführen: Der Simpson-Test fällt positiv aus, wenn sich bei der untersuchten Person beim Aufwärtsblick über eine Minute eine Ptose entwickelt oder verstärkt. Das Cogan-Zeichen beschreibt eine kurze, transiente Zuckung des Augenlids nach entlastendem Abwärtsblick mit anschließendem Aufwärtsblick (Toyka 2006). Der modifizierte Besinger-Toyka-Score umfasst die Haltezeiten der bevorzugt befallenen Muskulatur (Arm-, Bein- und Kopfhaltemuskulatur), die mittels Spirometer bestimmte Vitalkapazität und die Symptome einer Schwäche der okulären, faszialen und bulbären Muskelgruppen (Besinger et al. 1983). Neben den Belastungstests kann auch der Kältetest auf eine Myasthenia gravis hinweisen. Dabei verbessert sich beispielsweise die Ptose, nachdem die Augenpartie mit einem Eisbeutel gekühlt wurde (Reddy et al. 2007). In der Labordiagnostik werden Autoantikörper vor allem gegen den Acetylcholinrezeptor, aber auch gegen MuSK und LRP4 bestimmt, da sie sehr sensitive und spezifische Biomarker für die Erkrankung sind (Zisimopoulou et al. 2013). Bei Patient*innen mit okulärer Myasthenia gravis sind nur in der Hälfte der Fälle Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor nachweisbar (Kerty et al. 2014). Von pharmakologischer Seite lassen sich ebenfalls Indizien für eine Myasthenia gravis finden. Cholinesterasehemmer vermindern den Abbau von Acetylcholin im synaptischen Spalt. Somit führen sie zu einer erhöhten Verfügbarkeit von Acetylcholin und verbessern dadurch die Muskelschwäche. Teil dieser Substanzgruppe sind Pyridostigmin, Edrophonium und Neostigmin, die sich in ihren Halbwertzeiten und Nebenwirkungen unterscheiden. Das Ansprechen auf diese Pharmaka ist so spezifisch, dass sie in der Diagnostik der Myasthenia gravis eingesetzt werden (Gilhus et al. 2015). Elektrophysiologische Untersuchungen können weitere Hinweise auf eine Myasthenia gravis geben. So führt eine repetitive, supramaximale Nervenstimulation mit 3 Hz zu einem pathologischen Dekrement. Auch in der Einzelfaser-Elektromyografie sind Auffälligkeiten nachweisbar (Schumm et al. 1984, Oh et al. 1992). Bei jeder Myasthenie-

Erstdiagnose wird ein CT oder MRT des Mediastinums durchgeführt, um das mögliche Vorliegen eines Thymoms zu erkennen (Jordan et al. 2016).

1.1.6 Therapie

In der Vergangenheit bedeutete Myasthenia gravis oft schwere, chronische Einschränkungen für die Patient*innen und hatte eine hohe Mortalität. Mittlerweile hat die Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten und der Intensivbehandlung die Langzeitprognose deutlich verbessert. Die Lebenserwartung von Myasthenie-Patient*innen ist nahezu uneingeschränkt (Skeie et al. 2010). Als symptomatische Therapie ist der Cholinesterasehemmer Pyridostigmin (Handelsname Kalymin) die erste Wahl bei allen Formen der Myasthenia gravis. Der Wirkmechanismus wurde bereits in Kapitel 1.1.5 erläutert. Die tägliche Dosis wird basierend auf der Schwere der Symptomatik und der Toleranz der medikamentösen Nebenwirkungen auf das autonome Nervensystem angepasst. Es sind keine negativen Effekte einer Langzeittherapie bekannt (Sanders et al. 2016). Neben der rein symptomatischen Therapie wird im Regelfall auch eine Immunsuppression eingeleitet, da dies eine nachhaltigere Symptomkontrolle bewirkt und bei rein okulären Verlaufsformen die Gefahr der Generalisierung reduziert (Sommer et al. 1997). In Beobachtungsstudien konnte eine Remission oder starke klinische Besserung unter der Therapie mit Prednisolon bei 70-80% der Patient*innen gezeigt werden (Pascuzzi et al. 1984). Es muss aber immer auch auf die Nebenwirkungen einer Langzeitsteroidtherapie geachtet werden (Skeie et al. 2010). Wenn eine langfristige Immunsuppression nötig ist, wird meist Azathioprin mit Prednisolon kombiniert. Diese zweigleisige Therapie ist wirksamer als eine alleinige Steroidtherapie und führt zu geringeren Nebenwirkungen (Palace et al. 1998). Die Immunsuppressiva Mycophenolatmofetil, Rituximab, Ciclosporin, Tacrolimus und Methotrexat sind weitere therapeutische Optionen, wenn noch kein ausreichender klinischer Effekt durch Azathioprin und Prednisolon erreicht werden konnte (Gilhus et al. 2015). Im Fall einer drastischen Verschlechterung der myasthenen Symptome, die bis zur Ateminsuffizienz bei myasthener Krise führen kann, muss schnell und effizient therapiert werden. Dafür eignen sich sowohl intravenöse Immunglobuline als auch Plasmapherese (Barth et al. 2011, Gilhus 2011). Kürzlich wurde außerdem der monoklonale Anti-C5-Antikörper Eculizumab für therapierefraktäre, generalisierte, Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper positive Myasthenia gravis zugelassen, der das Komplementsystem

inhibiert (Howard et al. 2017). Die Rolle des Komplementsystems bei Myasthenia gravis wird in Kapitel 1.3.2 detailliert besprochen. Weiterhin ist eine Thymektomie für bestimmte Patientengruppen sinnvoll, da sie den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann. Zu diesen Gruppen gehören Patient*innen mit Thymom, aber auch Patient*innen ohne Thymom mit einer early-onset (Erkrankung vor dem 50. Lebensjahr), generalisierten Myasthenia gravis und Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern (Sanders et al. 2016, Wolfe et al. 2016).

1.2 Cortactin und Agrin als Proteine an der neuromuskulären Endplatte

1.2.1 Signalkaskade zur Aggregation von Acetylcholinrezeptoren

Sowohl Cortactin als auch Agrin sind in eine Signalkaskade involviert, die schließlich zur Entwicklung und Differenzierung der neuromuskulären Endplatte führt. Dies beinhaltet auch die Aggregation von Acetylcholinrezeptoren. Bevor in den folgenden Absätzen jeweils im Detail auf den Aufbau und die Funktion der beiden Proteine eingegangen wird, erfolgt zunächst eine kurze Darstellung der Signalkaskade und eine Abbildung der Proteine an der Endplatte. Agrin wird von den Motoneuronen synthetisiert, in den synaptischen Spalt sezerniert und bindet dort an das membranständige LRP4. Der dadurch gebildete tetramere Komplex aktiviert die ebenfalls membranständige Tyrosinkinase MuSK. Durch diesen Mechanismus werden intrazellulär nachgeschaltete Signalkaskaden ausgelöst, die Cortactin beinhalten und schließlich zur Aggregation von Acetylcholinrezeptoren führen (Kim et al. 2008, Zhang et al. 2008, Madhavan et al. 2009).

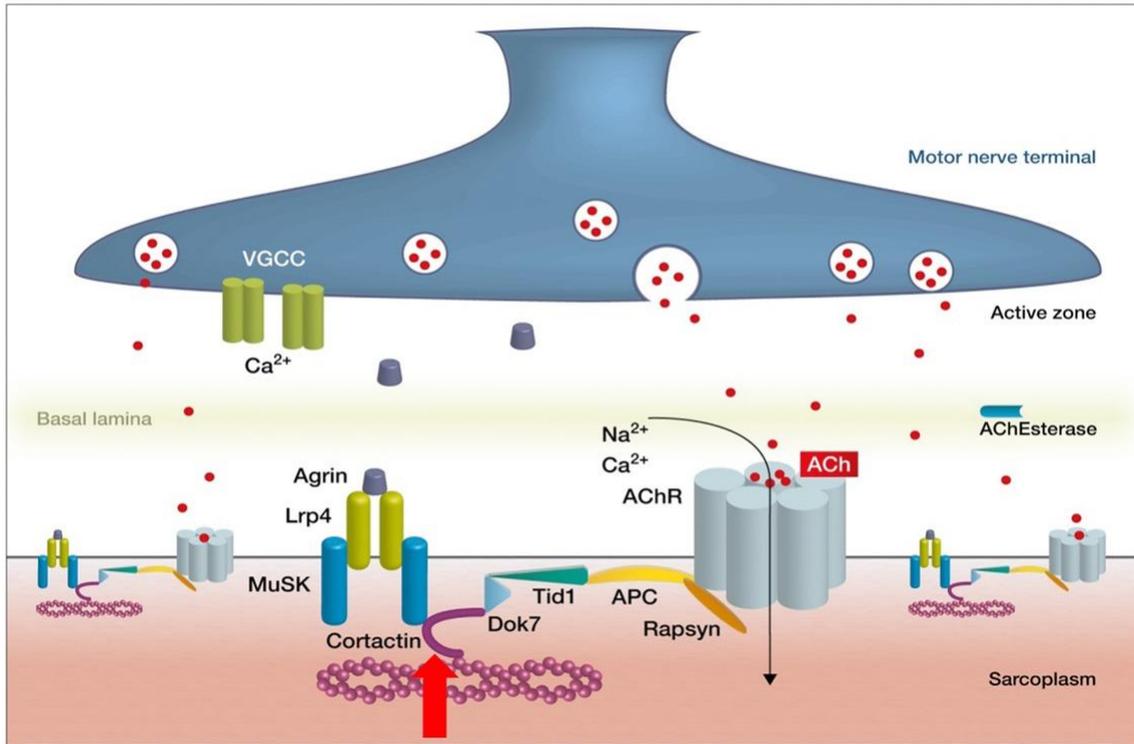


Abbildung 1 Proteine an der neuromuskulären Endplatte (Illa et al. 2018)

Schematische Darstellung der neuromuskulären Endplatte: Erregungsübertragung vom Motoneuron (blau) auf die Muskelzelle (rot). Acetylcholin (ACh, rote Punkte) wird aus seinen Vesikeln freigesetzt, diffundiert durch den synaptischen Spalt und bindet an die Acetylcholinrezeptoren (AChR). Diese sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die sich daraufhin öffnen und einen Kationeneinstrom in die Muskelzelle ermöglichen. Es sind einige Proteine abgebildet, die für die Aggregation der Acetylcholinrezeptoren eine Rolle spielen. Das von den Motoneuronen freigesetzte Agrin bindet an LRP4, wodurch MuSK aktiviert wird. Cortactin ist in der nachgeschalteten Signalkaskade involviert, die unter anderem zur Aggregation von Acetylcholinrezeptoren führt. Abbildung mit Lizenz übernommen aus (Illa et al. 2018), Lizenznummer: 4842680784953, Copyright John Wiley and Sons.

1.2.2 Cortactin

Cortactin ist ein intrazelluläres Protein, das von der Gruppe Gallardo, Martinez-Hernandez et al. im Jahr 2014 als potentiell Autoantigen in der Myasthenia gravis durch einen Protein-Microarray identifiziert wurde. In diesem Versuch wurde das Serum von sechs seronegativen Myasthenie-Patient*innen gemischt und auf Reaktivität mit über 9000 humanen Proteinen getestet. In der Auswertung zeigte sich Cortactin als mögliches Autoantigen. Vor dem Hintergrund seiner hohen Konzentration an der neuromuskulären Endplatte und seiner Rolle in der Aggregation von Acetylcholinrezeptoren im Agrin-LRP4-MuSK-Signalweg, entschloss sich die Gruppe, das Vorkommen von Anti-Cortactin-Autoantikörpern im Serum von Myasthenie-Patient*innen zu untersuchen

(Gallardo et al. 2014). Bevor die Ergebnisse dieser Studie dargestellt werden, folgt eine detailliertere Beschreibung des Proteins und seiner Funktionen.

Cortactin ist ein Monomer mit einer molekularen Masse von 80kDa. Es bindet an das Strukturprotein F-Aktin und moduliert viele Aktin-abhängige Prozesse wie zum Beispiel Zellmotilität und Endozytose (Peng et al. 1997, Daly 2004). Cortactin ist ein Substrat für Tyrosinkinase. Es konnte gezeigt werden, dass es vermehrt zu seiner Phosphorylierung kommt, wenn Agrin als Signalmolekül eingesetzt wird. Außerdem scheint es auch nur in seiner phosphorylierten Form in die Differenzierung des Zytoskeletts an der neuromuskulären Endplatte eingreifen zu können. Agrin-induzierte Aggregation von Acetylcholinrezeptoren wurde durch den Einsatz von mutierten Cortactin-Proteinen, die nicht phosphoryliert werden konnten, unterdrückt (Dai et al. 2000, Madhavan et al. 2009).

In der Studie von Gallardo, Martinez-Hernandez et al. wurde das Serum von 194 Patient*innen mit Myasthenia gravis mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) und Western Blot auf Anti-Cortactin-Autoantikörper untersucht. Als Kontrollen dienten 30 Patient*innen mit Lambert-Eaton-Syndrom, das durch eine präsynaptische Störung der Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte verursacht wird, 40 Patient*innen mit anderen immunvermittelten Erkrankungen und 19 gesunde Kontrollpersonen. Positiv auf Anti-Cortactin-Autoantikörper waren folgende Personen: 18 von 91 seronegativen Myasthenie-Patient*innen (19,7%) und 5 von 69 Patient*innen mit nachgewiesenen Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern (7,2%). In der Gruppe der 34 Patient*innen mit Anti-MuSK-Autoantikörpern wurde kein Serum mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern identifiziert. 1 der 30 Patient*innen mit Lambert-Eaton-Syndrom (3%) war positiv und 5 der 40 Patient*innen mit anderen Autoimmunerkrankungen (12,5%) – 2 Patient*innen mit chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie, 1 Patient*in mit systemischem Lupus erythematoses, 1 Patient*in mit rheumatoider Arthritis und 1 Patient*in mit Sklerodermie. Die Veröffentlichung stellte keine Aufschlüsselung nach Geschlecht zur Verfügung, weshalb hier Patient*in geschrieben wird. Außerdem hatte 1 von 20 gesunden Kontrollpersonen Anti-Cortactin-Autoantikörper (5,2%). Es konnte kein spezifischer Phänotyp der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen festgestellt werden (Gallardo et al. 2014).

Im Jahr 2016 veröffentlichte dieselbe Gruppe, die Cortactin als Antigen ursprünglich identifiziert hatte, eine weitere Studie zu Anti-Cortactin-Autoantikörpern bei Myasthenia gravis. Es wurden Myasthenie-Patient*innen retrospektiv eingeschlossen, von denen ein Serum von ihrem ersten Krankenhausbesuch vorlag. Methodisch wurde wieder mit ELISA und Western Blot gearbeitet. Anti-Cortactin-Autoantikörper wurden in folgenden Patient*innen gefunden: 19 von 201 Patient*innen mit Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern (9,5%) - davon 4 mit okulärer Verlaufsform. 9 von 38 seronegativen Patient*innen (23,7%) – davon erneut 4 mit okulärer Verlaufsform. Bei den 11 Patient*innen mit Anti-MuSK-Autoantikörpern und den 29 gesunden Kontrollpersonen kamen keine Anti-Cortactin-Autoantikörper vor. Über den klinischen Phänotyp ließ sich sagen, dass seronegative Patient*innen mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern eine okuläre oder milde, generalisierte Verlaufsform hatten, ohne bulbäre Symptome. In der Veröffentlichung wird diskutiert, dass Anti-Cortactin-Autoantikörper ein Marker für eine gute Prognose sein könnten (Cortes-Vicente et al. 2016).

1.2.3 Agrin

Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglykan und hat eine molekulare Masse von etwa 500kDa. Es wurde ursprünglich als in die Synaptogenese an der neuromuskulären Endplatte involviertes Protein beschrieben. Später entdeckte man, dass es auch im zentralen Nervensystem, in der Niere, in der Lunge, in Muskeln und anderen Geweben vorkommt (Cole et al. 1996, Gesemann et al. 1998). Die membranständige Isoform von Agrin wird im Gehirn exprimiert und ist an der Entwicklung von Synapsen, der Plastizität und der Signalübertragung beteiligt (Daniels 2012).

Die in Kapitel 1.2.1 beschriebene Rolle vom Agrin-LRP4-MuSK-Signalweg suggeriert die Wichtigkeit dieser Proteine für die Ausbildung von neuromuskulären Endplatten. Neuronales Agrin ist ein extrazelluläres Matrixprotein, das von Motoneuronen sezerniert wird. Durch den Kontakt der postsynaptischen Muskelzelle mit Agrin wird die Aggregation von Acetylcholinrezeptoren induziert und deren Formierung stabilisiert (Campanelli et al. 1991, Witzemann 2006). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass in Agrin-defizienten Mäusen die Acetylcholinrezeptor-Aggregate in ihrer Anzahl, Größe und Dichte stark vermindert waren. Die Mäuse sind aufgrund einer Ateminsuffizienz nicht lebensfähig (Gautam et al. 1996). Da Agrin wie zuvor beschrieben so entscheidend

an der Regulation der postsynaptischen Differenzierung beteiligt ist und Autoantikörper gegen Acetylcholinrezeptoren, LRP4 und MuSK in Myasthenia gravis als pathogenetische Faktoren identifiziert wurden (Gilhus et al. 2015), ist es naheliegend auch Agrin als potentiell Antigen für autoimmune Prozesse an der Endplatte in den Fokus zu nehmen. Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass Mäuse, die mit neuronalem Agrin immunisiert wurden und daraufhin Anti-Agrin-Autoantikörper bildeten, Myasthenie-typische Symptome entwickelten (Yan et al. 2018).

Im Jahr 2012 wurden erstmals Anti-Agrin-Autoantikörper im Serum von Patient*innen mit Myasthenia gravis untersucht. Es wurde ein Zell-basierter Assay benutzt. Dabei fanden sie sich in 24 von 161 Myasthenie-Patient*innen (15%). 11 von den 24 (46%) Patient*innen waren seronegativ. Es wurden keine klinischen Daten der Patient*innen veröffentlicht (Cossins et al. 2012).

Im Jahr 2014 gab es gleich zwei Gruppen, die Anti-Agrin-Autoantikörper detektierten. In der Studie von Zhang et al. wurden ELISA und Färbungen von human embryonic kidney (HEK)-Zellen angewendet. Anti-Agrin-Autoantikörper wurden in folgenden Myasthenie-Patient*innen identifiziert: 5 von 83 Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper positiven Patient*innen (6%), 2 von 4 seronegativen Patient*innen (50%). Es wurden keine Anti-Agrin-Autoantikörper in den 6 Anti-MuSK-Autoantikörper positiven Patient*innen, in den 55 Kontrollpersonen mit anderen neurologischen Erkrankungen und in den 25 gesunden Kontrollpersonen gefunden. Ein einheitlicher klinischer Phänotyp der Anti-Agrin-Autoantikörper positiven Patient*innen ließ sich nicht beschreiben (Zhang et al. 2014). In der Studie von Gasperi et al. wurden neben ELISA und HEK-Zell-Färbungen auch Färbungen von neuromuskulären Endplatten als Nachweismethode genutzt. Anti-Agrin-Autoantikörper wurden in folgenden Myasthenie-Patient*innen identifiziert: 4 von 15 Patient*innen mit Anti-MuSK-Autoantikörpern (27%) und 1 von 9 Patient*innen mit Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern (11%). Es wurden weder in den 30 seronegativen Patient*innen noch in den 16 gesunden Kontrollpersonen Anti-Agrin-Autoantikörper detektiert (Gasperi et al. 2014).

Cordts et al. untersuchten in einer im Jahr 2017 veröffentlichten Studie ebenfalls Anti-Agrin-Autoantikörper in Patient*innen mit Myasthenia gravis mittels ELISA und HEK-Zell-Färbungen. Anti-Agrin-Autoantikörper fanden sich bei 3 von 55 Myasthenie-

Patient*innen mit Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern (5%) und 1 von 45 seronegativen Myasthenie-Patient*innen (2%). Der klinische Phänotyp der Anti-Agrin-Autoantikörper positiven Patient*innen wurde folgendermaßen beschrieben: meist weiblich, frühes Erkrankungsalter, mittlere bis schwere Symptomatik und moderates Therapieansprechen (Cordts et al. 2017).

Kürzlich erschien eine neue Studie von Rivner et al., in der das Vorkommen von Anti-LRP4- und Anti-Agrin-Autoantikörpern in Myasthenie-Patient*innen mittels ELISA untersucht wurde, die weder Anti-Acetylcholinrezeptor- noch Anti-MuSK-Autoantikörper aufwiesen. Bei 23 von 181 eingeschlossenen Patient*innen wurden sowohl Anti-Agrin- als auch Anti-LRP4-Autoantikörper detektiert. 3 Patient*innen hatten ausschließlich Anti-Agrin-Autoantikörper und 1 Patient*in ausschließlich Anti-LRP4-Autoantikörper. Anti-Agrin-Autoantikörper wurden also in 14% (26 von 181) der Fälle nachgewiesen (Rivner et al. 2020).

1.3 Eigenschaften von Autoantikörpern bei Myasthenia gravis

In der Myasthenia gravis als Autoantikörper-vermittelter Erkrankung sind die IgG-Subklassen der Autoantikörper sowie deren Komplementaktivierungspotential von pathophysiologischer Bedeutung. Aus diesem Grund wurden diese Eigenschaften bei den in der Studie detektierten Autoantikörpern genauer untersucht. Es folgt ein kurzer Exkurs zu den Grundlagen der IgG-Subklassen und des Komplementsystems.

1.3.1 IgG-Subklassen bei Myasthenia gravis

IgG ist das häufigste Immunglobulin im menschlichen Serum. Es gibt vier Subklassen: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4. Obwohl sie zu 90% aus derselben Aminosäuresequenz bestehen, unterscheiden sie sich in einigen Eigenschaften wie zum Beispiel Antigenbindung, Immunkomplexbildung und Komplementaktivierung (Vidarsson et al. 2014). In Bezug auf Myasthenia gravis sind IgG-Subklassen deshalb von Bedeutung, weil sie in den nach Autoantikörper eingeteilten Untergruppen der Erkrankung jeweils verschieden häufig vorkommen und pathogenetische Relevanz haben (Querol et al. 2013). So gehören Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper zu den IgG-Subklassen 1 und 3 (Rødgaard et al. 1987). Diese IgG-Subklassen sind starke Aktivatoren des Komplementsystems, wodurch die komplement-vermittelte Schädigung der

neuromuskulären Endplatten in Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper positiver Myasthenia gravis erklärt wird. Außerdem sind IgG1 und IgG3 funktionell bivalent. Das bedeutet, dass sie zwei Antigene gleichzeitig binden und somit quervernetzen können. Die Quervernetzung von Acetylcholinrezeptoren und der dadurch folgende endozytotische Abbau ist ein pathogenetischer Faktor der Myasthenia gravis (Huijbers et al. 2014). Anti-MuSK-Autoantikörper gehören zur IgG-Subklasse 4. Diese IgG-Subklasse ist funktionell monovalent und hat antiinflammatorische Eigenschaften (van der Neut Kofschoten et al. 2007). Sie ist nicht komplementaktivierend, da sie den Komplementfaktor C1q nicht binden kann, der einer der ersten Komponenten in der Komplementkaskade ist (Daha et al. 2011). Auch wenn IgG4 bezüglich der beschriebenen Eigenschaften benigne wirkt, konnte an Tierversuchen eindeutig bewiesen werden, dass es die IgG4-Fraktion der Anti-MuSK-Autoantikörper ist, die die pathogenen Prozesse an der neuromuskulären Endplatte verursacht (Klooster et al. 2012). Anti-LRP4-Autoantikörper gehören zur IgG1-Subklasse (Higuchi et al. 2011).

1.3.2 Autoantikörper bei Myasthenia gravis und das Komplementsystem

Das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr zur Eliminierung von Mikroorganismen. Es besteht aus einer Vielzahl von Plasmaproteinen, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Am Ende der Komplementkaskade steht die Bildung des Membranangriffskomplexes, der sich in die Zellmembran des Angreifers einfügt und durch Porenbildung zur Lyse oder Schädigung der Zelle führt. Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper der IgG-Subklassen 1 und 3 stoßen den klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems an. Dabei bindet zunächst der Komplementfaktor C1q an den Antigen-Antikörper-Komplex. Darauf folgt die kaskadenartige Aktivierung vieler weiterer Faktoren, die über die Spaltung von C3 zur Spaltung von C5 führt. Schließlich rekrutiert C5b, ein gespaltener Anteil von C5, die Faktoren C6, C7, C8 und mehrere Einheiten von C9, die den Membranangriffskomplex bilden (Howard 2018). Eine Komplement-vermittelte Pathogenese der Myasthenia gravis wird durch verschiedene Untersuchungen gestützt: So ist die Ablagerung von Komplementfaktoren an den neuromuskulären Endplatten sowohl bei Myasthenie-Patient*innen mit Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern als auch bei Ratten mit experimentell-induzierter Myasthenia gravis gezeigt worden (Engel et al. 1977, Hoedemaekers et al. 1997). C3- und C5-defiziente Ratten sind vor experimentell-

induzierter Myasthenie geschützt, da es nicht zur Bildung des Membranangriffskomplexes und folglich nicht zur Schädigung der neuromuskulären Endplatte kommt. Wiederum ist die Anfälligkeit für experimentell-induzierte Myasthenie in Mäusen erhöht, die einen defizitären komplementinhibierenden decay accelerating factor aufweisen. Außerdem ist der Komplementverbrauch während einer Exazerbation der Erkrankung erhöht (De Baets et al. 1988, Tüzün et al. 2013, Huijbers et al. 2014, Howard 2018). Wie in Kapitel 1.1.6 bereits beschrieben, sind die Therapieoptionen der Myasthenia gravis um den monoklonalen Anti-C5-Antikörper Eculizumab erweitert worden. Eculizumab inhibiert die Spaltung von C5 in C5a und C5b, die an inflammatorischer Zellchemotaxis und Bildung des Membranangriffskomplexes beteiligt sind (Rother et al. 2007). Eine Phase 2 Pilotstudie von Eculizumab zeigte deutliche klinische Verbesserungen bei Patient*innen mit schwerer, refraktärer Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper positiver Myasthenia gravis (Howard et al. 2013). Für diese Patientengruppe erfolgte 2017 dann auch die Zulassung des Medikaments auf Grundlage einer zweiten Studie der Gruppe von JF Howard Jr. (Howard et al. 2017).

1.4 Ziele der Arbeit

Myasthenia gravis ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Autoantikörper-vermittelte Störung der Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte zu einer Schwäche der Muskulatur führt. Bei 80-90% der Patient*innen mit einer generalisierten Myasthenia gravis sind Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor nachweisbar. Bei den Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper negativen Patient*innen finden sich in 40-70% Autoantikörper gegen das Endplattenprotein MuSK. Patient*innen, die weder Autoantikörper gegen Acetylcholinrezeptoren noch gegen MuSK aufweisen, haben in 2-50% der Fälle Autoantikörper gegen das Endplattenprotein LRP4. Es verbleiben folglich 3-5% der Patient*innen, bei denen keiner der oben genannten Autoantikörper zu finden ist, was als seronegative Myasthenia gravis bezeichnet wird. Der Autoantikörpernachweis ist nicht nur ein entscheidendes Indiz in der Diagnostik, sondern auch die Grundlage für die Einteilung von Subgruppen innerhalb des Krankheitsbildes der Myasthenia gravis. Diese Einteilung kann für diagnostisches Vorgehen, therapeutische Entscheidungen und die Prognose richtungsweisend sein. Kürzlich wurden zwei neue Antigene beschrieben, die Bestandteile der neuromuskulären Endplatte sind: Cortactin und Agrin. Beide Proteine tragen im Rahmen von Signalwegen an der postsynaptischen Membran zur Aggregation von Acetylcholinrezeptoren bei. Das Vorkommen von Autoantikörpern gegen Cortactin und Agrin in Myasthenia gravis ist in mehreren Studien belegt worden. Die pathogenetische Relevanz dieser Autoantikörper ist jedoch noch ungeklärt.

Ziele der Arbeit sind:

- 1) Zu untersuchen, ob Autoantikörper gegen Cortactin und Agrin bei unserer Kohorte von Patient*innen mit Myasthenia gravis im Serum vorliegen.
- 2) Bei Identifikation von positiven Patient*innen, Bestimmung der Subklassen der Autoantikörper, Untersuchung der Komplementbindung und Charakterisierung des klinischen Phänotyps.

2 Material und Methoden

Tabelle 1 Proteine und Komplement für ELISA und Komplementbindungsversuche

Proteine und Komplement	Hersteller, Katalognummer
Complement component C1q from human serum > 95%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, 80295-33-6
Human Cortactin	OriGene Technologies, Rockville, USA TP604673
Recombinant Human Agrin	R&D Systems, Minneapolis, USA 6624-AG-050

Tabelle 2 Zellen und DNA für Bindungsversuche an HEK-Zellen

Zellen	Hersteller
HEK-293-Zellen	ATCC, Wesel, Deutschland
DNA	Hersteller
Mini-Agrin Plasmid (enthält GFP)	Prof. Kröger, München, Deutschland (Gasperi et al. 2014) Mini-Agrin kodiert nicht für die gesamte Proteinsequenz von Agrin, wobei die für die Acetylcholinrezeptor-Aggregation entscheidenden und die für neuronales Agrin typischen Sequenzbereiche enthalten sind.
GFP-Cortactin Plasmid (Ratte)	Anna Huttenlocher (Perrin et al. 2006) Addgene, Watertown, USA #26722

Tabelle 3 Antikörper für ELISA und Bindungsversuche an HEK-Zellen

Antikörper	Hersteller, Katalognummer
Primärantikörper	
Anti-Agrin Rabbit Antibody	Prof. Kröger, München, Deutschland (Gasperi et al. 2014)
Anti-Cortactin Rabbit Polyclonal Antibody	OriGene Technologies, Rockville, USA TA324050

Sekundärantikörper	
Anti-Complement C1q Antibody (HRP), sheep anti-human IgG	LifeSpan BioSciences, Seattle, USA, LS-C41845
Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA, 711-165-152
Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA, 109-165-003
Mouse anti-Human IgG1 Fc Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, A-10648
Mouse anti-Human IgG2 Fc Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, 05-0520
Mouse anti-Human IgG3 (Hinge) Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, 05-3620
Mouse Anti-Human IgG4 pFc' (HRP)	Abcam, Cambridge, UK ab99817
Polyclonal Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	Dako, Glostrup, Dänemark P0448
Polyclonal Rabbit anti-Human IgG/HRP	Dako, Glostrup, Dänemark P0214

Tabelle 4 Reagenzien und Material für ELISA und Bindungsversuche an HEK-Zellen

Reagenz/Material	Hersteller
Abklebefolie Easyseal Transparent	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Aqua ad iniectabilia	Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
Cellstar Cell Culture Flasks, 75cm ²	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
CoverGrip Coverslip Sealant	Biotium Inc, Fremont, USA
Deckgläser, rund, 12 mm	Novoglas Labortechnik Langenbrick, Bern, Schweiz
1M H ₂ SO ₄	Fluka Analytical, Honeywell International, Morristown, USA
Neubauer Zählkammer	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Nunc 96 Well Immuno Platten	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

Nunc Zellkultur-Multischalen, 24W	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
TMB Substrate Solution	Bender Medsystems GmbH, Wien, Österreich
Total IgG (Human) ELISA Kit	Abnova Corporation, Taipeh, Taiwan
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue solution 0,4%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA 0,05%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Tabelle 5 Lösungen und Puffer für ELISA und Bindungsversuche an HEK-Zellen

Lösung und Puffer	Herstellung
Blockierungslösung	Ansetzen von 0,1M PBS mit 3,33% BSA und 0,05% Tween 20
BSA/PBS 10%	Auflösen von 1g BSA in 9ml 0,1M PBS
BSA/PBS 2%	Verdünnung von BSA/PBS 10% mit 0,1M PBS im Verhältnis 1:4
BSA/PBS 1%	Verdünnung von BSA/PBS 2% mit 0,1M PBS im Verhältnis 1:1
0,1M Carbonatpuffer	Auflösen von 4,2g NaHCO ₃ und 1,78g Na ₂ CO ₃ in 500ml destilliertem Wasser, Titration auf pH 9,4
5M NaCl	Auflösen von 146,1g NaCl in destilliertem Wasser, Auffüllen auf 500ml
0,1M PBS	800ml Stammlösung A + 160 ml Stammlösung B, Titration auf pH 7,4, Hinzufügen von 60ml 5M NaCl, Auffüllen auf 2l mit destilliertem Wasser
PFA 4%	Auflösen von 4g PFA 95% in 100ml 0,1M Phosphatpuffer

0,1M Phosphatpuffer	405ml 0,2M Stammlösung A + 95ml Stammlösung B, Titration auf pH 7,4, Auffüllen auf 1l mit destilliertem Wasser
Stammlösung A	Auflösen von 35,6g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in 1l destilliertem Wasser
Stammlösung B	Auflösen von 31,2g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O in 1 l destilliertem Wasser
Waschpuffer	Ansetzen von 0,1M PBS mit 0,05% Tween 20
Benötigte Bestandteile zur Herstellung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl > 99,8%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ CO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA) 95%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6 Lösungen und Puffer für Kultivierung und Transfektion von HEK-Zellen

Bezeichnung	Herstellung
2x HBS-Puffer	Herstellen von 12mM Glucose aus D-(+)-Glucose-Pulver, 10mM KCl, 280mM NaCl und 1,5mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O in Wasser, Titration auf pH 6,95 mit NaOH, sterile Filtration und Lagerung in Aliquots bei -20°C
HEK-Medium	Ansetzen von 5ml L-Glutamin mit 5ml Penicillin/Streptomycin und 50ml sterilem, 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviertem Gibco FBS, Auffüllen auf 500ml mit MEM, sterile Filtration

CaCl ₂	Titration von 2,5M CaCl ₂ in Wasser auf pH 7,0, sterile Filtration, Lagerung in Aliquots bei -20°C
PDL	Auflösen von sterilem Poly-D-Lysin Hydrobromid-Pulver in 50ml destilliertem, sterilem Wasser, Lagerung in Aliquots
0,1x TE	Verdünnung von TE in Wasser 1:10.000, sterile Filtration, Lagerung in Aliquots bei 4°C
Benötigte Bestandteile zur Herstellung	Hersteller
CaCl ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-(+)-Glucose powder, BioReagent	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gibco Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
KCl > 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Minimal essential medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NaCl > 99,8%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10000U/ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Poly-D-Lysine hydrobromide	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TE Puffer (100X), pH 8,0	PanReac AppliChem, Illinois Tool Works Inc., Glenview, USA

Tabelle 7 Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop und Objektive (20x, 40x)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Inversmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
Kamera	SPOT Imaging Solutions, Burroughs, USA
Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 8 Verwendete Programme

Programm	Hersteller
EndNote	Thomson Reuters, NY, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc, San Diego, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Skani Software 4.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VisiView	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland

2.1 Ethikvotum

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät befürwortet. Es liegt ein positives Ethikvotum unter der Antragsnummer 267/16 vor.

2.2 Geschlechtergerechte Sprache

Wie im „Leitfaden Dissertationsarbeit“ der Medizinischen Fakultät gefordert, wurde beim Verfassen der Dissertation geschlechtergerechte Sprache verwendet. Dazu kommt der Genderstern immer dann zum Einsatz, wenn Personen beider Geschlechter Teil einer Gruppe sind wie zum Beispiel bei „Patient*innen“. Bei der Rekrutierung der Patient*innen wurde nicht abgefragt, ob sich die Personen innerhalb der binären Geschlechterordnung identifizieren. Die Einteilung in „männlich“ und „weiblich“ wurde allein aufgrund der Namen der Patient*innen vorgenommen.

Die Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen werden unabhängig von ihrem Geschlecht als Patient 1-3 bezeichnet, um eine bessere Lesbarkeit zu gewährleisten und Verwechslungen zu vermeiden. Auch zusammengesetzte Wörter wie zum Beispiel „Patientenserum“ oder „Patientengruppe“ werden aufgrund der besseren Lesbarkeit ohne Genderstern geschrieben.

2.3 Patient*innen und Kontrollpersonen

Alle Teilnehmer*innen an der Studie wurden umfassend mündlich und schriftlich aufgeklärt und haben eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme abgelegt. Auch bereits vorhandenes Material aus früheren Studien wurde verwendet, wenn die Patient*innen und Kontrollpersonen zum Entnahmezeitpunkt einer Weiterverwendung für wissenschaftliche Zwecke zugestimmt hatten. Es erfolgte eine Pseudonymisierung aller Proben.

2.3.1 Probengewinnung

Den Patient*innen und Kontrollpersonen wurde 20ml Blut aus einer peripheren Vene abgenommen. Die Blutentnahmeröhrchen wurden zentrifugiert, das Serum aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Wenn bei Myasthenie-Patient*innen im Rahmen eines stationären Aufenthalts aus therapeutischen Gründen eine Plasmapherese notwendig war, wurde dabei, mit Einverständnis der Betroffenen, Plasmapherese-Material asserviert.

2.3.2 Patient*innen

Es wurden 135 Patient*innen mit Myasthenia gravis in die Studie eingeschlossen. Von 69 Patient*innen lag eine Serum-Probe und von 82 Patient*innen eine Plasmapherese-Probe vor. Folglich gab es 16 Patient*innen, von denen beide Probenarten zur Verfügung standen. Die Seren wurden prospektiv im Zeitraum von Februar 2017 bis Februar 2019 in der Spezialambulanz für Myasthenie oder auf Stationen der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg gesammelt. Die Plasmapherese-Proben wurden im Zeitraum von 2006 bis 2017 asserviert und retrospektiv in die Studie eingeschlossen.

Die Einschlusskriterien waren folgendermaßen festgelegt: Die Patient*innen zeigten das klinische Bild einer Myasthenia gravis wie Doppelbilder, Ptosis, bulbäre Symptome oder Muskelschwäche mit Zunahme bei Belastung ohne andere zugrundeliegende Erkrankung. Außerdem mussten mindestens zwei der folgenden drei Kriterien erfüllt sein: Nachweis von Anti-Acetylcholinrezeptor-, Anti-MuSK-, oder Anti-LRP4-Autoantikörpern und/oder elektrophysiologischer Nachweis eines Dekrements nach repetitiver Stimulation und/oder positives Ansprechen auf Cholinesterasehemmer.

Da nicht alle 135 Patient*innen die Einschlusskriterien erfüllten, eine Myasthenia gravis aber trotzdem als sehr wahrscheinliche Diagnose galt, wurde die Untergruppe „Verdacht auf (V.a.) Myasthenie“ gebildet. Darin befanden sich 22 Patient*innen, die alle seronegativ auf oben genannte Autoantikörper waren. Sie zeigten zwar das klinische Bild einer Myasthenie und sprachen mehrheitlich auf Cholinesterasehemmer an, jedoch fehlte oft der Nachweis des Dekrements in der Nervenserienstimulation. Die elektrophysiologische Untersuchung ergab entweder ein negatives Ergebnis, wurde nicht durchgeführt oder die Ergebnisse waren in den Arztbriefen, gerade bei langer Erkrankungsdauer, nicht auffindbar.

Die Gruppe der eingeschlossenen 135 Patient*innen ließ sich wie folgt charakterisieren: Sie bestand aus 64 Frauen und 71 Männern. Der Altersmedian betrug 66 Jahre (Spannweite 16 bis 86 Jahre). Bezüglich nachgewiesener Autoantikörper hatten 105 Patient*innen Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper, 6 Patient*innen Anti-MuSK-Autoantikörper und 24 Patient*innen waren seronegativ. Im Hinblick auf die von der Erkrankung betroffenen Muskelgruppen wurden 11 Patient*innen der okulären und 124 Patient*innen der generalisierten Verlaufsform zugeordnet.

Tabelle 9 Charakterisierung der in die Studie eingeschlossenen Patient*innen

	Eingeschlossene Patient*innen		
	n=135		
Vorliegende Probenart	Serum	Plasmapherese-Material	
	69	82	
Geschlechterverteilung	männlich	weiblich	
	71	64	
Verlaufsform der MG	generalisiert	okulär	
	124	11	
Nachgewiesene Autoantikörper (AK)	Anti-Acetylcholinrezeptor-AK	Anti-MuSK-AK	Seronegativ
	105	6	24

Klinische Befunde, Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen und Laborwerte wurden den Arztbriefen der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg entnommen und tabellarisch erfasst.

2.3.3 Kontrollpersonen

Es wurden insgesamt 50 Kontrollpersonen herangezogen, die pro- und retrospektiv rekrutiert wurden. Jeweils 25 der Personen waren weiblich und männlich. Der Altersmedian betrug 54 Jahre (Spannweite 18 bis 82 Jahre). Einschlusskriterium war, dass die Personen keine Autoimmunerkrankungen hatten.

2.4 Statistische Auswertung und verwendete Programme

Für die ELISAs wurde SkanIt Software 4.1 verwendet. Die Berechnung der deskriptiven Statistik wurde mit Excel durchgeführt. Die Erstellung von Graphiken erfolgte mit Graph Pad Prism.

2.5 ELISA

2.5.1 Funktionsprinzip und zugrundeliegendes Protokoll

Ein ELISA ist ein Nachweisverfahren für Antikörper, die an ein spezifisches Antigen binden. Dabei erfolgt der Nachweis über die im Photometer messbare Farbreaktion bei enzymatischer Umsetzung des Substrates am Sekundärantikörper, wenn dieser an den Komplex aus Antigen und Primärantikörper bindet (Engvall et al. 1971, Van Weemen et al. 1971). Der Versuchsablauf fand an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt. Am ersten Tag wurde eine Nunc 96 Well Immuno Platte mit dem jeweiligen Antigen beschichtet. Es wurden Well-Dupletts für die Positivkontrolle, die Kontrollen der Antikörper ohne Serum, sowie alle zu testenden Seren vorbereitet. Außerdem wurde für jedes zu testende Serum ein unbeschichtetes Well-Duplett vorgesehen, um das Signal unspezifischer Bindungen am Ende subtrahieren zu können. Zuletzt wurde die Platte mit einer Abdeckfolie abgeklebt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Das Ziel des zweiten Versuchstages war es, nach Hinzugabe von Primär- und Sekundärantikörper, das photometrische Signal jedes Wells zu messen. Dazu wurde die Platte zunächst zwei Mal mit 200µl phosphate buffered saline (PBS) pro Well gewaschen und gut ausgeklopft. Danach wurden die Wells mit jeweils 200µl Blockierungslösung bei 37°C für eine Stunde unter Agitation inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach zwei

Waschschritten mit Waschpuffer erfolgte das Auftragen der Primärantikörper. Hierzu dienten die Seren, das Plasmapherese-Material oder der kommerzielle Anti-Zielantigen-Antikörper. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37° C unter Agitation folgte das viermalige Waschen mit 200µl Waschpuffer pro Well. Als nächstes wurden die Sekundärantikörper in einer Menge von jeweils 100µl aufgetragen. Der Polyclonal Rabbit anti-Human IgG/HRP in einer Verdünnung von 1:10.000 in Blockierungslösung diente zur Detektion von menschlichen Antikörpern im Serum oder Plasmapherese-Material. Der Polyclonal Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP in einer Verdünnung von 1:2000 in Blockierungslösung wurde für die Positivkontrolle genutzt. Die Kopplung der Sekundärantikörper an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP = horseradish peroxidase) führte später zur gewünschten Farbreaktion. Die Inkubationszeit betrug dann 30 Minuten bei 37°C unter Agitation. Nach vier Waschschritten mit Waschpuffer wurde 100µl Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung pro Well aufgetragen, die als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase diente. Die Lösung inkubierte dann im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur, um die Farbreaktion ungestört ablaufen zu lassen. Die Reaktion wurde schließlich mit 50µl Schwefelsäure pro Well abgestoppt. Die optische Dichte der Wells wurde im Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer bei 450nm gemessen.

Der Schwellenwert, um ein Serum als Antikörper positiv getestet zu deklarieren, wurde als vier Standardabweichungen über dem Mittelwert der optischen Dichten der Kontrollen definiert.

2.5.2 Anti-Cortactin-ELISA

Es wurden alle Patienten- und Kontrollseren sowie das gesamte Plasmapherese-Material mittels ELISA auf Anti-Cortactin-Autoantikörper getestet. Zur Beschichtung der Platten wurde Human Cortactin eingesetzt. Es wurde dazu in Carbonatpuffer auf eine Zielkonzentration von 1µg/ml verdünnt und in einer Menge von jeweils 100µl pro Well aufgetragen. Als Primärantikörper für die Positivkontrolle diente der Anti-Cortactin Rabbit Polyclonal Antibody in einer Verdünnung von 1:100 in Blockierungslösung. Die Seren wurden 1:100 in Blockierungslösung verdünnt und jeweils 100µl in ein beschichtetes und ein unbeschichtetes Well-Duplett pipettiert. Der weitere Ablauf des ELISAs erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben.

2.5.3 Anti-Agrin-ELISA

Es wurden alle Patienten- und Kontrollseren sowie das gesamte Plasmapherese-Material mittels ELISA auf Anti-Agrin-Autoantikörper getestet. Zur Beschichtung der Platten wurde Recombinant Human Agrin eingesetzt. Es wurde dazu in Carbonatpuffer auf eine Zielkonzentration von 1 µg/ml verdünnt und in einer Menge von jeweils 100 µl pro Well aufgetragen. Als Primärantikörper für die Positivkontrolle diente der Anti-Agrin Rabbit Antibody in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockierungslösung. Die Seren wurden 1:100 in Blockierungslösung verdünnt und jeweils 100 µl in ein beschichtetes und ein unbeschichtetes Well-Duplett pipettiert. Der weitere Ablauf des ELISAs erfolgte wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben.

2.5.4 Auswertungsprinzip der ELISAs

Der genaue Ablauf der ELISA-basierten Versuche wurde in Kapitel 2.5.1 dargelegt. Wie dort beschrieben basierten die ELISA Werte der einzelnen Proben auf den optischen Dichten, die als Ergebnis der Farbreaktion von TMB Lösung mit Meerrettich-Peroxidase vom Photometer in den Wells gemessen wurden. Im Anschluss erfolgte mittels Excel die Berechnung des finalen Werts jeder Probe, um möglichst nur das spezifische Signal abzubilden und eine Verfälschung durch unspezifische Hintergrundaktivität zu vermeiden. Die Grundlage für die Berechnung legten folgende Aspekte des Versuchs: Für jede Probe wurde ein Well-Duplett mit dem Zielantigen beschichtet und zusätzlich ein unbeschichtetes Well-Duplett vorgesehen. Abgesehen von der Beschichtung wurden alle vier Wells während des Versuchsablaufs im Sinne von Blockierung, Waschschritten, Auftragen von Primär- und Sekundärantikörpern, Substratzugabe und Abstoppen der Farbreaktion gleich behandelt. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der optischen Dichten der Well-Dupletts gebildet und dann der Mittelwert des unbeschichteten Dupletts von dem des beschichteten Dupletts abgezogen. Der finale Wert stellte folglich nur das spezifische Signal dar, das durch die Reaktion des Serums als Primärantikörper mit dem Zielantigen erfolgte. Wenn die Subtraktion in seltenen Fällen zu einem negativen Ergebnis führte, wurde der Wert auf 0 gesetzt. Das Prinzip wird durch nachstehende Graphik schematisch veranschaulicht. Zur Erstellung aller folgenden Diagramme wurde immer der wie beschrieben berechnete, finale ELISA Wert jeder Probe verwendet.

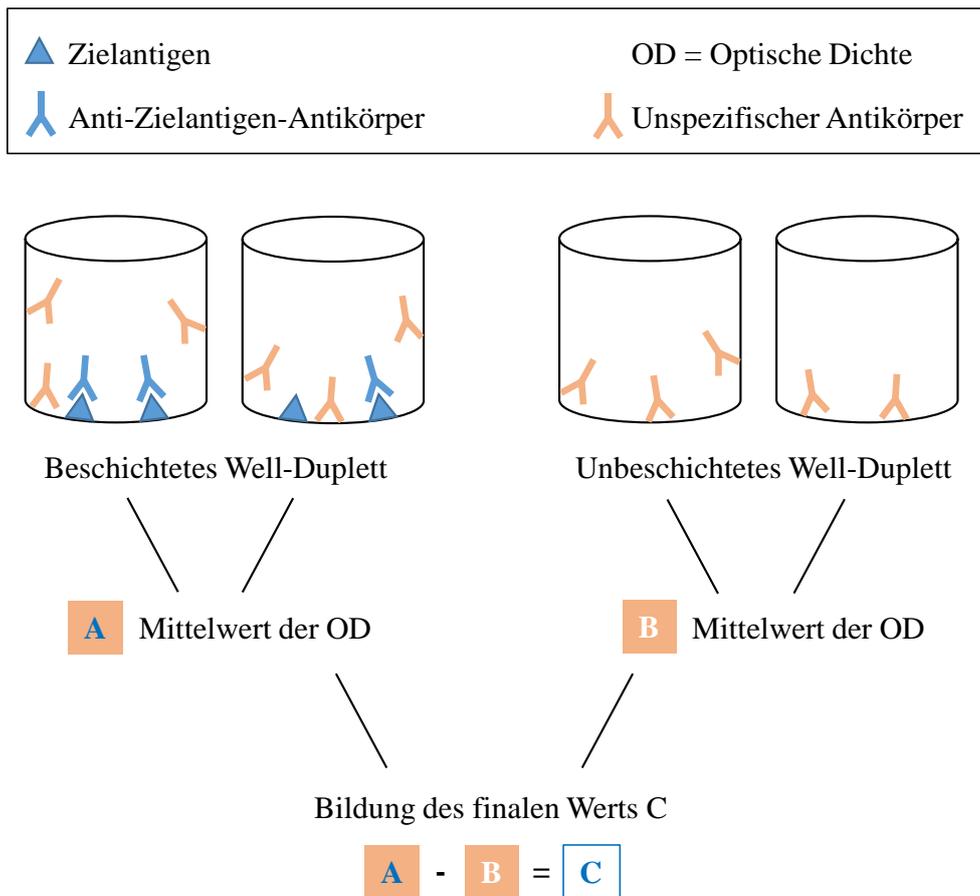


Abbildung 2 Schema zum Auswertungsprinzips der ELISA Werte

Für jede Probe wurden die optischen Dichten (OD) eines beschichteten und eines unbeschichteten Well-Dupletts gemessen und jeweils der Mittelwert gebildet. Durch die Subtraktion des Mittelwerts des unbeschichteten Well-Dupletts (B) vom Mittelwert des beschichteten Well-Dupletts (A) wurde der finale Wert (C) gebildet, der nur das spezifische Signal der jeweiligen Probe darstellt und den Einfluss von unspezifischen Bindungen auf den Wert verhindert.

2.5.5 Titerbestimmungen

Zur Bestimmung der Titer der auf Anti-Cortactin-Autoantikörper positiv getesteten Seren wurde das Material in Verdünnungsreihen mittels ELISA gemessen und diejenige Verdünnung als Titer bestimmt, bei der das Messergebnis zuletzt noch über dem festgelegten Schwellenwert lag. Hierfür wurde jedes Serum in den Verdünnungen 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:5000 und 1:10.000 getestet. Auf gleiche Weise wurde ein negativ getestetes Kontrollserum behandelt und gemessen.

2.5.6 Subklassenbestimmungen

Zur Subklassenbestimmung der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren wurden wieder Versuche mittels ELISA durchgeführt. Der Versuchsablauf erfolgt wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben mit dem Unterschied, dass anstelle eines allgemeinen Anti-human-IgG-Sekundärantikörpers Subklassen-spezifische Sekundärantikörper eingesetzt wurden. Als Primärantikörper dienten die Seren von den Patienten 1 bis 3 und den positiven Kontrollen 1 und 2 in einer Verdünnung von 1:100 in Blockierungslösung. Außerdem wurde ein negatives Kontrollserum als Negativkontrolle getestet. Als Subklassen-spezifische Sekundärantikörper wurden der Mouse anti-Human IgG1 Fc Secondary Antibody, HRP in der Verdünnung 1:1000, der Mouse anti-Human IgG2 Fd Secondary Antibody, HRP in der Verdünnung 1:4000, der Mouse anti-Human IgG3 (Hinge) Secondary Antibody, HRP in der Verdünnung 1:3000 und der Mouse Anti-Human IgG4 pFc' (HRP) in der Verdünnung 1:2000 eingesetzt. Die Verdünnungen wurden jeweils mit Blockierungslösung vorgenommen. Diese Antikörper waren ebenfalls HRP-konjugiert und erzeugten mit TMB eine Farbreaktion.

2.5.7 Komplementbindungsversuche

Auf Grundlage eines ELISAs wurden Komplementbindungsversuche mit den Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren durchgeführt. Hierfür wurde der Komplementbestandteil C1q verwendet, der an den Antigen-Antikörper-Komplex bindet und über einen HRP konjugierten Anti-C1q-Sekundärantikörper detektiert werden kann. C1q eignet sich als Nachweis für eine Komplementbindung, da es ein Bestandteil vom Faktor C1 ist, mit dem die Komplementkaskade beginnt (siehe Kapitel 1.3.2). Der Versuch wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Am ersten Tag erfolgte das Beschichten einer Nunc 96 Well Immuno Platte mit dem Zielantigen. In diesem Fall wurde wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 Human Cortactin aufgetragen. Am zweiten Tag wurden die Primärantikörper appliziert. Die Platte musste dafür zunächst durch vier Waschschriffe mit jeweils 200µl Waschpuffer pro Well vorbereitet werden. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation von Blockierungslösung bei 37°C unter Agitation zum Blockieren von unspezifischen Bindungen. Nach erneuten vier Waschschriffen wurden nun die Primärantikörper aufgetragen. Die Patienten- und Kontrollseren wurden dazu 1:20 verdünnt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Am dritten Versuchstag erfolgte das Auftragen von C1q und des Sekundärantikörpers. Nach

sechs Waschschritten wurde dazu zunächst das C1q auf eine Zielkonzentration von 10µl/ml verdünnt und in einer Menge von 100µl pro Well pipettiert. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Agitation. Nach sechs weiteren Waschschritten wurde der Sekundärantikörper Anti-Complement C1q Antibody (HRP) in einer Verdünnung 1:200 in Blockierungslösung mit 100µl pro Well aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Es erfolgten vier Waschschritte, bevor 100µl TMB Lösung pro Well 15 Minuten lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde. Die Farbreaktion wurde mit 50µl H₂SO₄ pro Well gestoppt und die optische Dichte im Multiskan FC Mikrotiterplatten-Photometer bei 450nm bestimmt.

Wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben wurden auch hier die Mittelwerte der Well-Dupletts gebildet und der Mittelwert der für jede Probe individuell bestimmten optischen Dichten aus den unbeschichteten Wells subtrahiert.

2.5.8 Gesamt-IgG-Bestimmungen

Zur Bestimmung des Gesamt-IgG-Gehaltes der Patientenseren, des Plasmapheresematerials und der Kontrollseren wurden alle Proben mittels des kommerziellen Total IgG (Human) ELISA Kits (Abnova) gemessen. Dazu wurde nach Protokoll des Herstellers gearbeitet.

2.6 Bindungsversuche an transfizierten HEK-293-Zellen

HEK (human embryonic kidney) -293-Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen, die als Zelllinie in der Zellbiologie in den 1970er Jahren etabliert wurden und seitdem häufig eingesetzt werden, da sie sich gut kultivieren und mit Fremd-DNA transfizieren lassen (Graham et al. 1977). Zur Detektion von Autoantikörpern können sie nach folgendem Prinzip genutzt werden: Die Zellen exprimieren nach Transfektion mit einer Zielantigen-DNA das entsprechende Protein, an das Autoantikörper aus menschlichem Material als Primärantikörper dann binden können. Die Anlagerung von mit Cyaninfarbstoffen (Cy3) markierten Sekundärantikörpern an den Antigen-Primärantikörper-Komplex kann daraufhin mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

2.6.1 Kultivierung

Alle Arbeitsschritte mit den lebenden Zellen wurden zur Vermeidung von Kontamination unter der Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der HEK-293-Zellen erfolgte in 75cm² Zellkultur Flaschen bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator. Das Ausdünnen der Zellkultur erfolgte zwei Mal pro Woche in folgenden Schritten: Nach Absaugen des HEK-Mediums wurde die Flasche mit 2ml PBS Dulbecco gewaschen. Dann wurde mit 1ml Trypsin-EDTA 0,05% für 2 Minuten inkubiert, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Sie wurden danach in 10ml HEK-Medium aufgenommen und in einem Falcon bei 1500rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet resuspendiert und die Zellzahl mittels Anfärben der Zellsuspension durch Trypan Blau im Verhältnis 1:1 und Auszählen in einer Neubauer Zählkammer berechnet. Danach wurde die Zellsuspension mit HEK-Medium auf die Zielkonzentration von 2 Millionen Zellen pro Flasche verdünnt und ein Endvolumen von 10ml erneut ausgesät.

2.6.2 Transfektion

Im Detail erfolgten die Bindungsversuche an den HEK-293-Zellen über 6 Tage. Am ersten Tag wurde eine 24-Well-Platte mit 12mm-Deckgläsern belegt. Um für eine bessere Haftung der Zellen zu sorgen, wurden sie mit 150µl Poly-D-Lysin (PDL) beschichtet. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Deckgläser zwei Mal mit destilliertem, sterilem Wasser gewaschen und über Nacht trocknen gelassen. Am Folgetag erfolgte das Aussäen der HEK-Zellen. Zur Berechnung der Zellzahl und entsprechenden Verdünnung wurde wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben vorgegangen. Es wurden 20.000 Zellen pro Deckglas in einer Suspension von 200µl aufgetragen. Nach 24h Inkubationszeit erfolgte an Tag 3 die Transfektion mit der Fremd-DNA. Dazu diente die Calcium-Phosphat-Präzipitation, bei der durch das Ausfällen von Calciumphosphat ein Komplex mit der zu übertragenden DNA gebildet wird. Die entstandenen Kristalle werden dann über Endozytose in die Zellen aufgenommen (Graham et al. 1973). Es wurde Agrin-DNA und Cortactin-DNA verwendet, die jeweils an green fluorescent protein (GFP) gekoppelt waren, was eine erfolgreiche Transfektion sichtbar machte. Parallel wurden immer auch Zellen nur mit GFP-DNA transfiziert, um Vergleiche ziehen zu können. Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden 44% 0,1x TE-Puffer, die Fremd-DNA in einer Konzentration von 1µg/ml, 1,25% 2,5M CaCl₂ und 2x HBS-Puffer

zum Auffüllen in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben und vermischt. Der Ansatz wurde 5 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Schließlich wurden je 50µl pro Well tropfenweise zu den Zellen gegeben und diese über Nacht inkubiert. Am vierten Tag wurden die Zellen zwei Mal mit aufgewärmtem, frischem HEK-Medium gewaschen. Zuletzt wurden etwa 300µl Medium pro Well belassen und die Platte weiter inkubiert.

2.6.3 Färbung

An Tag 5 wurden die Zellen fixiert, mittels Triton permeabilisiert und die Primärantikörper aufgetragen. Zunächst wurden alle Wells nach Absaugen des Mediums mit PBS Dulbecco gewaschen. Dann erfolgte die Fixierung der Zellen mit 200µl 4%igem PFA für 20 Minuten. Anschließend wurden die Wells drei Mal mit PBS Dulbecco gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde im nächsten Schritt das PBS abgesaugt und 10%iges BSA/PBS für 20 Minuten inkubiert, in das zur Permeabilisierung der Zellmembranen Triton X-100 in einer Konzentration von 0,3% hinzugegeben wurde. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und 1%iges BSA/PBS für 5 Minuten aufgetragen und danach wieder entfernt. Dann erfolgte das Auftragen der Primärantikörper, die in 2%igem BSA/PBS verdünnt wurden. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

An Tag 6 wurden die fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper appliziert. Dazu wurden, nach dreimaligem Waschen der Wells mit PBS Dulbecco, Cy3-konjugierte Sekundärantikörper in einer Menge von 200µl pro Well aufgetragen. Dazu dienten der Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG für das humane Material und der Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG für die Positivkontrolle, beide in einer Verdünnung von 1:300. Die Verdünnungen erfolgten jeweils in 2%igem BSA/PBS. Nach einstündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Wells drei Mal mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte das Eindeckeln der Deckgläser auf beschrifteten Objektträgern mittels Vectashield Mounting Medium with DAPI. DAPI steht für Diamidinphenylindol und ist ein Farbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA genutzt wird. Zur Fixierung der Deckgläser wurden diese mit CoverGrip Coverslip Sealant umrandet. Nach angemessener Zeit zum Trocknen konnten die Objektträger verblindet unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

2.6.4 Bindungsversuche an Cortactin-transfizierten HEK-293-Zellen

Es wurden die 5 im ELISA positiv getesteten Patienten- und Kontrollseren und 5 im ELISA negative Kontrollseren an Cortactin-transfizierten HEK-Zellen getestet. Als Primärantikörper dienten die Patienten- und Kontrollseren und ein kommerzieller Antikörper für die Positivkontrolle. Dazu wurde das Serum 1:100 und 1:500 verdünnt und mit 200µl pro Well aufgetragen. Für die Positivkontrolle wurde der Anti-Cortactin Rabbit Polyclonal Antibody in einer Verdünnung von 1:200 verwendet. Korrespondierend zu jedem Serum wurde eine Kontrolle mit GFP-transfizierten Zellen durchgeführt. In der Auswertung wurde dementsprechend jede Probe mit der Positiv- und der GFP Kontrolle verglichen.

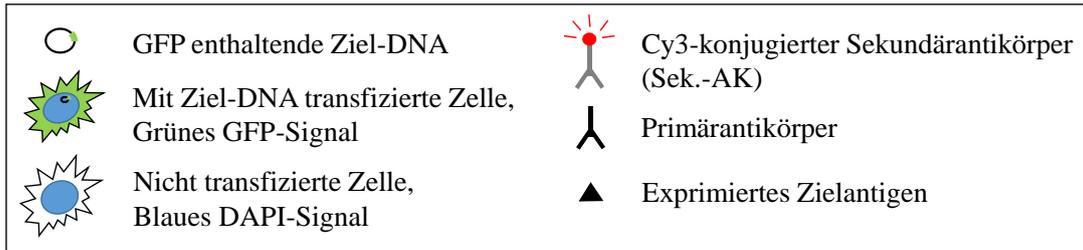
2.6.5 Bindungsversuche an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen

Es wurden alle Patientenseren und 5 Kontrollseren an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen getestet, da im ELISA keine positiven Seren identifiziert werden konnten und der Zell-basierte Assay zur Bestätigung der negativen Ergebnisse im ELISA dienen sollte. Als Primärantikörper dienten die Patienten- und Kontrollseren und ein kommerzieller Antikörper für die Positivkontrolle. Dazu wurde das Serum 1:100 und 1:500 verdünnt und mit 200µl pro Well aufgetragen. Für die Positivkontrolle wurde der Anti-Agrin Rabbit Antibody in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Korrespondierend zu jedem Serum wurde eine Kontrolle mit GFP-transfizierten Zellen durchgeführt. In der Auswertung wurde dementsprechend jede Probe mit der Positiv- und der GFP Kontrolle verglichen.

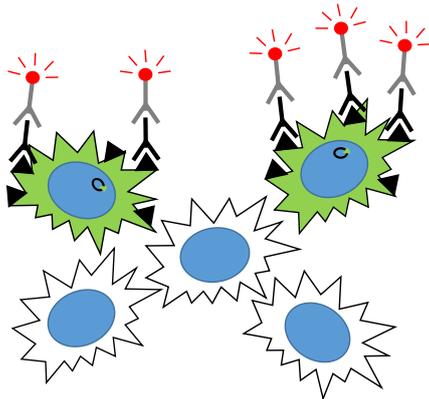
2.6.6 Auswertungsprinzip der Bindungsversuche an transfizierten HEK-293-Zellen

Der Versuchsablauf für die Bindungsversuche an transfizierten HEK-293-Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Die Färbungen wurden verblindet am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Grundlage dafür waren die Signale der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 (rot), GFP (grün) und DAPI (blau), die in den entsprechenden Kanälen beurteilt wurden. Cy3 war an den Sekundärantikörper gekoppelt, wodurch eine farbliche Markierung der Zellen bei dessen Bindung an den Zielantigen-Primärantikörper-Komplex erfolgte. GFP war jeweils in den DNAs von Agrin und Cortactin enthalten, wodurch der Transfektionserfolg kontrolliert werden konnte. Die

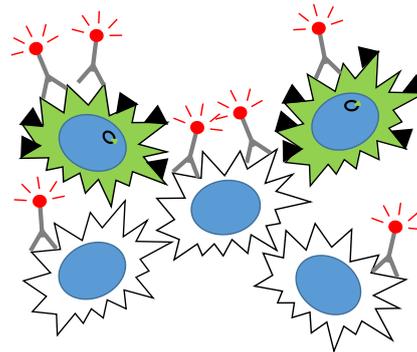
Anfärbung der DNA und somit der Zellkerne durch DAPI, das beim Eindeckeln appliziert wurde, ermöglichte einen Überblick über alle intakten Zellen auf dem Deckglas. Zur Beurteilung der Färbungen wurde wie folgt vorgegangen: Die im Cy3-Kanal gefärbt erscheinenden Zellen wurden im GFP-Kanal auf ihre Transfektion überprüft. Wenn die Lokalisation des Cy3-Signals mit der des GFP-Signals übereinstimmte, wurde die Probe als positiv gewertet. Dies setzt schließlich voraus, dass der Cy3-konjugierte Sekundärantikörper genau an die Zellen gebunden hat, die erfolgreich transfiziert wurden und das Zielantigen exprimierten, an das der Primärantikörper aus der Probe binden konnte. Erschienen die Zellen im Cy3-Kanal dahingegen als recht homogen schwach gefärbt und ließen keine Kolokalisation mit dem GFP-Signal zu, wurde die Probe als negativ gewertet. In diesem Fall hat der Cy3-konjugierte Sekundärantikörper unspezifisch an alle Zellen gebunden und eine Hintergrundfärbung verursacht, unabhängig vom Transfektionserfolg. Mittels Überlagerung der Cy3- und der GFP-Aufnahmen ließ sich die Kolokalisation nach dem Mikroskopieren besonders gut nachvollziehen. Die zuerst folgende Abbildung 3 veranschaulicht das Auswertungsprinzip schematisch. Die darauf folgende Abbildung 4 zeigt den Sachverhalt anhand von Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops. Außerdem floss auch die Intensität des Cy3-Signals in die Bewertung der Färbungen mit ein. Bei spezifischen Bindungen erfolgte eine Einteilung in schwach und stark.



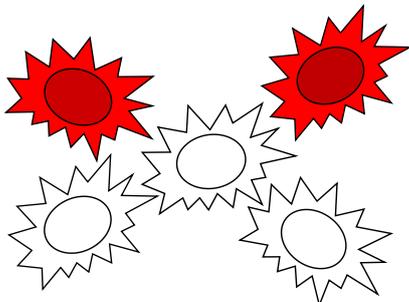
A Spezifische Bindung des Sek.-AK



B Unspezifische Bindung des Sek.-AK



A* Spezifisches Cy3-Signal



B* Unspezifischer Cy3-Hintergrund

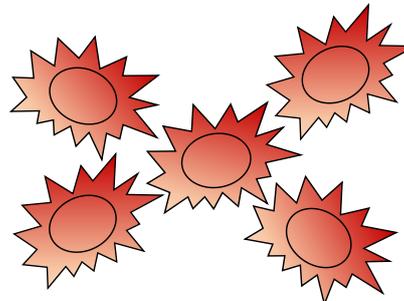
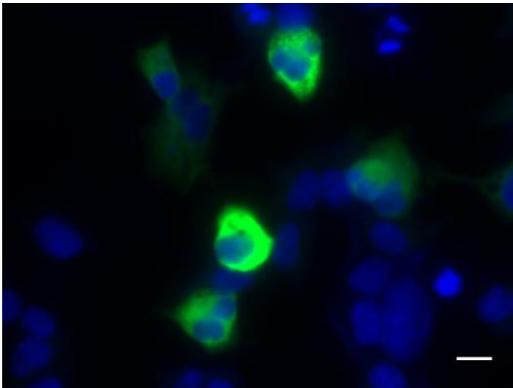


Abbildung 3 Schematische Gegenüberstellung des Bindungsverhaltens des Sekundärantikörpers (A und B) und des daraus folgenden Cy3-Signals (A* und B*)

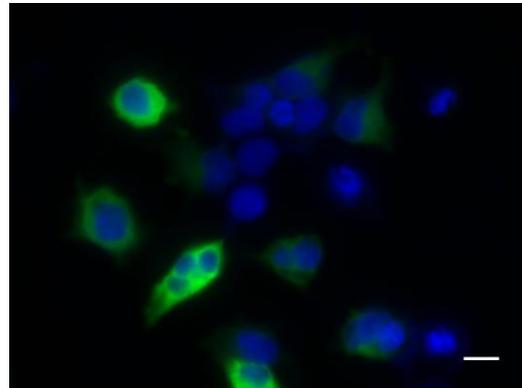
Das Bindungsverhaltens des Cy3-markierten Sekundärantikörpers erfolgte in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Zielantigen-Primärantikörper-Komplexes: In A bindet der Sekundärantikörper an die Zellen, die transfiziert wurden und das Zielantigen exprimierten, an das dann ein Primärantikörper binden konnte. Es handelt sich um eine spezifische Bindung. In B bindet der Sekundärantikörper an alle Zellen, unabhängig vom Transfektionserfolg. Es handelt sich um eine unspezifische Bindung. Das unter dem Mikroskop sichtbare Cy3-Signal zeigte sich jeweils korrespondierend: In A* resultierte ein spezifisches Cy3-Signal, wodurch die Probe als positiv gewertet wurde. In B* resultierte ein unspezifischer Cy3-Hintergrund, wodurch die Probe als negativ gewertet wurde.

Überlagerung der GFP- und DAPI Aufnahmen

A Spezifische Bindung des Sek.-AK

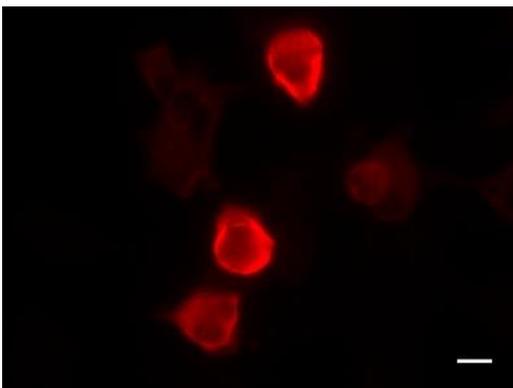


B Unspezifische Bindung des Sek.-AK



Cy3-Aufnahmen

A* Spezifisches Cy3-Signal



B* Unspezifischer Cy3-Hintergrund

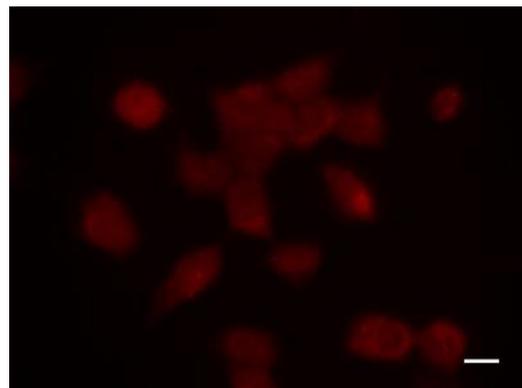


Abbildung 4 Aufnahmen-basierte Gegenüberstellung der vorliegenden bzw. transfizierten HEK-293-Zellen (A und B) und des aus dem Bindungsverhalten des Sekundärantikörpers folgenden Cy3-Signals (A* und B*)

Das Bindungsverhalten des Cy3-markierten Sekundärantikörpers erfolgte in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Zielantigen-Primärantikörper-Komplexes: In A sind die GFP- und DAPI-Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops überlagert, sodass man sieht, wie viele Zellen in dem Bildausschnitt vorliegen (DAPI, blau) und welche von ihnen erfolgreich transfiziert wurden (GFP, grün). Die GFP-gefärbten Zellen exprimieren das Ziel-Antigen. Die Bindung des Primär- und Sekundärantikörpers ist nicht sichtbar. In A* erfolgte eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die transfizierten Zellen. Es resultierte ein spezifisches Cy3-Signal, wodurch die Probe als positiv gewertet wurde. In B* erfolgte eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an alle Zellen, unabhängig vom Transfektionserfolg. Es resultierte ein unspezifischer Cy3-Hintergrund, wodurch die Probe als negativ gewertet wurde. Maßstab 15 µm.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Kurzform in der aus dieser Studie hervorgegangenen Veröffentlichung beschrieben (Doppler et al. 2021).

3.1 Detektion und Charakterisierung von Anti-Cortactin-Autoantikörpern

Mittels ELISA und Bindungsversuchen an transfizierten HEK-293-Zellen konnten 5 Seren mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern identifiziert werden. 3 der 5 Seren stammten von Myasthenie Patient*innen, die anderen 2 Seren hingegen von Kontrollpersonen. Anschließend wurden die detektierten Autoantikörper genauer charakterisiert. In keiner der Plasmapherese-Proben konnten Anti-Cortactin-Autoantikörper nachgewiesen werden.

3.1.1 Anti-Cortactin-ELISA

Es wurden alle Patientenseren, Plasmapherese-Proben und Kontrollseren wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben mittels ELISA auf Anti-Cortactin-Autoantikörper getestet. Der Schwellenwert für die Detektion wurde als vier Standardabweichungen über dem Mittelwert der optischen Dichten der Kontrollseren definiert. Zur Berechnung des Mittelwerts der Kontrollseren wurden die beiden Kontrollseren mit positivem Anti-Cortactin-Autoantikörper Nachweis ausgeschlossen. Die Berechnung basierte folglich nur auf den optischen Dichten von 48 statt 50 Kontrollseren. Der Mittelwert der Kontrollseren betrug 0,131 (Spannweite 0 bis 0,438). Vier Standardabweichungen über dem Mittelwert lagen dementsprechend bei 0,496. Der Mittelwert der Patientenseren betrug 0,235 (Spannweite 0,035 bis 1,740) und der der Plasmapherese-Proben 0,152 (Spannweite 0 bis 0,374). Die optische Dichte von drei Patientenseren lag über dem Schwellenwert: Patient 1 (optische Dichte: 1,740), Patient 2 (optische Dichte 0,668) und Patient 3 (optische Dichte 1,184). Außerdem überschritten die optischen Dichten von zwei Kontrollseren ebenfalls den Schwellenwert: Kontrolle 1 (optische Dichte 4,095) und Kontrolle 2 (optische Dichte 4,040). Keine der optischen Dichten der Plasmapherese-Proben lag über dem Schwellenwert. Im hiernach aufgeführten Diagramm sind die Messwerte und der Schwellenwert dargestellt.

3.1.3 Bestimmung der IgG-Subklassen der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren

Die IgG-Subklassen der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren wurden mittels ELISA bestimmt, bei dem subklassenspezifische Sekundärantikörper verwendet wurden (siehe Kapitel 2.5.6). Patient 1 und die positive Kontrolle 2 zeigten prädominant eine IgG3-Subklasse. Die Ergebnisse der positiven Kontrolle 1 ließen auf eine IgG1-Subklasse schließen. Die optischen Dichten der Patienten 2 und 3 fielen jeweils sehr gering aus, was möglicherweise mit den niedrigen Antikörpertitern der Seren zusammenhängt (siehe Kapitel 3.1.2). Für diese beiden Proben ließ sich die IgG-Subklasse nicht eindeutig bestimmen. Im folgenden Balkendiagramm sind die ELISA-Ergebnisse für die einzelnen Proben und IgG-Subklassen jeweils dargestellt.

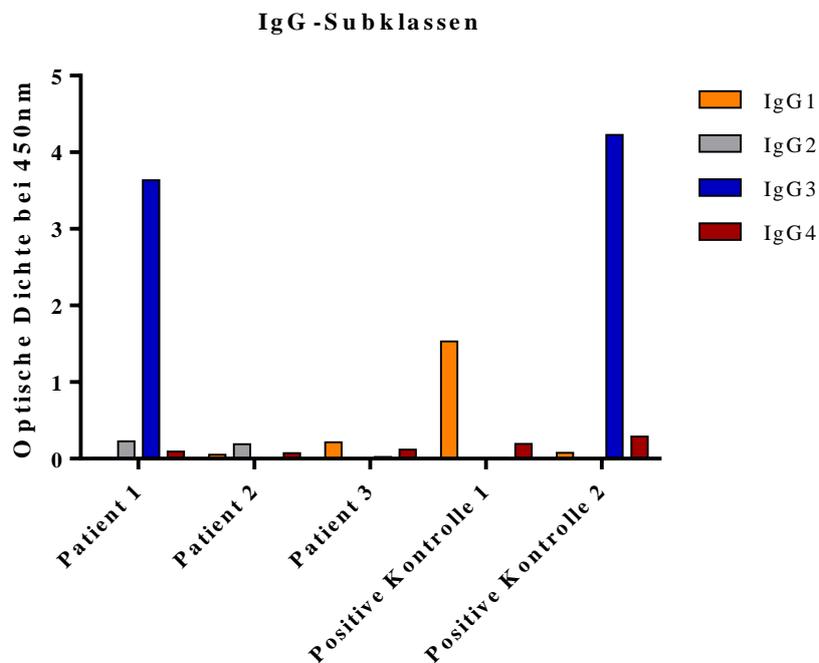


Abbildung 6 IgG-Subklassen der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren

Die optischen Dichten im ELISA (y-Achse) bei Einsatz der subklassenspezifischen Sekundärantikörper (farbige Legende) sind für jedes Serum mit nachgewiesenen Anti-Cortactin-Autoantikörpern (x-Achse) aufgeführt. Patient 1 und die positive Kontrolle 2 zeigten prädominant eine IgG3-Subklasse, die positive Kontrolle 2 hingegen eine IgG1-Subklasse. Die optischen Dichten von Patient 2 und 3 ließen keine eindeutige Zuordnung zu einer IgG-Subklasse zu. Dies steht möglicherweise im Zusammenhang mit den niedrigen Antikörpertitern der Seren.

3.1.4 Komplementbindungsversuche der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren

Mittels ELISA wurde die Komplementbindung der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren getestet. Zum Vergleich dienten 2 im ELISA negativ getestete Kontrollseren. Methodisch wurde wie in Kapitel 2.5.7 beschrieben vorgegangen. Die höchsten optischen Dichten zeigten Patient 1 (OD: 3,685), das positive Kontrollserum 1 (OD: 3,489) und das positive Kontrollserum 2 (OD: 4,264), wodurch eine eindeutige Komplementbindung belegt wurde. Diese drei Seren hatten auch die höchsten optischen Dichten und Titer im Anti-Cortactin-ELISA gezeigt (siehe 3.1.1 und 3.1.2). Bei ihnen konnten die Subklassen IgG1 bzw. IgG3 festgestellt werden (siehe 3.1.3). Patient 2 und Patient 3 erreichten ebenfalls leicht erhöhte Werte mit optischen Dichten von 1,525 und 1,935. Daraus ließ sich auf eine schwache Komplementbindung schließen. Die im ELISA negativ auf Anti-Cortactin-Autoantikörper getesteten Kontrollseren zeigten geringere optische Dichten von 0,872 und 0,977. Die Werte sind im folgenden Balkendiagramm dargestellt.

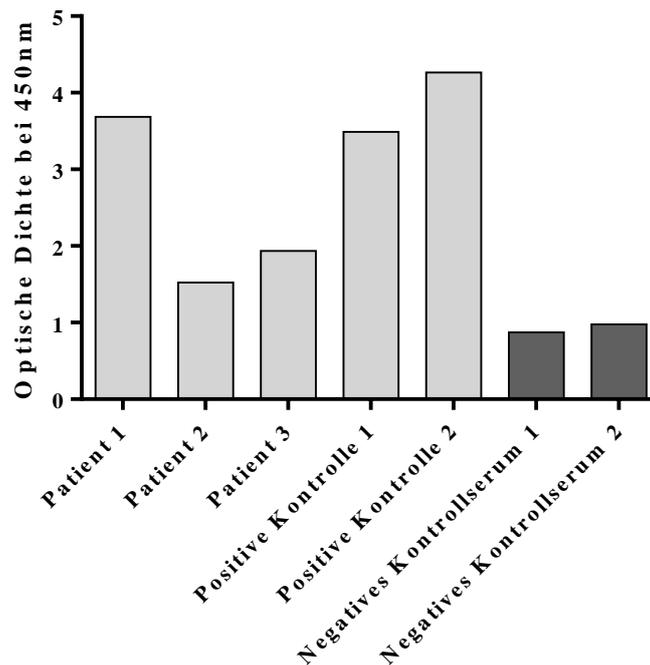


Abbildung 7 Komplementbindungsverhalten der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren
 Vergleich der optischen Dichten (y-Achse) der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren (hellgrau) mit zwei ELISA-negativen Kontrollseren (dunkelgrau) im Komplementbindungsversuch. Die höchsten optischen Dichten und damit eine eindeutige Komplementbindung zeigten Patient 1 (OD: 3,685), die positive Kontrollen 1 (OD: 3,489) und die positive Kontrolle 2 (OD: 4,264). Patient 2 (OD: 1,525) und Patient 3 (OD: 1,935) erreichten leicht erhöhte Werte, was eine schwache Komplementbindung annehmen lässt. Die negativen Kontrollseren zeigten geringere optische Dichten (OD: 0,872 und 0,977).

3.1.5 Bestätigung der Spezifität mittels Bindungsversuchen an Cortactin-transfizierten HEK-293-Zellen

Es wurden die 5 im ELISA positiv auf Anti-Cortactin-Autoantikörper getesteten Seren und 5 im ELISA negative Kontrollseren an Cortactin-transfizierten HEK-293-Zellen getestet, um die Spezifität der Autoantikörper zu bestätigen. Dies gelang für die positiven Kontrollseren 1 und 2 und das Serum des Patienten 2. Methodisch wurde wie in Kapitel 2.6.1 bis 2.6.4 beschrieben vorgegangen.

Anfangs wurden die Seren in den Verdünnungen 1:100 und 1:500 getestet, wobei letztere eine deutlich schwächere Hintergrundfärbung aufwies und somit besser zur Beurteilung geeignet war. Aus diesem Grund wurden die Zellen im Verlauf ausschließlich mit einer Serumverdünnung von 1:500 gefärbt. In den Abbildungen werden die Aufnahmen der verschiedenen Kanäle nebeneinander aufgeführt, sodass ein Vergleich zwischen den Cy3- und GFP-Signalen möglich ist. Die Überlagerung ermöglicht das Überprüfen der

Kolokalisation wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben. Die Aufnahme des DAPI-Signals gibt einen Überblick über alle auf dem Deckglas vorhandenen Zellen.

In Abbildung 8 wird die starke Bindung der im ELISA positiv auf Anti-Cortactin-Autoantikörper getesteten Kontrollseren 1 und 2 an Cortactin-transfizierten HEK-293-Zellen dargestellt, die die ELISA-Ergebnisse bestätigt. Dazu dient der Vergleich zwischen der Positivkontrolle, einem im ELISA negativ getesteten Kontrollserum und den beiden positiven Kontrollseren 1 und 2. Die Aufnahmen der Positivkontrolle und der positiven Kontrollseren zeigen, dass eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die erfolgreich mit Cortactin-DNA transfizierten Zellen erfolgte und dabei keine Bindung an die zusätzlich vorhandenen, nicht transfizierten Zellen vorlag. Die Lokalisation des Cy3- und des GFP-Signals ist deckungsgleich (siehe Überlagerung). Die Intensität des Cy3-Signals spricht außerdem für eine starke Bindung. Folglich wurden die Bindungsversuche mit dem Serum der Kontrollpersonen 1 und 2 als stark positiv gewertet. Die Aufnahmen des dargestellten, im ELISA negativ getesteten Kontrollserums zeigen, dass eine schwache und unspezifische Hintergrundfärbung vorlag, die unabhängig vom Transfektionserfolg war. Die Lokalisationen des Cy3- und des GFP-Signals stimmen nicht überein.

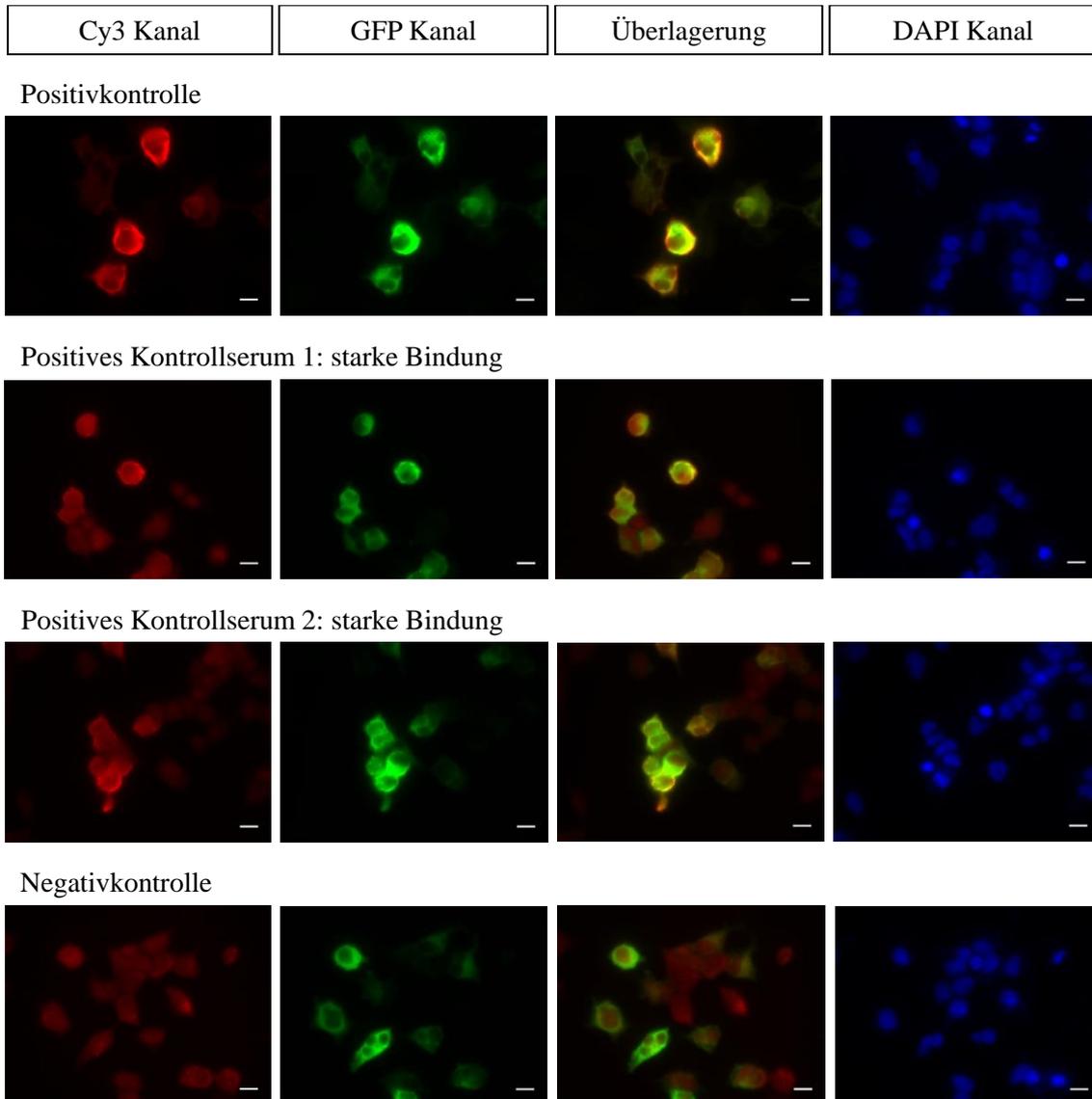


Abbildung 8 Starke Bindung der positiven Kontrollseren 1 und 2 an Cortactin-transfizierten HEK 293-Zellen

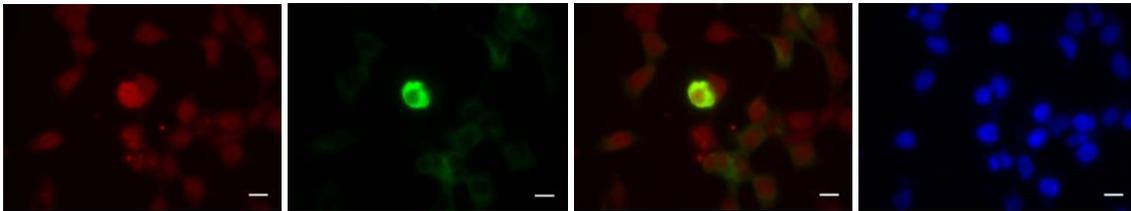
Vergleich der Positivkontrolle und einer Negativkontrolle (im ELISA negativ getestetes Kontrollserum) mit den im ELISA positiv getesteten Kontrollseren 1 und 2. Bei der Positivkontrolle und den Kontrollseren 1 und 2 ist die Lokalisation des Cy3- und des GFP-Signals (siehe Überlagerung) deckungsgleich, was eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers bestätigt. Zusätzlich spricht die Intensität des Cy3-Signals für eine starke Bindung. Die Negativkontrolle zeigt eine schwache, homogene Cy3-Hintergrundfärbung, die für eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers spricht. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Maßstab 15 µm.

In Abbildung 9 wird die schwache Bindung der im ELISA positiv auf Anti-Cortactin-Autoantikörper getesteten Patienten 1, 2 und 3 an Cortactin-transfizierten HEK-293-Zellen dargestellt. Patient 2 zeigte ein konsistentes Bindungsverhalten, bei dem eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die erfolgreich mit Cortactin-DNA

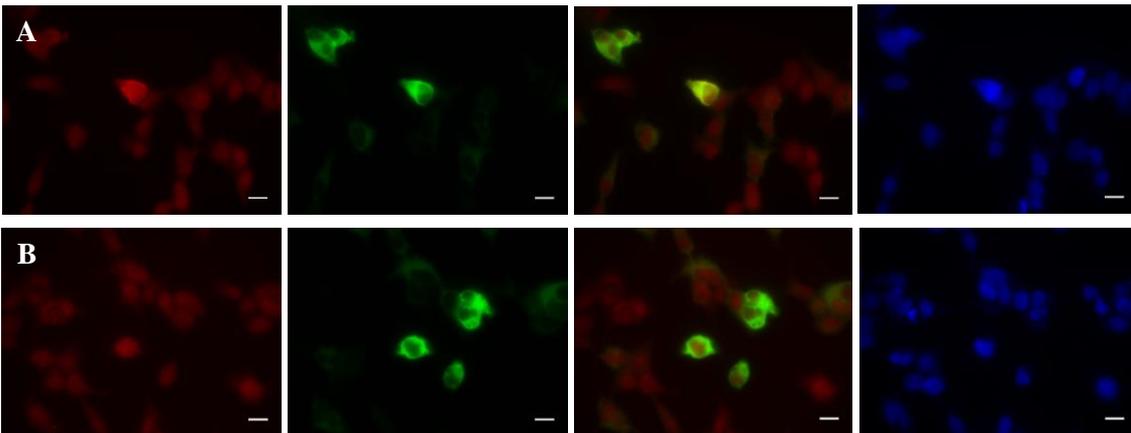
transfizierten Zellen erfolgte. Die Lokalisation des Cy3- und des GFP-Signals war deckungsgleich (siehe Überlagerung). Die Intensität des Cy3-Signals war jedoch schwächer ausgeprägt als bei den positiven Kontrollseren 1 und 2 (siehe Abbildung 8). Folglich wurden die Bindungsversuche mit dem Serum von Patient 2 an HEK-293-Zellen als schwach positiv gewertet und das ELISA-Ergebnis damit bestätigt. Patient 1 und 3 zeigten hingegen ein inkonsistentes Bindungsverhalten an den HEK-293-Zellen. In manchen Bereichen der Objektträger waren spezifische Bindungen der Seren an die Zellen zu erkennen. Cy3- und GFP-Signal stimmten dort überein (siehe mit A markierte Zeile in Abbildung 9). Allerdings gab es auch Zellgruppen, die basierend auf dem GFP-Signal eindeutig transfiziert waren, an denen aber keine Bindung der Seren nachgewiesen werden konnte (siehe mit B markierte Zeile). Folglich wurden die Bindungsversuche mit den Seren von Patient 1 und 3 als negativ gewertet und die ELISA-Ergebnisse nicht bestätigt.

Cy3 Kanal	GFP Kanal	Überlagerung	DAPI Kanal
-----------	-----------	--------------	------------

Patient 2: Konsistente, schwache Bindung - positiv gewertet



Patient 1: Inkonsistente, schwache Bindung - negativ gewertet



Patient 3: Inkonsistente, schwache Bindung - negativ gewertet

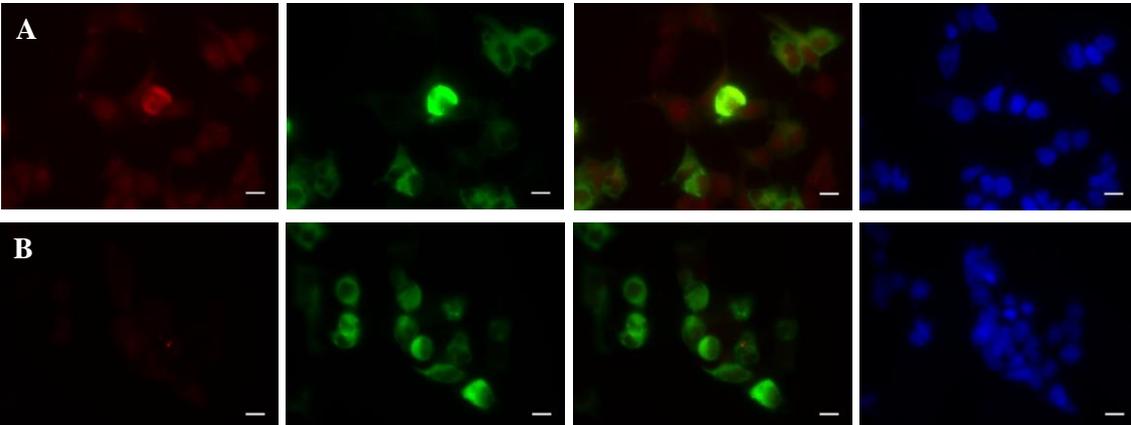


Abbildung 9 Schwache Bindung der Patientenserum 1 bis 3 an Cortactin-transfizierten HEK-293 Zellen

Patient 2: Konsistentes, schwaches Bindungsverhalten. Die Bindung ist spezifisch, da Cy3- und GFP-Signal übereinstimmen (siehe Überlagerung), allerdings ist die Intensität des Cy3-Signals schwächer ausgeprägt als bei den positiven Kontrollserum 1 und 2 (siehe Abbildung 8). Wertung folglich als schwach positiv. Patient 1 und 3: Inkonsistentes, schwaches Bindungsverhalten. In manchen Bereichen der Objektträger gab es spezifische Bindung mit Übereinstimmung des Cy3- und GFP-Signals (siehe mit A markierte Zeilen). Allerdings gab es auch Zellgruppen, die basierend auf dem GFP-Signal eindeutig transfiziert waren, an denen aber keine Bindung der Seren nachgewiesen werden konnte (siehe mit B markierte Zeilen). Wertung folglich als negativ. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Maßstab 15 µm.

3.1.6 Bestimmung des Gesamt-IgG-Gehalts aller Proben

Es wurde der Gesamt-IgG-Gehalt der 69 Patientenseren, der 50 Kontrollseren und der 82 Plasmapherese-Proben mittels eines kommerziellen ELISA Kits bestimmt (siehe Kapitel 2.5.8), um die Seren mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern diesbezüglich einordnen zu können. Der Mittelwert aller Patientenseren lag bei 9,33g/l (Spannweite 3,65g/l bis 16,42g/l), der aller Kontrollseren bei 10,54g/l (Spannweite 5,52g/l bis 17,46g/l) und der aller Plasmapherese-Proben bei 6,44g/l (Spannweite 1,81g/l bis 14,6g/l). Die Verteilungen dieser Daten sind in unten folgendem Diagramm dargestellt. Die Gesamt-IgG-Gehalte der auf Anti-Cortactin-Autoantikörper positiv getesteten Seren sind unter dem Diagramm tabellarisch aufgeführt. Die Werte von Patient 1 und 2 sowie von Kontrolle 1 und 2 liegen dabei unter dem Mittelwert ihrer Vergleichsgruppe. Ausschließlich Patient 3 hat einen höheren Gesamt-IgG-Gehalt als die Patientenseren im Durchschnitt.

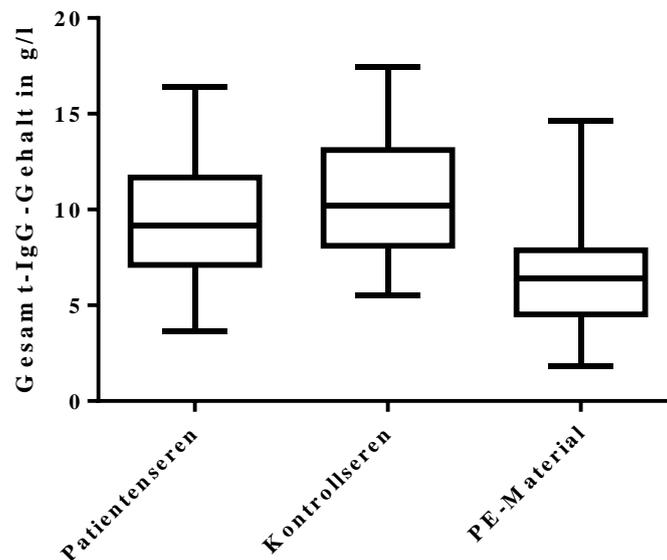


Abbildung 10 Verteilung des Gesamt-IgG-Gehalts im Gesamt-IgG-ELISA

Vergleich der Verteilung der Gesamt-IgG-Gehalte in g/l (abgebildet auf der y-Achse) zwischen den verschiedenen Probenarten bzw. Teilnehmergruppen (abgebildet auf der x-Achse): Patientenseren, Kontrollseren und Plasmapherese (PE)-Material.

Tabelle 11 Gesamt-IgG-Gehalt der Seren mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern

Seren mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern	Gesamt-IgG-Gehalt (g/l)	Mittelwert der Vergleichsgruppe (g/l)
Patient 1	9,0	9,33
Patient 2	8,84	
Patient 3	13,82	
Kontrolle 1	10,52	10,54
Kontrolle 2	9,93	

3.1.7 Wiederholte Serumentnahme und -untersuchung bei den Patienten 1, 2 und 3 im Studienverlauf

Nachdem in den Patientenseren 1, 2 und 3 Anti-Cortactin-Autoantikörper nachgewiesen wurden, sollte das Vorhandensein von diesen Autoantikörpern im Serum der Patient*innen zu einem späteren Zeitpunkt überprüft werden. Da alle drei Patient*innen regelmäßig in die Myasthenie-Ambulanz der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg kamen, war es möglich, Verlaufsseren von ihnen zu erhalten. Dazu gaben sie erneut ihr Einverständnis. Von den positiven Kontrollpersonen 1 und 2 konnten keine Verlaufsseren akquiriert werden. Im folgenden Diagramm werden die ursprünglichen ELISA-Ergebnisse der Patientenseren 1 bis 3 mit den Ergebnissen der jeweils abgenommenen Verlaufsseren gegenübergestellt. Die Verlaufsseren liegen dabei alle unter dem Schwellenwert mit den folgenden optischen Dichten: 0,262 (Patient 1), 0,317 (Patient 2) und 0,139 (Patient 3).

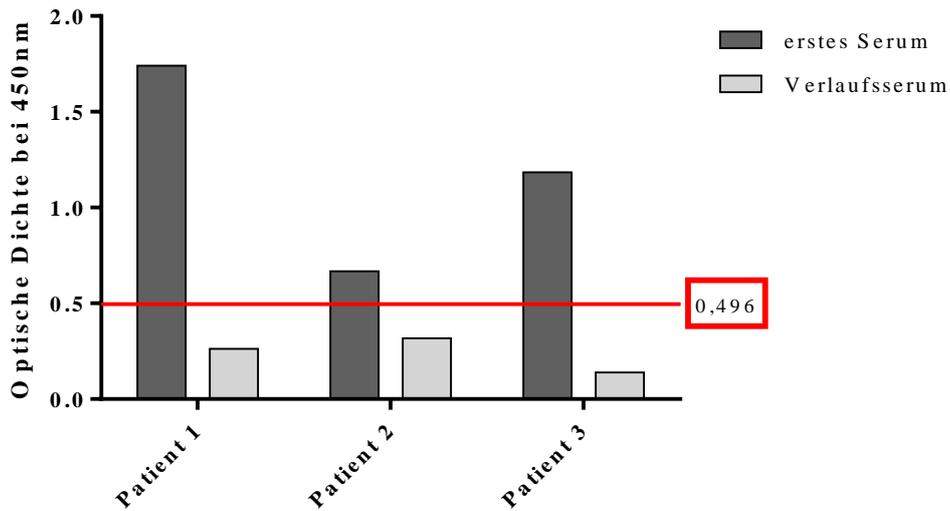


Abbildung 11 Vergleich der ursprünglichen ELISA-Ergebnisse mit den Ergebnissen der Verlaufsseren der Patienten 1-3

Vergleich der optischen Dichten (y-Achse) der ursprünglich abgenommenen Seren (erstes Serum, dunkelgrauer Balken) mit den optischen Dichten der zu einem späteren Zeitpunkt abgenommenen Seren (Verlaufsserum, hellgrauer Balken) der Patienten 1, 2 und 3 (x-Achse). Dabei zeigte sich, dass die Verlaufsseren alle unter dem Schwellenwert von 0,496 lagen.

3.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren

In Kapitel 3.1.1 bis 3.1.7 wurden die Ergebnisse jedes einzelnen Versuchs zur Detektion und Charakterisierung von Anti-Cortactin-Autoantikörpern aufgeführt. Für die Übersichtlichkeit folgt nun eine Tabelle, die die Einzelergebnisse für jedes Anti-Cortactin-Autoantikörper positive Serum zusammenfasst.

Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Kontrolle 1	Kontrolle 2
Optische Dichte (OD) bei Detektion	1,740	0,668	1,184	4,095	4,040
AK-Titer	1:500	1:100	1:100	1:2000	1:2000
IgG-Subklasse	IgG3	Nicht bestimmbar	Nicht bestimmbar	IgG1	IgG3
Komplementbindung (OD)	3,685	1,525	1,935	3,489	4,264
Bindung an HEK-Zellen	Negativ Inkonsistente schwache Bindung	Positiv Konsistente schwache Bindung	Negativ Inkonsistente schwache Bindung	Positiv Starke Bindung	Positiv Starke Bindung
Gesamt-IgG-Gehalt in g/l	9,0	8,84	13,82	10,52	9,93
Verlaufsserum (OD)	0,262	0,317	0,139	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden

3.2 Klinische Merkmale der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen

Bei 5 Personen wurden Anti-Cortactin-Autoantikörper nachgewiesen. 3 davon waren Myasthenie-Patient*innen, deren klinische Merkmale im Folgenden näher beschrieben werden. Auch die 2 positiven Kontrollpersonen werden charakterisiert. Alle Angaben beziehen sich auf den Rekrutierungszeitpunkt, wenn nicht anderweitig spezifiziert.

Patient 1 ist ein männlicher Myasthenie-Patient, der zum Zeitpunkt der Rekrutierung 72 Jahre alt war. Es wurden in der Routinediagnostik weder Anti-Acetylcholinrezeptor- noch

Anti-MuSK-Autoantikörper bei ihm nachgewiesen. Der Patient gilt folglich als seronegativ. Die Entnahme der Serumprobe für die Studie erfolgte 4 Monate nach der Myasthenie-Erstdiagnose, als der Patient einen Termin in der Myasthenie-Ambulanz in der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg wahrnahm. Klinisch führend waren bei ihm zum damaligen Zeitpunkt seit 4 Wochen fluktuierende Doppelbilder, die fast den ganzen Tag anhielten. Er fühlte sich im Alltag stark eingeschränkt, da er beispielsweise weder Lesen, Autofahren noch im Garten arbeiten konnte. Seine Verlaufsform der Erkrankung wird als isoliert-okuläre Myasthenie eingeordnet. In der klinischen Untersuchung fielen Doppelbilder beim Blick in alle Richtungen und eine fluktuierende Ptose rechts auf. Cogan- und Simpson-Zeichen waren positiv. Der Patient zeigte keine faziale Schwäche und die kaudalen Hirnnerven waren intakt. Die formale Kraftprüfung ergab keine Paresen. Es wurde ein Besinger-Toyka-Score von 3 von 7 erhoben (Vitalkapazität 3,26l, okuläre Symptome nach 5 Sekunden, 5 Stunden nach letzter Kalymin-Einnahme). Zu diesem Zeitpunkt wurde er mit 4x60mg Kalymin täglich behandelt. Der Patient nahm keine systemischen Steroide oder Immunsuppressiva ein. An Vorerkrankungen sind bei ihm arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Schlafapnoesyndrom und Asthma bronchiale bekannt. Bei Patient 1 konnte 22 Monate nach der Rekrutierung für die Studie ein Verlaufsserum abgenommen werden. Wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, wurden im Verlaufsserum keine Anti-Cortactin-Autoantikörper mehr nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt berichtete der Patient über einen symptomfreien Verlauf seiner Myasthenie in den vorangegangenen 3 Monaten. Es wurde ein Besinger-Toyka-Score von 1 von 7 erhoben (Vitalkapazität 2,88 l, Haltezeiten normal). Seine tägliche Therapie bestand aus 3x50 mg Azathioprin, 1x2,5 mg Prednisolon und 2x60 mg Kalymin.

Patient 2 ist eine weibliche Myasthenie-Patientin. Zum Zeitpunkt der Rekrutierung war die Patientin 66 Jahre alt. In der Routinediagnostik wurden Anti-MuSK-Autoantikörper bei ihr nachgewiesen. Die Entnahme der Serumprobe für die Studie erfolgte 25 Jahre nach der Myasthenie-Erstdiagnose, als die Patientin einen Termin in der Myasthenie-Ambulanz in der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg wahrnahm. Die Verlaufsform der Erkrankung war bei ihr in der Vergangenheit als generalisiert mit bulbärer Betonung eingeordnet worden. Zum Rekrutierungszeitpunkt war sie symptomfrei, nachdem sie sich gerade erst von einer Exazerbation der Myasthenie im

Rahmen einer mehrwöchigen Grippe mit zehntägiger Hospitalisierung erholt hatte. Die klinische Untersuchung zeigte keine okulären oder bulbären Symptome. In der formalen Kraftprüfung waren keine Paresen feststellbar. Es wurde ein Besinger-Toyka-Score von 3 von 7 erhoben (Kopfhaltezeit 75 Sekunden, Vitalkapazität 2 l). Ihre Langzeittherapie bestand aus 150 mg Azathioprin und 5 mg Prednisolon täglich. Cholinesterasehemmer nahm sie aufgrund schlechter Verträglichkeit nicht mehr ein, wobei diese durchaus eine Symptomverbesserung bewirkt hatten. Bei der Patientin waren keine Vorerkrankungen bekannt. 27 Monate nach der Rekrutierung für die Studie konnte ein Verlaufsserum abgenommen werden. Wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, wurden im Verlaufsserum keine Anti-Cortactin-Autoantikörper mehr nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt berichtete die Patientin über eine deutliche Reduktion der Belastungsfähigkeit. Sie konnte längere Gehstrecken nur noch verlangsamt zurücklegen und fühlte sich abgeschlagen. Zudem war ihr eine Schwäche der Kopfstreckmuskulatur, eine zunehmende Dysarthrie sowie vereinzelt Schluckbeschwerden in den letzten 12 Monaten aufgefallen. In der klinischen Untersuchung zeigten sich weder okuläre noch bulbäre Symptome. Die Kopfhaltezeit war mit 55 Sekunden verkürzt. Es ergab sich kein Hinweis auf manifeste Paresen, auch nicht nach repetitiver Belastung. Es wurde ein Besinger-Toyka-Score von 2 von 21 Punkten erhoben. Die tägliche Therapie bestand weiterhin aus 150 mg Azathioprin und 5 mg Prednisolon.

Patient 3 ist ebenfalls eine weibliche Myasthenie-Patientin. Zum Zeitpunkt der Rekrutierung war die Patientin 24 Jahre alt. In der Routinediagnostik wurden Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper bei ihr nachgewiesen. Die Entnahme der Serumprobe für die Studie erfolgte wenige Tage nach der Myasthenie-Erstdiagnose, als sich die Patientin in einem stationären Aufenthalt an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg befand. Klinisch führend waren bei ihr das Auftreten von Doppelbildern und eine Ptose rechts gewesen. Sie fühlte sich seit 2 Wochen abgeschlagen und das Treppensteigen fiel ihr schwer. Sprech- oder Schluckstörungen verneinte sie. Ihre Verlaufsform der Erkrankung wurde als generalisierte Myasthenie eingeordnet. In der klinischen Untersuchung zeigten sich eine Ptose rechts und Doppelbilder bei Blick nach rechts. Das Cogan-Zeichen war positiv. Im Simpson-Test sanken die Bulbi zwar nicht ab, jedoch gab die Patientin im Verlauf dabei Doppelbilder an. Sie zeigte keine manifesten Paresen. Zu diesem Zeitpunkt wurde sie symptomatisch täglich mit 4x60 mg Kalymin

behandelt. Bezüglich einer immunsuppressiven Therapie wurde gerade mit 50 mg Azathioprin und 10 mg Prednisolon täglich bei ihr begonnen. An Vorerkrankung waren bei der Patientin eine Schilddrüsenunterfunktion, Morbus Crohn, Migräne und Alopezie bekannt. 12 Monate nach der Rekrutierung für die Studie konnte ein Verlaufsserum abgenommen werden. Wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, wurden im Verlaufsserum keine Anti-Cortactin-Autoantikörper mehr nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt berichtete die Patientin über einen symptomfreien Verlauf ihrer Myasthenie in den vorangegangenen 4 Monaten. Es wurde ein Besinger-Toyka-Score von 0 von 21 Punkten erhoben. Die tägliche Therapie bestand aus 225 mg Azathioprin, 2,5 mg Prednisolon und 1-3x60 mg Kalymin.

Bei der positiven Kontrollperson 1 handelt es sich um eine zum Rekrutierungszeitpunkt 36 Jahre alte Frau ohne autoimmune Vorerkrankungen.

Die positive Kontrollperson 2 ist ein zum Rekrutierungszeitpunkt 84 Jahre alter Mann ohne autoimmune Vorerkrankungen.

Die Klinik der Myasthenie-Patient*innen, bei denen Anti-Cortactin-Autoantikörper nachgewiesen werden konnten, war nicht homogen. Die Patient*innen unterschieden sich im Geschlecht, Alter, Erkrankungsdauer, Verlaufsform und den zuvor nachgewiesenen, krankheitstypischen Autoantikörpern voneinander. Es kann kein einheitlicher Phänotyp für diese Patientengruppe abgeleitet werden. Die folgende Tabelle stellt die besprochenen Merkmale systematisch gegenüber.

Tabelle 13 Klinische Merkmale der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen

	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Geschlecht	männlich	weiblich	weiblich
Alter	72 Jahre	66 Jahre	24 Jahre
Nachgewiesene Autoantikörper	seronegativ	Anti-MuSK-Autoantikörper	Anti-AChR-Autoantikörper
Krankheitsdauer	4 Monate	25 Jahre	Erstdiagnose
Führende Symptomatik	Doppelbilder, Ptose rechts	symptomfrei	Doppelbilder, Ptose rechts
Besinger-Toyka Score	3 von 7 Punkten	3 von 7 Punkten	Nicht erhoben
Verlaufsform der Myasthenie	okulär	generalisiert, bulbäre Betonung	generalisiert
Therapie (tägliche Dosis)	4x60 mg Kalymin	150 mg Azathioprin 5 mg Prednisolon	4x60 mg Kalymin, 50 mg Azathioprin und 10mg Prednisolon (alle gerade erst begonnen)
Vorerkrankungen	arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus Typ 2, Schlafapnoe-syndrom, Asthma bronchiale	keine	Schilddrüsenunterfunktion, Morbus Crohn, Migräne, Alopezie
Verlaufsserum	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Zeitlicher Abstand zur ersten BE	22 Monate	27 Monate	12 Monate
Führende Symptomatik	symptomfrei	Subjektiv reduzierte Leistungsfähigkeit, verkürzte Kopfhaltzeit	symptomfrei

Besinger-Toyka-Score	1 von 7 Punkten	2 von 21 Punkten	0 von 21 Punkten
Therapie (tägliche Dosis)	3x50 mg Azathioprin, 1x2,5 mg Prednisolon, 2x60 mg Kalymin	150 mg Azathioprin, 5 mg Prednisolon	225 mg Azathioprin, 2,5 mg Prednisolon, 1-3x60 mg Kalymin

3.3 Keine Detektion von Anti-Agrin-Autoantikörpern

In keinem der Patienten- oder Kontrollseren konnten mittels ELISA oder Bindungsversuchen an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen Autoantikörper gegen Agrin nachgewiesen werden.

3.3.1 Anti-Agrin-ELISA

Es wurden alle Patientenseren, Plasmapherese-Proben und Kontrollseren wie in Kapitel 2.5.1 und 2.5.3 beschrieben mittels ELISA auf Anti-Agrin-Autoantikörper getestet. Der Schwellenwert für die Detektion wurde als vier Standardabweichungen über dem Mittelwert der optischen Dichten der Kontrollseren definiert. Der Mittelwert der Kontrollseren betrug 0,056 (Spannweite 0 bis 0,170). Vier Standardabweichungen über dem Mittelwert lagen dementsprechend bei 0,246. Der Mittelwert der optischen Dichten der Patientenseren betrug 0,071 (Spannweite 0 bis 0,243) und der der Plasmapherese-Proben 0,037 (Spannweite 0 bis 0,177). Kein Einzelwert der optischen Dichten der Patientenseren oder Plasmapherese-Proben lag über dem Schwellenwert von 0,246. Die Detektion von Anti-Agrin-Autoantikörpern gelang folglich nicht. Die Messwerte und der Schwellenwert sind in dem hiernach aufgeführten Diagramm dargestellt.

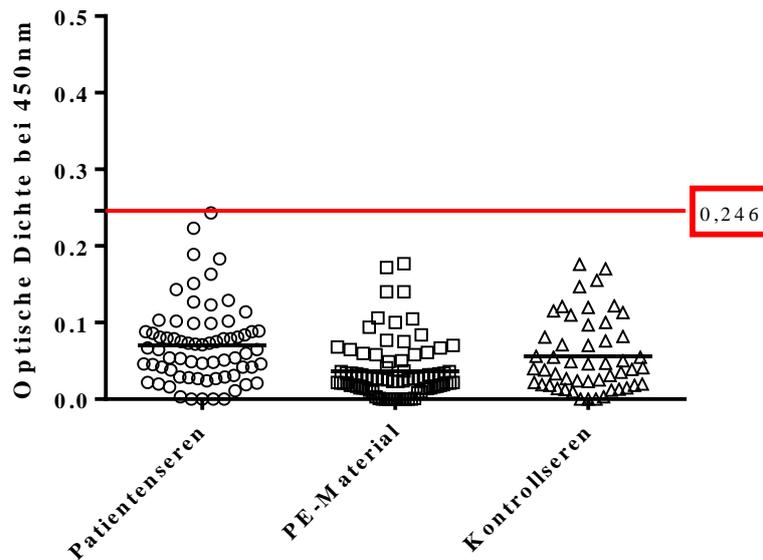


Abbildung 12 Verteilung der optischen Dichten im Agrin-ELISA

Vergleich der Verteilung der optischen Dichten (abgebildet auf der y-Achse) zwischen den verschiedenen Probenarten bzw. Teilnehmergruppen (abgebildet auf der x-Achse): Patientenseren, Plasmapherese (PE)-Material und Kontrollseren. Die durchgezogene Linie bei $y=0,246$ stellt den Schwellenwert dar, der als vier Standardabweichungen über dem Mittelwert der Kontrollseren definiert wurde. Keine einzelne Probe liegt darüber, folglich konnten keine Anti-Agrin-Autoantikörper detektiert werden.

3.3.2 Validierung des Anti-Agrin-ELISAs

Zur methodischen Validierung des Anti-Agrin-ELISAs stellte Frau Prof. Dr. Claeys (Neurologische Universitätsklinik Löwen, Belgien) freundlicherweise 4 Seren von Myasthenie Patient*innen zur Verfügung, die im Rahmen einer vergleichbaren Studie (Cordts et al. 2017) mittels ELISA positiv auf Anti-Agrin-Autoantikörper getestet worden waren. Die Seren wurden hier gemäß des in Kapitel 2.5.1 und 2.5.3 beschriebenen Protokolls erneut auf Anti-Agrin-Autoantikörper untersucht und die optischen Dichten wie in Kapitel 2.5.4 erläutert ausgewertet. Das Versuchsergebnis zeigte, dass bei keinem der 4 Seren unter den hiesigen Konditionen und dem hiesigen Versuchsaufbau Anti-Agrin-Autoantikörper detektiert werden konnten. Die Mittelwerte der optischen Dichten der beschichteten Well-Dupletts lagen zwar jeweils noch über dem Schwellenwert von 0,246, doch nach der Subtraktion des Mittelwerts der unbeschichteten Well-Dupletts sanken die finalen Werte unter den Schwellenwert ab. Folgendes Balkendiagramm dient zur Veranschaulichung der Werte. Die 4 zugesendeten Seren sind als „Belgienserum“ 1 bis 4 benannt.

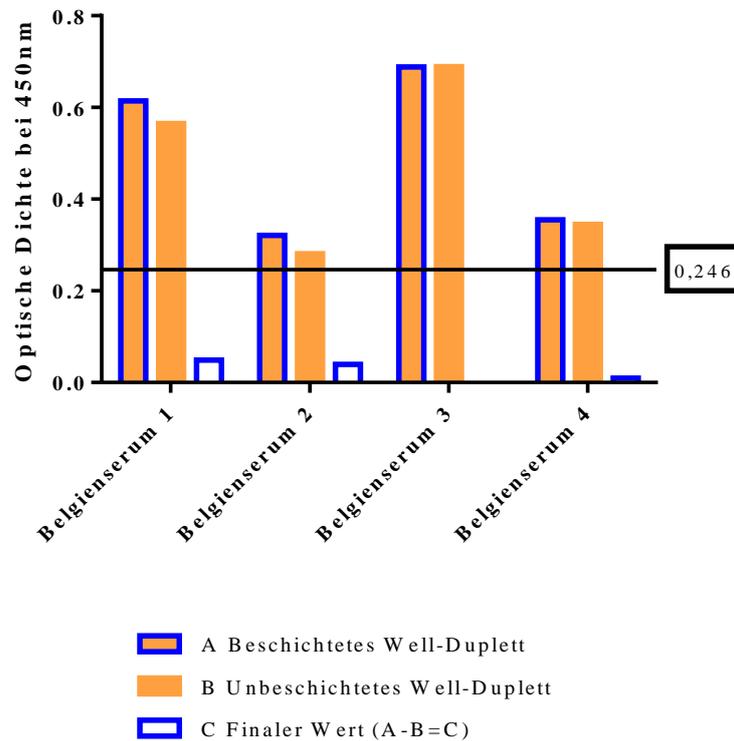


Abbildung 13 Optische Dichten der Belgienserum im Agrin-ELISA

Darstellung der Mittelwerte der optischen Dichten der beschichteten und unbeschichteten Well-Dupletts der Belgienserum im Balkendiagramm. Alle Mittelwerte liegen zunächst über dem Schwellenwert von 0,246, der bei $y=0,246$ als Linie eingetragen ist. Nach der Subtraktion der Mittelwerte der unbeschichteten Well-Dupletts von denen der beschichteten Well-Dupletts sinken die finalen Werte jeweils unter den Schwellenwert ab. Die Belgienserum wurden folglich mit dem hiesigen Versuchsaufbau negativ auf Anti-Agrin-Autoantikörper getestet.

3.3.3 Bindungsversuche an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen

Es wurden alle 69 Patientenserum und 5 Kontrollserum an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen getestet, um die negativen Ergebnisse im Agrin-ELISA zu bestätigen. Auch mit den Belgienserum, die zur Validierung des Anti-Agrin-ELISAs zugeschickt worden waren (siehe Kapitel 3.3.2), wurden Bindungsversuche an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt. Methodisch wurde wie in den Kapiteln 2.6.1 bis 2.6.3 und 2.6.5 beschrieben vorgegangen.

Die Seren wurden in den Verdünnungen 1:100 und 1:500 getestet, wobei letztere eine deutlich schwächere Hintergrundfärbung aufwies und somit besser zur Beurteilung geeignet war (siehe Abbildung 15). Aus diesem Grund erfolgt in der Abbildung 14 der Vergleich zwischen der Positivkontrolle und den exemplarisch ausgewählten Seren ausschließlich in der Verdünnung 1:500. Die Aufnahmen der verschiedenen Kanäle

werden nebeneinander aufgeführt, sodass ein Vergleich zwischen den Cy3- und GFP-Signalen möglich ist. Die Überlagerung ermöglicht das Überprüfen der Kolo-kalisation wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben. Die Aufnahme des DAPI-Signals gibt einen Überblick über alle auf dem Deckglas vorhandenen Zellen.

Die Aufnahmen der Positivkontrolle zeigten, dass eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die erfolgreich mit Agrin-DNA transfizierten Zellen erfolgte und dabei keine Bindung an die zusätzlich vorhandenen, nicht transfizierten Zellen vorlag. Die Lokalisation des Cy3- und des GFP-Signals ist deckungsgleich. Die Aufnahmen des dargestellten Kontrollserums, des Patientenserums und des Belgienserums zeigen repräsentativ für das gesamte getestete Material, dass eine unspezifische Hintergrundfärbung vorlag, die unabhängig vom Transfektionserfolg war. Die Lokalisationen des Cy3- und des GFP-Signals stimmen nicht überein. Somit wurden die negativen Ergebnisse des Anti-Agrin-ELISAs im Zell-basierten Assay bestätigt.

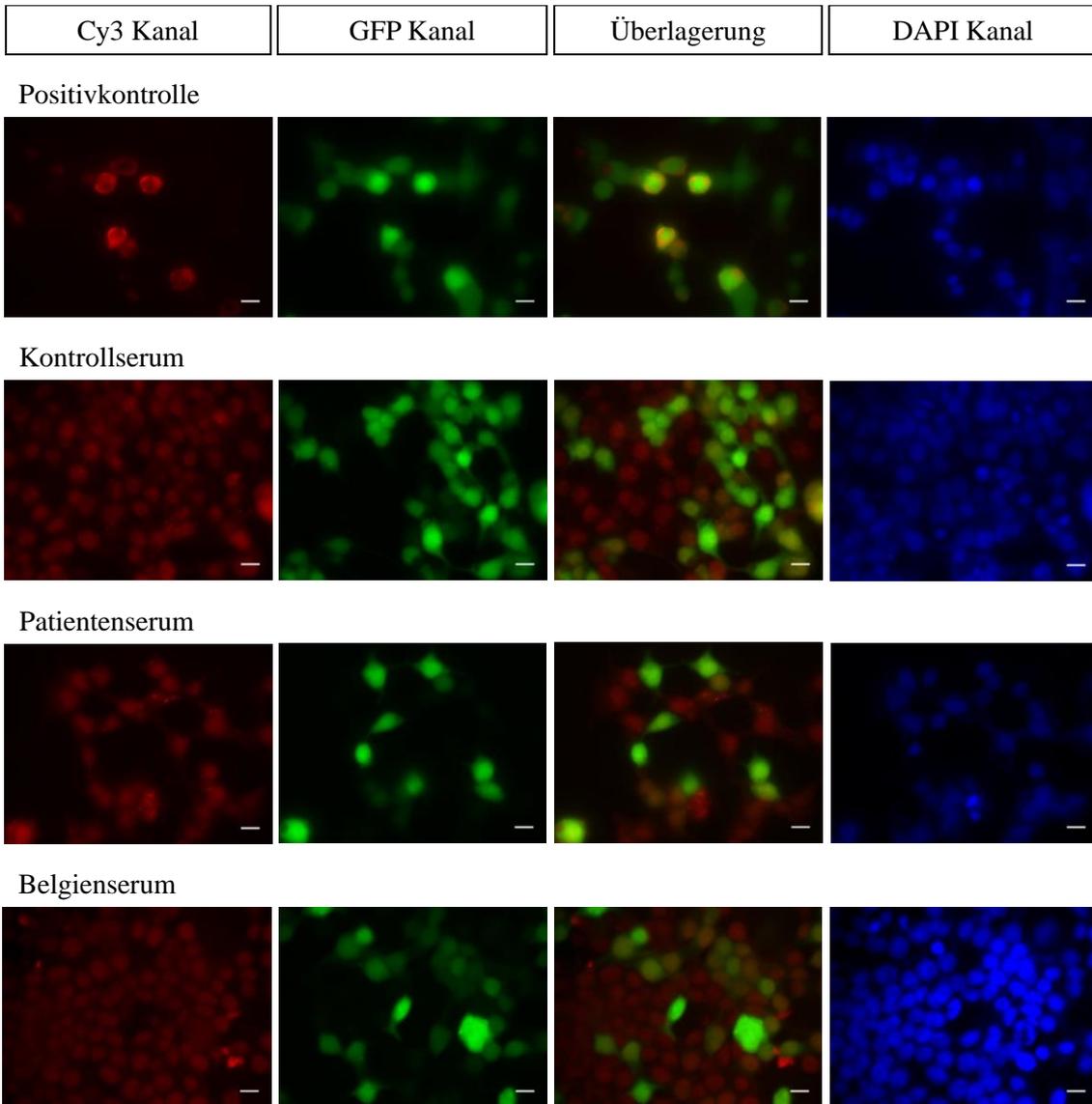
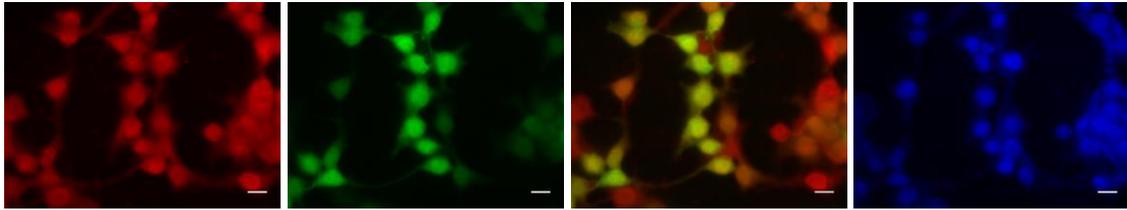


Abbildung 14 Färbungen der Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen

Vergleich der Positivkontrolle mit jeweils einem repräsentativen Serum jeder Proben­gruppe: Kontrollserum, Patientenserum und Belgienserum. Bei der Positivkontrolle ist die Lokalisation des Cy3- und des GFP-Signals deckungsgleich (siehe Überlagerung), was eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers bestätigt. Die anderen dargestellten Seren zeigen eine schwache, homogene Cy3-Hintergrundfärbung, die für eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers spricht. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Maßstab 15 µm.



Kontrollserum Verdünnung 1:100



Kontrollserum Verdünnung 1:500

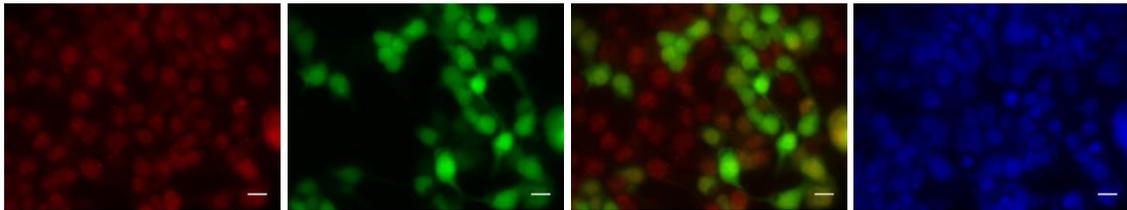


Abbildung 15 Vergleich der Färbungen bei Serumverdünnung 1:100 und 1:500

Repräsentativer Vergleich der Färbungen eines Kontrollserums in den Verdünnungen 1:100 und 1:500. Bei der Beurteilung der Färbungen von Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen wiesen die Serumverdünnungen von 1:100 mehrheitlich eine stärkere unspezifische Hintergrundfärbung auf als die Verdünnungen von 1:500. Aus diesem Grund werden die Aufnahmen in Abbildung 14 nur in der Serumverdünnung von 1:500 verglichen. Maßstab 15 μ m.

4 Diskussion

4.1 Cortactin und Agrin als neue Antigene bei Myasthenia gravis

Nachdem in den 1970er Jahren erstmals Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper bei 80-90% der Patient*innen mit generalisierter Myasthenia gravis nachgewiesen wurden, begann die Suche nach weiteren Antigenen von Autoantikörpern, die möglicherweise ebenfalls zum Krankheitsbild der Myasthenia gravis führen. Die Identifizierung von Anti-MuSK- und Anti-LRP4-Autoantikörpern in den letzten zwei Jahrzehnten als ebenfalls pathogenetisch ursächlich brachte die Erkenntnis, dass nicht nur direkte Wirkungen am Acetylcholinrezeptor, sondern auch Signalwege zur Formierung und Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatte eine Rolle bei der Myasthenia gravis spielen (Gilhus et al. 2015). Da aber nach wie vor bei 3-5% der Myasthenie-Patient*innen kein Autoantikörpernachweis gelingt (Gilhus 2016), ist die Erforschung der Pathogenese nicht vollständig abgeschlossen. Der Agrin-LRP4-MuSK-Signalweg geriet folglich in den Fokus und auch das nachgeschaltet davon agierende intrazelluläre Cortactin reihte sich in die Gruppe der potentiellen Antigene mit ein (Kim et al. 2008, Zhang et al. 2008, Madhavan et al. 2009, Gallardo et al. 2014). Im Kapitel 1.2 sind Informationen zu Funktion und Zusammenspiel der oben genannten Proteine aufgeführt. In den letzten Jahren bemühten sich verschiedene Forschungsgruppen um eine Erweiterung des Wissensstandes bezüglich des Vorkommens von Autoantikörpern bei Myasthenia gravis und der daraus folgenden Identifizierung von Subgruppen innerhalb des Krankheitsbildes mit spezifischen klinischen Merkmalen. Dabei wurden von Gallardo et al. (Gallardo et al. 2014) und Cortes-Vicente et al. (Cortes-Vicente et al. 2016), die zur selben Forschungsgruppe gehören, zwei Studien zu Anti-Cortactin-Autoantikörpern in Myasthenia gravis veröffentlicht. Anti-Agrin-Autoantikörper wurden von Cossin et al. (Cossins et al. 2012), Gasperi et al. (Gasperi et al. 2014), Zhang et al. (Zhang et al. 2014), Cordts et al. (Cordts et al. 2017), Rivner et al. (Rivner et al. 2020) und Wang et al. (Wang et al. 2021) im Serum von Myasthenie-Patient*innen nachgewiesen. Die nun in Würzburg durchgeführte Studie reiht sich in die Untersuchungen der genannten Forschungsgruppen ein und beleuchtet neben dem Vorkommen von Anti-Cortactin- und Anti-Agrin-Autoantikörpern in einer am Universitätsklinikum Würzburg rekrutierten Patientenkohorte auch Eigenschaften der detektierten Autoantikörper wie die IgG-

Subklasse und das Komplementbindungsverhalten sowie klinische Aspekte der eingeschlossenen Patient*innen (Doppler et al. 2021). Im folgenden Kapitel 4.2 wird vergleichend auf die detektierten Prävalenzen der Autoantikörper und die angewandten Methoden der verschiedenen Studien eingegangen.

4.2 Prävalenzen der Autoantikörper und angewandte Detektionsmethoden

4.2.1 Anti-Cortactin-Autoantikörper

Bei der in Würzburg durchgeführten Studie wurden in den Seren von 3 Myasthenie-Patient*innen und von 2 Kontrollpersonen Anti-Cortactin-Autoantikörper mittels ELISA detektiert. Für die Seren von Patient 2 und den beiden Kontrollpersonen konnte die Autoantikörperbindung in Bindungsversuchen an HEK-293-Zellen bestätigt werden. Diese Ergebnisse weisen nach den vorausgegangenen Studien (Gallardo et al. 2014, Cortes-Vicente et al. 2016) erneut das Vorkommen von Anti-Cortactin-Autoantikörpern in einem Anteil von Patient*innen mit Myasthenia gravis nach. Die Prävalenz der Anti-Cortactin-Autoantikörper stellt sich in der hiesigen Studie mit 4,3% (3 von 69 Patientenseren) niedriger dar als in den anderen Studien, die Prävalenzen von 11,9% (23 von 194 Patientenseren) (Gallardo et al. 2014) und 11,7% (28 von 239 Patientenseren) (Cortes-Vicente et al. 2016) zeigten. In den Studien wurde methodisch ebenfalls ein ELISA als Suchtest verwendet. Die Bestätigung erfolgte mittels Western Blot. Mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Prävalenzen sind die insgesamt geringere Anzahl von rekrutierten Patient*innen, unterschiedlich festgesetzte Schwellenwerte im ELISA und die niedrigere Sensitivität von Zell-basierten Nachweisverfahren, gerade bei Seren mit geringem Autoantikörpertiter. Anti-Cortactin-Autoantikörper wurden in der hiesigen Studie bei seronegativen Myasthenie-Patient*innen im Vergleich zu den vorausgegangenen Studien nicht deutlich häufiger nachgewiesen. Dies ist wahrscheinlich der insgesamt geringen Anzahl von Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren geschuldet, die eine tatsächliche Vergleichbarkeit innerhalb der Untergruppen erschwert. Eine Besonderheit der hiesigen Studie ist, dass erstmals Anti-Cortactin-Autoantikörper im Serum eines Anti-MuSK-Autoantikörper positiven Patienten nachgewiesen wurden. Für die Übersichtlichkeit folgt eine tabellarische Gegenüberstellung der in den drei Studien nachgewiesenen Prävalenzen von Anti-Cortactin-Autoantikörpern in den

verschiedenen Gruppen der Myasthenie-Patient*innen basierend auf bereits nachgewiesenen Autoantikörpern.

Tabelle 14 Vergleich der Prävalenzen von Anti-Cortactin-Autoantikörpern im Serum von Patient*innen mit Myasthenia gravis (MG) in vorliegenden Studien

Studie	Prävalenz gesamt	Prävalenz bei seronegativer MG	Prävalenz bei Anti-AChR- positiver MG	Prävalenz bei Anti-MuSK- positiver MG
Gallardo et al. 2014	11,9% (23 von 194 Seren)	19,7% (18 von 91 Seren)	7,2% (5 von 69 Seren)	0% (0 von 34 Seren)
Cortes-Vicente et al. 2016	11,7% (28 von 239 Seren)	23,7% (9 von 38 Seren)	9,5% (19 von 201 Seren)	0% (0 von 11 Seren)
Hiesige Studie Doppler et al. 2021	4,3% (3 von 69 Seren)	6,7% (1 von 15 Seren)	2% (1 von 51 Seren)	33,3% (1 von 3 Seren)

Die Ergebnisse der hiesigen Studie bekräftigen außerdem, dass Anti-Cortactin-Autoantikörper nicht Myasthenie-spezifisch sind wie auch Gallardo et. al erstmals beschrieben hatte (Gallardo et al. 2014). Dort waren 5,2% (1 von 19 Kontrollpersonen) positiv auf Anti-Cortactin-Autoantikörper getestet worden. Diese Größenordnung entspricht in etwa den 4% (2 von 50 Kontrollpersonen), die in der hiesigen Studie Anti-Cortactin-Autoantikörper aufwiesen. Wie in Kapitel 3.1.2 und Kapitel 3.1.5 beschrieben, hatten diese beiden positiven Kontrollpersonen sogar die höchsten Serumtitere und zeigten eine starke Bindung in den Zell-basierten Bestätigungstests, sodass von einer spezifischen Bindung im ELISA ausgegangen werden kann. Der Gesamt-IgG-Gehalt der beiden Seren lag unterhalb des Mittelwerts aller Kontrollseren (siehe Kapitel 3.1.6). Somit ist eine

Verfälschung der Ergebnisse aufgrund eines erhöhten Gesamt-IgG-Gehalts ausgeschlossen.

4.2.2 Anti-Agrin-Autoantikörper

In der hiesigen Studie wurden weder in den Patienten- noch in Kontrollseren Anti-Agrin-Autoantikörper detektiert. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu fünf vorausgegangenen Studien und einer nachgefolgten Veröffentlichung, die Anti-Agrin-Autoantikörper in einem Anteil von Seren von Patient*innen mit Myasthenia gravis gefunden haben (Cossins et al. 2012, Gasperi et al. 2014, Zhang et al. 2014, Cordts et al. 2017, Rivner et al. 2020, Wang et al. 2021). Die Prävalenzen der Anti-Agrin-Autoantikörper in diesen Studien werden im Folgenden tabellarisch gegenübergestellt. Die Unterschiede in den Detektionsraten sind vermutlich auf die Seltenheit von Agrin als Antigen zurückzuführen. Methodisch wurde mit ELISAs und bzw. oder Zell-basierten Nachweisverfahren gearbeitet. Dabei kann auch die unterschiedliche Festlegung von Schwellenwerten die Anzahl der als positiv klassifizierten Proben beeinflussen. In Kapitel 4.2.3 wird außerdem auf die Problematik der unspezifischen Bindungen von Seren im ELISA eingegangen. Dieser Sachverhalt erklärt einen weiteren Einflussfaktor auf die Ergebnisse und gibt ein mögliches Indiz, warum die aus Belgien zugesendeten Seren im hiesigen ELISA negativ getestet wurden (siehe Kapitel 3.3.2).

Tabelle 15 Vergleich der Prävalenzen von Anti-Agrin-Autoantikörpern im Serum von Patient*innen mit Myasthenia gravis in vorliegenden Studien

Studie	Prävalenz gesamt	Prävalenz bei seronegativer MG	Prävalenz bei Anti-AChR- positiver MG	Prävalenz bei Anti-MuSK- positiver MG
Cossins et al. 2012	15% (24 von 161 Seren)	15% (11 von 73 Seren)	(13 Seren von unbekannter Gesamtzahl)	(0 Seren von unbekannter Gesamtzahl)
Gasperi et al. 2014	9,3% (5 von 54 Seren)	0% (0 von 30 Seren)	11,1% (1 von 9 Seren)	26,7% (4 von 15 Seren)
Zhang et al. 2014	7,5% (7 von 93 Seren)	50% (2 von 4 Seren)	6% (5 von 83 Seren)	0% (0 von 6 Seren)
Cordts et al. 2017	4% (4 von 100 Seren)	2,3% (1 von 44 Seren)	5,5% (3 von 55 Seren)	0% (0 von 1 Serum)
Rivner et al. 2020	14,4% (26 von 181 Seren)	1,9% (3 von 158 Seren)	Keine Patient*innen eingeschlossen	Keine Patient*innen eingeschlossen
Wang et al. 2021	0,92% (18 von 1948 Seren)	1,8% (9 von 493 Seren)	0,6% (9 von 1396 Seren)	0% (0 von 50 Seren)

4.2.3 Serum-spezifischer Hintergrund im ELISA

Im Verlauf der ELISA Testungen für die hiesige Studie zeigte sich, dass es regelmäßig zu unspezifischen Bindungen der Seren an die Mikrotiterplatten kam. Bestimmte Seren wiesen hohe optische Dichten auf, zeigten jedoch bei wiederholter Testung auch dann

erhöhte Werte, wenn die Wells gar nicht mit dem entsprechenden Protein beschichtet waren. Daraufhin wurden alle Proben erneut getestet und für jedes Serum wurden die optischen Dichten von zwei Well-Dupletts gemessen: ein mit dem Protein beschichtetes und ein unbeschichtetes Duplett. Der Mittelwert des unbeschichteten Dupletts wurde dann von dem des beschichteten Dupletts abgezogen. Diese Vorgehensweise führt zu einem unverfälschten Ergebnis und ist in Kapitel 2.5.1 schematisch veranschaulicht. Kürzlich veröffentlichte die Forschungsgruppe Moritz et al. einen Artikel bezüglich dieser Problematik. Anhand einer Studie zur Detektion von Anti-fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)-Autoantikörpern im Serum von Patient*innen mit inflammatorischen Neuropathien beschreiben sie das Risiko von Fehldiagnosen durch unspezifische Bindungen der Seren im ELISA. Um falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse zu verhindern, schlagen sie vor, für jedes Serum den individuellen, Serum-spezifischen Hintergrund zu bestimmen und diesen dann von den ursprünglich bestimmten optischen Dichten abzuziehen. Dies entspricht genau der Vorgehensweise, die in der hiesigen Studie zur Anwendung kam. Auch wenn dies aufwändiger ist und zu einem höheren Verbrauch von Reagenzien führt, empfehlen sie nachdrücklich so zu verfahren, um die Sensitivität und Spezifität der ELISAs zu erhöhen (Moritz et al. 2019). Das Phänomen der unspezifischen Bindungen von Seren im ELISA und den darauf folgenden, möglichen Fehldiagnosen ist auch von anderen Forschungsgruppen beschrieben worden (Kenna et al. 1985, Güven et al. 2014, Elshafie et al. 2016, Terato et al. 2016). Im Rahmen einer detaillierten Analyse des Problems wurde gezeigt, dass Seren vor allem dann unspezifisch binden, wenn sie erhöhte Konzentrationen von IgG und anderen inflammatorischen Mediatoren enthalten. Dies kann gerade bei Seren von Patient*innen mit Autoimmunerkrankungen wie der Myasthenia gravis der Fall sein. Außerdem kommt es häufiger zu unspezifischen Bindungen, wenn die Seren erhöhten Temperaturen ausgesetzt waren (Güven et al. 2014). Um eine Verfälschung der hiesigen Ergebnisse auszuschließen, wurde die Gesamt-IgG-Konzentration aller Proben bestimmt (siehe Kapitel 3.1.6). Als Lösungsansätze zur Reduktion des Einflusses von unspezifischen Bindungen der Seren im ELISA werden verbesserte Blockierungslösungen bzw. Puffer (Terato et al. 2014) und eine Optimierung des Studiendesigns wie bei Moritz et al. (Moritz et al. 2019) und der hiesigen Studie vorgeschlagen.

4.3 Pathogenität der Autoantikörper

4.3.1 Beweis der pathogenetischen Bedeutung

Im Jahr 1957 legten die Postulate von Witebsky et al. eine erste Grundlage für die Etablierung der autoimmunen Ätiologie menschlicher Erkrankungen (Witebsky et al. 1957). In ihrer Erweiterung werden drei Aspekte für den Beweis der pathogenetischen Bedeutung von Autoantikörpern benannt (Rose et al. 1993): 1) Die Übertragung der Erkrankung durch passiven Transfer der Autoantikörper auf ein gesundes Individuum stellt eine direkte Evidenz dar. Auf natürlichem Wege geschieht dies bei der transplazentaren Übertragung von Autoantikörpern von einer erkrankten Schwangeren auf das ungeborene Kind. 2) Ein indirekter Nachweis der Pathogenität von Autoantikörpern ist mittels experimenteller Tiermodelle möglich, in denen die Erkrankung beispielsweise durch Immunisierung mit dem Antigen oder direkte Übertragung von Patientenantikörpern in den Tieren reproduziert werden kann. 3) Zuletzt gibt es noch unterstützende Indizien, die eine autoimmune Genese nahelegen wie unter anderem ein positives Ansprechen auf immunsuppressive Therapien.

Ob Anti-Cortactin- und Anti-Agrin-Autoantikörper bei Myasthenia gravis von pathogenetischer Bedeutung sind oder nur als Epiphänomene auftreten, wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

4.3.2 Anti-Cortactin-Autoantikörper

Gegen eine pathogenetische Relevanz von Anti-Cortactin-Autoantikörpern bei Myasthenia gravis spricht, dass sie nicht krankheitsspezifisch sind. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, fanden sie sich sowohl in der Studie von Gallardo et al. (Gallardo et al. 2014) als auch in der hiesigen Studie bei 4-5% der Kontrollpersonen. Außerdem zeigte eine weitere Studie, dass Anti-Cortactin-Autoantikörper bei verschiedenen autoimmunen Myositisformen zu finden sind. In besagter Studie wurden sie bei 7 von 34 der Polymyositis-Patient*innen (20%), bei 9 von 117 der Dermatomyositis-Patient*innen (7,6%) und bei 2 von 7 Patient*innen mit immunvermittelter nekrotisierender Myopathie (26%) detektiert. Ebenfalls positiv waren 2 Patient*innen mit Sklerodermie und 1 Patient*in mit systemischem Lupus erythematodes (Labrador-Horrillo et al. 2014). Auch in der Studie von Gallardo et al. wiesen 5 von 40 Patient*innen (12,5%) mit anderen Autoimmunerkrankungen Anti-Cortactin-Autoantikörper auf. Darunter waren 2

Patient*innen mit chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie, 1 Patient*in mit systemischem Lupus erythematodes, 1 Patient*in mit rheumatoider Arthritis und 1 Patient*in mit Sklerodermie (Gallardo et al. 2014). Die genannten Erkrankungen entstehen durch jeweils unterschiedliche Mechanismen, was eine pathogenetisch bedeutende Rolle von Anti-Cortactin-Autoantikörpern unwahrscheinlich macht.

Bei Cortactin handelt es sich um ein intrazelluläres Protein. Autoantikörper können allerdings nur dann pathogenetisch wirksam sein, wenn das Zielantigen für sie zugänglich ist (Genth 1999). Möglicherweise könnte Cortactin durch strukturelle Schädigung an der muskulären Endplatte mit dem Serum in Kontakt kommen, woraufhin die Autoantikörperbildung induziert würde. Dies wäre nicht nur bei Patient*innen mit Myasthenia gravis denkbar, sondern auch bei gesunden Personen, beispielsweise im Rahmen von sportlicher Betätigung. Infektionen sind weitere potentielle Auslöser von autoimmunen Reaktionen. Es ist bekannt, dass Viruserkrankungen den Transport von intrazellulären Proteinen an die Zelloberfläche begünstigen können (Genth 1999). Bei 2 der positiv auf Anti-Cortactin-Autoantikörper getesteten Patient*innen in der hiesigen Studie sind milde Infektionen vor der Serumentnahme dokumentiert worden. Allerdings beinhaltet die Patientenkohorte auch einige Patient*innen, die im Rahmen eines stationären Aufenthalts aufgrund einer myasthenen Krise rekrutiert wurden. Im Serum dieser Patient*innen wurden keine Anti-Cortactin-Autoantikörper detektiert, obwohl myasthene Krisen mit einer verstärkten Immunreaktion einhergehen.

In Kapitel 3.1.7 wurde beschrieben, dass alle 3 Patient*innen mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern im Studienverlauf eine zweite Serumprobe abgaben, die in allen 3 Fällen ein negatives Anti-Cortactin-ELISA Ergebnis erbrachte. Somit scheinen Anti-Cortactin-Autoantikörper vorübergehende Phänomene zu sein. In Kapitel 3.2 sind die klinischen Charakteristika dieser Patient*innen zum ersten und zum zweiten Serumentnahmezeitpunkt gegenübergestellt. Dabei fällt auf, dass Patient 1 und Patient 3 zum Zeitpunkt der Entnahme des Verlaufsserums im Gegensatz zur ersten Serumentnahme eine immunsuppressive Therapie aus Azathioprin und Prednisolon einnahmen und symptomfrei waren. Möglicherweise führte die Immunsuppression zu einer Abnahme der Antikörpertiter. Allerdings wäre dies kein plausibler Grund für ein vollständiges

Verschwanden von Anti-Cortactin-Autoantikörpern, während Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper weiterhin nachweisbar sind (Patient 3).

Es konnten jedoch durchaus einige funktionelle Eigenschaften der detektierten Anti-Cortactin-Autoantikörper nachgewiesen werden. So zeigten die 3 der 5 positiven Seren mit den höchsten Autoantikörper-Titern auch eine eindeutige Komplementbindung im ELISA-basierten Komplementbindungsassay mit C1q (siehe Kapitel 3.1.4). Dies bestätigt die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung. Bei der Bestimmung der IgG-Subklassen sind bei besagten 3 Seren die Subklassen IgG1 oder IgG3 festgestellt worden (siehe Kapitel 3.1.3), welche den prädominanten Subklassen der Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern entsprechen (Rødgaard et al. 1987). Antikörper dieser Subklassen sind, wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, starke Aktivatoren des Komplementsystems und können dadurch zu einer inflammatorischen Reaktion führen. Da in den vorausgegangenen Studien zur Detektion von Anti-Cortactin-Autoantikörpern keine Komplementbindung untersucht und keine Subklassenbestimmung durchgeführt wurde, ist hierbei kein Vergleich mit bereits vorhandener Literatur möglich.

Es bleibt folglich ungeklärt, inwieweit Anti-Cortactin-Autoantikörper pathogenetisch relevant sind. Dieser Sachverhalt könnte in weiteren Studien untersucht werden.

4.3.3 Anti-Agrin-Autoantikörper

Im Gegensatz zu Anti-Cortactin-Autoantikörpern wurde bei Anti-Agrin-Autoantikörpern ein pathogenetischer Effekt in einem experimentellen Tiermodell nachgewiesen. Dazu wurden Mäuse mit den zwei Isoformen von Agrin, neuronalem N-Agrin und muskulärem M-Agrin, aktiv immunisiert. Es wurden dann die Muskelkraft der Tiere, die Morphologie ihrer neuromuskulären Endplatten und die neuromuskuläre Übertragung evaluiert. Ausschließlich die Mäuse, die mit dem neuronalen N-Agrin immunisiert wurden, zeigten Myasthenie-assoziierte Symptome wie Muskelschwäche und geschädigte neuromuskuläre Endplatten. Die Bildung von Anti-Agrin-Autoantikörpern gegen beide Isoformen wurde durch eine Anti-Agrin-ELISA Testung der Mäuseseren bestätigt. Die Ergebnisse dieser Studie weisen folglich eine pathogenetische Rolle von Anti-Agrin-Autoantikörpern bei Myasthenia gravis nach, die sich spezifisch für neuronales Agrin zeigte (Yan et al. 2018).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden die Effekte des Transfers von aufgereinigten Autoantikörper einer Myasthenie-Patientin auf Mäuse beschrieben. Die Patientin wies sowohl Anti-LRP4- als auch Anti-Agrin-Autoantikörper auf. Die Mäuse zeigten nach der Injektion Symptome wie Gewichtsverlust und Muskelschwäche und Myasthenie-typische Veränderungen in der Neurophysiologie. Bei der histologischen Untersuchung waren Schäden an der neuromuskulären Endplatte nachweisbar. In der Studie wurden auch die molekularen Mechanismen hinter der Antikörperbindung weiter untersucht. Als das Ziel-Epitop der Anti-Agrin-Autoantikörper wurde die LG1/2 Domäne von Agrin identifiziert (Yu et al. 2021). Diese Domäne ist allerdings nicht an Agrins Interaktion mit LRP4 beteiligt, sodass sich die Frage stellt, ob die Anti-Agrin-Autoantikörper nur ein Epiphänomen darstellen und der pathogene Effekt ausschließlich durch die Anti-LRP4-Autoantikörper zustande kommt. Das Ziel-Epitop der Anti-LRP4-Autoantikörper, die $\beta 3$ Domäne, bindet nämlich an MuSK und spielt somit eine Rolle in der Signalkaskade, die zur Formierung von Acetylcholinrezeptoren führt. Um sichere Aussagen zur Pathogenität von Anti-Agrin-Autoantikörpern treffen zu können, müssten Autoantikörper von Patient*innen aufgereinigt werden, die ausschließlich diese Autoantikörper im Serum aufweisen. Die Frage der klinischen Relevanz von Anti-Agrin-Autoantikörpern konnte durch die vorliegende Studie nicht geklärt werden (Lisak 2021).

Im Jahr 2017 wurde eine Studie veröffentlicht, in der Anti-Agrin-Autoantikörper auch bei Patient*innen mit amyotropher Lateralsklerose (ALS) gefunden wurden. Sie wurden bei 9 von 65 ALS-Patient*innen (13,8%) detektiert. Die positiv getesteten Patient*innen hatten sowohl Symptome des ersten als auch des zweiten Motoneurons, sodass der Effekt der Autoantikörper nicht allein durch ihre Rolle an der neuromuskulären Endplatte erklärt werden kann (Rivner et al. 2017). Das Vorliegen der Studie zeigt, dass Anti-Agrin-Autoantikörper nicht spezifisch für Myasthenia gravis sind. Ihr Vorkommen bei einer anderen neurologischen Erkrankung mit gänzlich unterschiedlicher Pathogenese spricht dafür, dass Anti-Agrin-Autoantikörper als Epiphänomen bei mehreren neuromuskulären Erkrankungen auftreten.

4.4 Klinische Charakteristika von Subgruppen innerhalb der Myasthenia gravis

Seit Hoch et al. im Jahr 2001 Anti-MuSK-Autoantikörper bei Patient*innen mit Myasthenia gravis detektierte (Hoch et al. 2001), die bis dahin keinen Autoantikörper-

Nachweis hatten, wurde diese Patientengruppe bezüglich klinischer Charakteristika genauer untersucht. Es konnten einige entscheidende Unterschiede zu Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper positiver Myasthenia gravis festgestellt werden, die von diagnostischer und therapeutischer Relevanz sind. Folglich können Anti-MuSK-Autoantikörper positive Patient*innen als eigene Subgruppe innerhalb der Erkrankung gesehen werden (Gilhus et al. 2015). Die typischen klinischen Charakteristika sind folgende: Es handelt sich mehrheitlich um weibliche Erkrankte mit einem eher frühen Krankheitsbeginn. Sie weisen oftmals eine selektive faziale und bulbäre Muskelschwäche auf und es kommt häufiger zu respiratorischen Krisen. Die Extremitätenmuskulatur ist weniger schwer und inkonsistenter betroffen. In dieser Patientengruppe ist das Auftreten von ausgeprägten Muskelatrophien möglich. Anti-MuSK-Autoantikörper sind fast nie bei Patient*innen mit einer rein okulären Verlaufsform zu finden (Evoli et al. 2003, Sanders et al. 2003, Meriggioli et al. 2009). In den neurophysiologischen Untersuchungen wie der repetitiven Nervenstimulation und der Einzelfaser-Elektromyographie zeigten Anti-MuSK-Autoantikörper positive Patient*innen weniger stark abweichende Muster (Padua et al. 2006). Die Histologie des Thymus ist in dieser Patientengruppe normalerweise nicht pathologisch verändert (Lauriola et al. 2005, Leite et al. 2005), weshalb die Patient*innen auch nicht erfolgreich auf Thymektomien ansprechen (Evoli et al. 2003, Sanders et al. 2003). Ein weiterer therapeutisch relevanter Unterschied ist, dass Cholinesterasehemmer bei Anti-MuSK-Autoantikörper positiven Patient*innen weniger gut wirksam sind. Sie lösen in dieser Patientengruppe zum Teil starke Unverträglichkeiten aufgrund ihrer cholinergen Nebenwirkungen aus, haben keinen Effekt oder führen sogar zu klinischer Verschlechterung (Hatanaka et al. 2005). Dahingegen sprechen Anti-MuSK-Autoantikörper positive Patient*innen besonders in der Langzeitbehandlung sehr gut auf den monoklonalen CD20 Antikörper Rituximab an (Díaz-Manera et al. 2012).

Vor dem Hintergrund der klinischen Unterschiede zwischen den Subgruppen der Anti-MuSK-Autoantikörper- und der Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper-assoziierten Myasthenia gravis ist es bei Detektion eines neuen Autoantikörpers immer lohnenswert, die entsprechenden seropositiven Patient*innen auf gemeinsame Charakteristika zu untersuchen. In den folgenden Kapiteln wird dieser Aspekt für Anti-Cortactin- und Anti-Agrin-Autoantikörper diskutiert.

4.4.1 Anti-Cortactin-Autoantikörper positive Patient*innen

In der Studie von Gallardo et al. konnte kein einheitlicher Phänotyp der 23 Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Myasthenie-Patient*innen festgestellt werden (Gallardo et al. 2014). Die klinischen Daten der Patient*innen wurden dennoch detailliert aufgeschlüsselt, sodass sie im Folgenden mit den Daten der zweiten Studie zu Anti-Cortactin-Autoantikörpern mit 28 detektierten Patient*innen von Cortes-Vicente et al. gegenübergestellt werden können (Cortes-Vicente et al. 2016). Diese Studie kam zu dem Schluss, dass seronegative Patient*innen mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern signifikant jünger waren als Patient*innen mit Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern oder aber seronegative Patient*innen ohne Anti-Cortactin-Autoantikörper. Außerdem zeigten die Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen eine Prädominanz von okulären oder milden generalisierten Verlaufsformen ohne bulbäre Symptome. In der hiesigen Studie sind nur drei Patient*innen mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern detektiert worden. Ihre klinischen Daten sind im Kapitel 3.2 detailliert aufgeführt und werden in der folgenden tabellarischen Darstellung mit den Ergebnissen der anderen Studien verglichen. Bei einer so geringen Anzahl von detektierten Patient*innen lassen sich allerdings keine allgemeingültigen Aussagen treffen.

Tabelle 16 Vergleich der klinischen Charakteristika von Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen mit Myasthenia gravis in vorliegenden Studien

	Gallardo et al.	Cortes Vicente et al.	Hiesige Studie Doppler et al.
Detektierte Patient*innen	23	28	3
Davon mit Anti-AChR-AK	5	19	1
Davon mit Anti-MuSK-AK	0	0	1
Davon seronegativ	18	9	1
Klinisch analysierte Gruppe	Alle 23 Patient*innen	9 seronegative Patient*innen	Alle 3 Patient*innen
Geschlecht	68,18% weiblich	77,8% weiblich	66,66% weiblich
Alter	Erkrankungsbeginn vor 50. Lebensjahr: 70,58%	Durchschnittsalter bei Erkrankungsbeginn 34,9 Jahre	72 Jahre, 66 Jahre, 24 Jahre
Verlaufsform	22,22% okulär 77,78% generalisiert (davon 30,76% mit bulbärer Betonung)	66,66% okulär 33,33% milde generalisiert Form (keine Patienten mit bulbärer Betonung)	33,33% okulär 66,66% generalisiert (davon 50% mit bulbärer Betonung)
Patient*innen mit Thymom	1	0	0

Immunsuppressive Therapie	76,48%	55,6%	33,33%
----------------------------------	--------	-------	--------

4.4.2 Anti-Agrin-Autoantikörper positive Patient*innen

Von den sechs vorliegenden Studien zur Detektion von Anti-Agrin-Autoantikörpern bei Myasthenia gravis geben nur vier weiterführende Informationen zu den klinischen Daten der positiven Patient*innen. Die Studien von Cossins et al. (Cossins et al. 2012) und Zhang et al. (Zhang et al. 2014) enthalten diesbezüglich keine Angaben. Da in der hiesigen Studie keine Anti-Agrin-Autoantikörper detektiert wurden, können ebenfalls keine Daten verglichen werden. Es werden folglich die Ergebnisse der Studien von Gasperi et al., Cordts et al., Rivner et al. und Wang et al. diskutiert. In der Studie von Gasperi et al. wurden Anti-Agrin-Autoantikörper in den Seren von 5 Myasthenie-Patient*innen detektiert. In den klinischen Daten dieser 5 Patient*innen konnten keine wesentlichen Gemeinsamkeiten festgestellt werden. Die Krankheitsschwere war jeweils sehr unterschiedlich. Es wurde jedoch erhoben, dass alle 5 Patient*innen mit Doppelbildern symptomatisch gewesen waren und auch eine Beteiligung der Gesichts-, Nacken- und bulbären Muskulatur vorlag (Gasperi et al. 2014). In der Studie von Cordts et al. wiesen 4 Seren von Myasthenie-Patient*innen Anti-Agrin-Autoantikörper auf. Sie waren mehrheitlich weiblich und zeigten einen Krankheitsbeginn vor dem 50. Lebensjahr. Die Erkrankungsschwere reichte von milden Verläufen bis zu schwerer Beeinträchtigung. Das Therapieansprechen war variabel (Cordts et al. 2017). Die jeweils geringe Anzahl von Anti-Agrin-Autoantikörper positiven Patient*innen lässt jedoch keinen angemessenen Vergleich der Patientengruppen zu, aus dem sich verlässliche Schlüsse ziehen ließen. In der Studie von Rivner et al. wurden 27 Patient*innen detektiert, die entweder Anti-Agrin- oder Anti-LRP4-Autoantikörper hatten. Davon hatten 23 Patient*innen beide Antikörper, 3 Patient*innen ausschließlich Anti-Agrin- und 1 Patient*in ausschließlich Anti-LRP4-Autoantikörper. Die aus 27 Patient*innen bestehende Gruppe wurde mit den 154 seronegativen Patient*innen verglichen, bei denen keinerlei Autoantikörper nachgewiesen wurden. Dies wurde so entschieden, da jeweils nur eine geringe Anzahl von Patient*innen ausschließlich einen der beiden Antikörper aufwies. Die Gruppe mit Anti-Agrin- oder Anti-LRP4-Autoantikörpern zeigte signifikant häufiger generalisierte Verläufe, die auch klinisch schwerwiegender waren. Die

Patient*innen zeigten mehrheitlich ein gutes Ansprechen auf die Standardtherapien. Sie waren zu 59% weiblich und der durchschnittliche Erkrankungsbeginn lag bei 44 Jahren. Im Vergleich zu den seronegativen Patient*innen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich Geschlechterverteilung und Alter (Rivner et al. 2020). In der Studie von Wang et al. wurden Anti-Agrin-Autoantikörper in den Seren von 18 Myasthenie-Patient*innen detektiert. Davon wiesen 9 Patient*innen ausschließlich Anti-Agrin-Autoantikörper auf und die anderen 9 waren positiv für Anti-Agrin- und Anti-Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper. Die klinischen Daten zeigten, dass es sich bei den Anti-Agrin-Autoantikörper positiven Patient*innen mehrheitlich um Männer über 40 Jahren handelte, die okuläre und bulbäre Symptome hatten sowie eine Schwäche der Extremitätenmuskulatur. Auch wenn die Symptome insgesamt schwerwiegender waren, ließen sie sich mit einer Therapie mit Pyridostigmin und Prednisolon gut behandeln (Wang et al. 2021).

4.5 Ausblick

In dieser Studie wurden das Vorkommen und die Eigenschaften von Autoantikörpern gegen die Zielantigene Cortactin und Agrin im Serum von Patient*innen mit Myasthenia gravis untersucht. Wie in zwei vorausgegangenen Studien (Gallardo et al. 2014, Cortes-Vicente et al. 2016) konnten Anti-Cortactin-Autoantikörper in einem kleinen Anteil von Myasthenie-Patient*innen, aber auch Kontrollpersonen in dieser Studie nachgewiesen werden. Ihre pathogenetische und diagnostische Rolle ist aber nach wie vor nicht eindeutig geklärt. Es bedarf größerer Patientenkohorten, die folglich eine größere Anzahl von positiven Patient*innen aufweisen, um aussagekräftigere Untersuchungen durchführen zu können. Eine Herausforderung in dieser Studie war die Spezifität der Detektionsmethoden, die beim ELISA durch die Subtraktion des Serum-spezifischen Hintergrundsignals verbessert werden konnte. Dies ist auch für zukünftige Studien empfehlenswert. Als weitere Methode könnten Bindungsversuche an Muskelschnitten und somit motorischen Endplatten von Mäusen durchgeführt werden. Die Charakterisierung der Autoantikörper durch Untersuchung der IgG-Subklasse und des Komplementbindungsverhaltens ist sinnvoll, da sie Auskunft über die funktionellen Eigenschaften und somit das pathogene Potential der Autoantikörper gibt. Das erneute Testen der Patient*innen im Verlauf der Studie lieferte ebenfalls einen Hinweis für die

Frage, ob Anti-Cortactin-Autoantikörper eine pathogene Rolle haben oder temporär vorkommende Epiphänomene sind. Anti-Agrin-Autoantikörper sind in der hiesigen Studie nicht detektiert worden. Dies reflektiert ihr seltenes Vorkommen bei Myasthenia gravis. Auch hier bedarf es zukünftig größerer Patientenkohorten, um die Detektionswahrscheinlichkeit zu erhöhen.

Die weitere Erforschung der heterogenen pathogenen Prozesse bei der Myasthenia gravis ist besonders für die Patientengruppe von Bedeutung, bei der zuvor keiner der bereits bekannten, pathogenetisch ursächlichen Anti-Acetylcholinrezeptor-, Anti-MuSK- oder Anti-LRP4-Autoantikörper nachgewiesen werden konnte. Über eine Erhebung der klinischen Daten einer großen Gruppe dieser Patient*innen ließen sich diagnostische Parameter und Therapieansprechen analysieren, um Hypothesen über die pathogenetischen Mechanismen aufzustellen. Mittels experimenteller Tiermodelle könnten die Untersuchungen auf eine nächste Stufe gehoben und die Auswirkungen von Anti-Cortactin-Autoantikörpern in vivo beobachtet werden. Dazu könnte man entweder Cortactin injizieren, um eine Autoantikörperbildung auszulösen oder Anti-Cortactin-Autoantikörper aus Patientenserum extrahieren und passiv transferieren.

Ohne Autoantikörpernachweis ist die Diagnostik der Myasthenia gravis deutlich erschwert. Auch für das therapeutische Vorgehen wäre ein eindeutiger Biomarker für autoimmune Prozesse von großer Bedeutung, da dem Einsatz von Immunsuppressiva und immunmodulatorischen Medikamenten somit eine wissenschaftliche Grundlage gelegt wäre. Aus diesen Gründen stellt die Suche und Charakterisierung weiterer Autoantikörper zur Aufklärung der pathogenetischen Prozesse der Myasthenia gravis für die Zukunft eine so wichtige Aufgabe dar.

5 Zusammenfassung

Myasthenia gravis ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Störung der Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte zu einer Schwäche der Muskulatur führt. Mit dem Nachweis von Autoantikörpern, die sich gegen verschiedene Proteine an der postsynaptischen Membran richten, namentlich Acetylcholinrezeptoren, MuSK und LRP4, konnte in den vergangenen Jahrzehnten ein großer Teil der Pathophysiologie der Myasthenia gravis erklärt werden. Es verbleiben aber weiterhin 3-5% der Myasthenie-Patient*innen mit einem generalisierten Verlauf und bis zu 50% der Patient*innen mit einem okulären Verlauf, bei denen keine Autoantikörper zu detektieren sind. Ohne Autoantikörpernachweis wird die Diagnostik der Erkrankung deutlich erschwert. Die ebenfalls postsynaptisch lokalisierten Proteine Cortactin und Agrin sind kürzlich als potentielle Zielantigene in den Fokus gerückt, da sie an einer Signalkaskade zur Aggregation von Acetylcholinrezeptoren beteiligt sind. Das Ziel dieser Studie war es, eine an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg rekrutierte Kohorte von 135 Myasthenie-Patient*innen auf das Vorkommen von Autoantikörpern gegen Cortactin und Agrin zu untersuchen. In vorausgegangenen Studien konnten diese jeweils in einem kleinen Anteil von Myasthenie-Patient*innen nachgewiesen werden. Mittels ELISA wurden die hiesigen 69 Patientenseren, 50 Kontrollseren und 82 Plasmapherese-Proben auf die jeweiligen Autoantikörper untersucht. Dabei fanden sich Anti-Cortactin-Autoantikörper in 3 Seren von Myasthenie-Patient*innen und in 2 Seren von Kontrollpersonen. Die Spezifität der Autoantikörperbindung konnte für die beiden Kontrollseren und das Patientenserum 2 an Cortactin-transfizierten HEK-293-Zellen bestätigt werden. Es erfolgte eine Charakterisierung der detektierten Autoantikörper bezüglich des Titers, der IgG-Subklasse und der Fähigkeit zur Komplementaktivierung. Es konnte kein gemeinsamer klinischer Phänotyp der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen festgestellt werden. Die pathogenetische und diagnostische Rolle von Anti-Cortactin-Autoantikörpern bleibt weiterhin ungeklärt. Für verlässliche Aussagen bedarf es einer größeren Anzahl von positiven Patient*innen. Weder mittels ELISA noch mittels Bindungsversuchen an Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen wurden Autoantikörper gegen Agrin in den Patienten- oder Kontrollseren nachgewiesen. Dieses Ergebnis reflektiert ihr seltenes Vorkommen bei Myasthenia gravis.

6 Literaturverzeichnis

- Andersen, J. B., A. Engeland, J. F. Owe and N. E. Gilhus (2010). "Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort." Eur J Neurol **17**(12): 1445-1450.
- Barth, D., M. Nabavi Nouri, E. Ng, P. Nwe and V. Bril (2011). "Comparison of IVIg and PLEX in patients with myasthenia gravis." Neurology **76**(23): 2017-2023.
- Besinger, U. A., K. V. Toyka, M. Hömberg, K. Heininger, R. Hohlfeld and A. Fateh-Moghadam (1983). "Myasthenia gravis: long-term correlation of binding and bungarotoxin blocking antibodies against acetylcholine receptors with changes in disease severity." Neurology **33**(10): 1316-1321.
- Campanelli, J. T., W. Hoch, F. Rupp, T. Kreiner and R. H. Scheller (1991). "Agrin mediates cell contact-induced acetylcholine receptor clustering." Cell **67**(5): 909-916.
- Carr, A. S., C. R. Cardwell, P. O. McCarron and J. McConville (2010). "A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis." BMC Neurol **10**: 46.
- Cole, G. J. and W. Halfter (1996). "Agrin: an extracellular matrix heparan sulfate proteoglycan involved in cell interactions and synaptogenesis." Perspect Dev Neurobiol **3**(4): 359-371.
- Cole, R. N., N. Ghazanfari, S. T. Ngo, O. L. Gervásio, S. W. Reddel and W. D. Phillips (2010). "Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice." J Physiol **588**(Pt 17): 3217-3229.
- Cordts, I., N. Bodart, K. Hartmann, K. Karagiorgou, J. S. Tzartos, L. Mei, J. Reimann, P. Van Damme, M. H. Rivner, A. Vigneron, J. Weis, J. B. Schulz, S. J. Tzartos and K. G. Claeys (2017). "Screening for lipoprotein receptor-related protein 4-, agrin-, and titin-antibodies and exploring the autoimmune spectrum in myasthenia gravis." J Neurol **264**(6): 1193-1203.
- Cortes-Vicente, E., E. Gallardo, M. A. Martinez, J. Diaz-Manera, L. Querol, R. Rojas-Garcia and I. Illa (2016). "Clinical Characteristics of Patients With Double-Seronegative Myasthenia Gravis and Antibodies to Cortactin." JAMA Neurol **73**(9): 1099-1104.
- Cossins, J., K. Belaya, K. Zoltowska, I. Koneczny, S. Maxwell, L. Jacobson, M. I. Leite, P. Waters, A. Vincent and D. Beeson (2012). "The search for new antigenic targets in myasthenia gravis." Ann N Y Acad Sci **1275**: 123-128.
- Daha, N. A., N. K. Banda, A. Roos, F. J. Beurskens, J. M. Bakker, M. R. Daha and L. A. Trouw (2011). "Complement activation by (auto-) antibodies." Mol Immunol **48**(14): 1656-1665.

- Dai, Z., X. Luo, H. Xie and H. B. Peng (2000). "The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters." J Cell Biol **150**(6): 1321-1334.
- Daly, R. J. (2004). "Cortactin signalling and dynamic actin networks." Biochem J **382**(Pt 1): 13-25.
- Daniels, M. P. (2012). "The role of agrin in synaptic development, plasticity and signaling in the central nervous system." Neurochem Int **61**(6): 848-853.
- De Baets, M. H., J. Verschuuren, M. R. Daha and P. J. van Breda Vriesman (1988). "Effects of the rate of acetylcholine receptor synthesis on the severity of experimental autoimmune myasthenia gravis." Immunol Res **7**(3): 200-211.
- Díaz-Manera, J., E. Martínez-Hernández, L. Querol, R. Klooster, R. Rojas-García, X. Suárez-Calvet, J. L. Muñoz-Blanco, C. Mazia, K. R. Straasheijm, E. Gallardo, C. Juárez, J. J. Verschuuren and I. Illa (2012). "Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia." Neurology **78**(3): 189-193.
- Doppler, K., A. Hemprich, A. Haarmann, I. Brecht, M. Franke, S. Kröger, C. Villmann and C. Sommer (2021). "Autoantibodies to cortactin and agrin in sera of patients with myasthenia gravis." J Neuroimmunol **356**: 577588.
- Elshafie, A. I., M. Mullazehi and J. Rönnelid (2016). "General false positive ELISA reactions in visceral leishmaniasis. Implications for the use of enzyme immunoassay analyses in tropical Africa." J Immunol Methods **431**: 66-71.
- Engel, A. G., E. H. Lambert and F. M. Howard (1977). "Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations." Mayo Clin Proc **52**(5): 267-280.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-874.
- Evoli, A., P. A. Tonali, L. Padua, M. L. Monaco, F. Scuderi, A. P. Batocchi, M. Marino and E. Bartocioni (2003). "Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis." Brain **126**(Pt 10): 2304-2311.
- Gallardo, E., E. Martinez-Hernandez, M. J. Titulaer, M. G. Huijbers, M. A. Martinez, A. Ramos, L. Querol, J. Diaz-Manera, R. Rojas-Garcia, C. R. Hayworth, J. J. Verschuuren, R. Balice-Gordon, J. Dalmau and I. Illa (2014). "Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis." Autoimmun Rev **13**(10): 1003-1007.
- Gasperi, C., A. Melms, B. Schoser, Y. Zhang, J. Meltoranta, V. Risson, L. Schaeffer, B. Schalke and S. Kroger (2014). "Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis." Neurology **82**(22): 1976-1983.
- Gautam, M., P. G. Noakes, L. Moscoso, F. Rupp, R. H. Scheller, J. P. Merlie and J. R. Sanes (1996). "Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice." Cell **85**(4): 525-535.

- Genth, E. (1999). "Pathogenetische Bedeutung von Autoantikörpern." Der Internist **40**(9): 914-921.
- Gesemann, M., A. Brancaccio, B. Schumacher and M. A. Ruegg (1998). "Agrin is a high-affinity binding protein of dystroglycan in non-muscle tissue." J Biol Chem **273**(1): 600-605.
- Gilhus, N. E. (2011). "Neuromuscular disease: acute treatment for myasthenia gravis." Nat Rev Neurol **7**(3): 132-134.
- Gilhus, N. E. (2016). "Myasthenia Gravis." N Engl J Med **375**(26): 2570-2581.
- Gilhus, N. E. and J. J. Verschuuren (2015). "Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies." Lancet Neurol **14**(10): 1023-1036.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-467.
- Grob, D., N. Brunner, T. Namba and M. Pagala (2008). "Lifetime course of myasthenia gravis." Muscle Nerve **37**(2): 141-149.
- Güven, E., K. Duus, M. C. Lydolph, C. S. Jørgensen, I. Laursen and G. Houen (2014). "Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers." J Immunol Methods **403**(1-2): 26-36.
- Hatanaka, Y., S. Hemmi, M. B. Morgan, M. L. Scheufele, G. C. Claussen, G. I. Wolfe and S. J. Oh (2005). "Nonresponsiveness to anticholinesterase agents in patients with MuSK-antibody-positive MG." Neurology **65**(9): 1508-1509.
- Higuchi, O., J. Hamuro, M. Motomura and Y. Yamanashi (2011). "Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis." Ann Neurol **69**(2): 418-422.
- Hoch, W., J. McConville, S. Helms, J. Newsom-Davis, A. Melms and A. Vincent (2001). "Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies." Nat Med **7**(3): 365-368.
- Hoedemaekers, A., Y. Graus, P. van Breda Vriesman and M. de Baets (1997). "Age- and sex-related resistance to chronic experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) in Brown Norway rats." Clin Exp Immunol **107**(1): 189-197.
- Howard, J. F., Jr. (2018). "Myasthenia gravis: the role of complement at the neuromuscular junction." Ann N Y Acad Sci **1412**(1): 113-128.
- Howard, J. F., Jr., R. J. Barohn, G. R. Cutter, M. Freimer, V. C. Juel, T. Mozaffar, M. L. Mellion, M. G. Benatar, M. E. Farrugia, J. J. Wang, S. S. Malhotra and J. T. Kissel (2013).

"A randomized, double-blind, placebo-controlled phase II study of eculizumab in patients with refractory generalized myasthenia gravis." Muscle Nerve **48**(1): 76-84.

Howard, J. F., Jr., K. Utsugisawa, M. Benatar, H. Murai, R. J. Barohn, I. Illa, S. Jacob, J. Vissing, T. M. Burns, J. T. Kissel, S. Muppidi, R. J. Nowak, F. O'Brien, J. J. Wang and R. Mantegazza (2017). "Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study." Lancet Neurol **16**(12): 976-986.

Huijbers, M. G., A. F. Lipka, J. J. Plomp, E. H. Niks, S. M. van der Maarel and J. J. Verschuuren (2014). "Pathogenic immune mechanisms at the neuromuscular synapse: the role of specific antibody-binding epitopes in myasthenia gravis." J Intern Med **275**(1): 12-26.

Illa, I., E. Cortés-Vicente, M. Martínez and E. Gallardo (2018). "Diagnostic utility of cortactin antibodies in myasthenia gravis." Ann N Y Acad Sci **1412**(1): 90-94.

Jordan, B., J. Kellner, K. Jordan, M. Bähre, C. Behrmann and S. Zierz (2016). "Thymic pathologies in myasthenia gravis: a preoperative assessment of CAT scan and nuclear based imaging." J Neurol **263**(4): 641-648.

Kalb, B., G. Matell, R. Pirskanen and M. Lambe (2002). "Epidemiology of myasthenia gravis: a population-based study in Stockholm, Sweden." Neuroepidemiology **21**(5): 221-225.

Kawakami, Y., M. Ito, M. Hirayama, K. Sahashi, B. Ohkawara, A. Masuda, H. Nishida, N. Mabuchi, A. G. Engel and K. Ohno (2011). "Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK." Neurology **77**(20): 1819-1826.

Kenna, J. G., G. N. Major and R. S. Williams (1985). "Methods for reducing non-specific antibody binding in enzyme-linked immunosorbent assays." J Immunol Methods **85**(2): 409-419.

Kerty, E., A. Elsais, Z. Argov, A. Evoli and N. E. Gilhus (2014). "EFNS/ENS Guidelines for the treatment of ocular myasthenia." Eur J Neurol **21**(5): 687-693.

Kim, N., A. L. Stiegler, T. O. Cameron, P. T. Hallock, A. M. Gomez, J. H. Huang, S. R. Hubbard, M. L. Dustin and S. J. Burden (2008). "Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK." Cell **135**(2): 334-342.

Klooster, R., J. J. Plomp, M. G. Huijbers, E. H. Niks, K. R. Straasheijm, F. J. Detmers, P. W. Hermans, K. Sleijpen, A. Verrips, M. Losen, P. Martinez-Martinez, M. H. De Baets, S. M. van der Maarel and J. J. Verschuuren (2012). "Muscle-specific kinase myasthenia gravis IgG4 autoantibodies cause severe neuromuscular junction dysfunction in mice." Brain **135**(Pt 4): 1081-1101.

Labrador-Horrillo, M., M. A. Martinez, A. Selva-O'Callaghan, E. Trallero-Araguas, J. M. Grau-Junyent, M. Vilardell-Tarres and C. Juarez (2014). "Identification of a novel

myositis-associated antibody directed against cortactin." Autoimmunity reviews **13**(10): 1008-1012.

Lauriola, L., F. Ranelletti, N. Maggiano, M. Guerriero, C. Punzi, F. Marsili, E. Bartoccioni and A. Evoli (2005). "Thymus changes in anti-MuSK-positive and -negative myasthenia gravis." Neurology **64**(3): 536-538.

Leite, M. I., P. Ströbel, M. Jones, K. Micklem, R. Moritz, R. Gold, E. H. Niks, S. Berrih-Aknin, F. Scaravilli, A. Canelhas, A. Marx, J. Newsom-Davis, N. Willcox and A. Vincent (2005). "Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG." Ann Neurol **57**(3): 444-448.

Lindstrom, J. M., M. E. Seybold, V. A. Lennon, S. Whittingham and D. D. Duane (1976). "Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value." Neurology **26**(11): 1054-1059.

Lisak, R. P. (2021). "Antibodies to LRP4 and Agrin Are Pathogenic in Myasthenia Gravis: At the Junction Where It Happens." Neurology **97**(10): 463-464.

Madhavan, R., Z. L. Gong, J. J. Ma, A. W. Chan and H. B. Peng (2009). "The function of cortactin in the clustering of acetylcholine receptors at the vertebrate neuromuscular junction." PLoS One **4**(12): e8478.

Marx, A., F. Pfister, B. Schalke, G. Saruhan-Direskeneli, A. Melms and P. Ströbel (2013). "The different roles of the thymus in the pathogenesis of the various myasthenia gravis subtypes." Autoimmun Rev **12**(9): 875-884.

McGrogan, A., S. Sneddon and C. S. de Vries (2010). "The incidence of myasthenia gravis: a systematic literature review." Neuroepidemiology **34**(3): 171-183.

Meriggioli, M. N. and D. B. Sanders (2009). "Autoimmune myasthenia gravis: emerging clinical and biological heterogeneity." Lancet Neurol **8**(5): 475-490.

Moritz, C. P., Y. Tholance, F. Lassablière, J. P. Camdessanché and J. C. Antoine (2019). "Reducing the risk of misdiagnosis of indirect ELISA by normalizing serum-specific background noise: The example of detecting anti-FGFR3 autoantibodies." J Immunol Methods **466**: 52-56.

Morsch, M., S. W. Reddel, N. Ghazanfari, K. V. Toyka and W. D. Phillips (2013). "Pyridostigmine but not 3,4-diaminopyridine exacerbates ACh receptor loss and myasthenia induced in mice by muscle-specific kinase autoantibody." J Physiol **591**(10): 2747-2762.

Oda, K., S. Korenaga and Y. Ito (1981). "Myasthenia gravis: passive transfer to mice of antibody to human and mouse acetylcholine receptor." Neurology **31**(3): 282-287.

Oh, S. J., D. E. Kim, R. Kuruoglu, R. J. Bradley and D. Dwyer (1992). "Diagnostic sensitivity of the laboratory tests in myasthenia gravis." Muscle Nerve **15**(6): 720-724.

- Padua, L., P. Tonali, I. Aprile, P. Caliandro, E. Bartoccioni and A. Evoli (2006). "Seronegative myasthenia gravis: comparison of neurophysiological picture in MuSK+ and MuSK- patients." Eur J Neurol **13**(3): 273-276.
- Palace, J., J. Newsom-Davis and B. Lecky (1998). "A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Study Group." Neurology **50**(6): 1778-1783.
- Pascuzzi, R. M., H. B. Coslett and T. R. Johns (1984). "Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients." Ann Neurol **15**(3): 291-298.
- Peng, H. B., H. Xie and Z. Dai (1997). "Association of cortactin with developing neuromuscular specializations." J Neurocytol **26**(10): 637-650.
- Perrin, B. J., K. J. Amann and A. Huttenlocher (2006). "Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration." Mol Biol Cell **17**(1): 239-250.
- Pevzner, A., B. Schoser, K. Peters, N. C. Cosma, A. Karakatsani, B. Schalke, A. Melms and S. Kröger (2012). "Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis." J Neurol **259**(3): 427-435.
- Phillips, L. H. (2004). "The epidemiology of myasthenia gravis." Semin Neurol **24**(1): 17-20.
- Querol, L. and I. Illa (2013). "Myasthenia gravis and the neuromuscular junction." Curr Opin Neurol **26**(5): 459-465.
- Reddy, A. R. and O. C. Backhouse (2007). "'Ice-on-eyes", a simple test for myasthenia gravis presenting with ocular symptoms." Pract Neurol **7**(2): 109-111.
- Richman, D. P., K. Nishi, S. W. Morell, J. M. Chang, M. J. Ferns, R. L. Wollmann, R. A. Maselli, J. Schnier and M. A. Agius (2012). "Acute severe animal model of anti-muscle-specific kinase myasthenia: combined postsynaptic and presynaptic changes." Arch Neurol **69**(4): 453-460.
- Rivner, M. H., S. Liu, B. Quarles, B. Fleenor, C. Shen, J. Pan and L. Mei (2017). "Agrin and low-density lipoprotein-related receptor protein 4 antibodies in amyotrophic lateral sclerosis patients." Muscle Nerve **55**(3): 430-432.
- Rivner, M. H., B. M. Quarles, J. X. Pan, Z. Yu, J. F. Howard, A. Corse, M. M. Dimachkie, C. Jackson, T. Vu, G. Small, R. P. Lisak, J. Belsh, I. Lee, R. J. Nowak, V. Baute, S. Scelsa, J. A. Fernandes, Z. Simmons, A. Swenson, R. Barohn, R. B. Sanka, C. Gooch, E. Ubogu, J. Caress, M. Pasnoor, H. Xu and L. Mei (2020). "The Clinical Features of LRP4/Agrin Antibody Positive Myasthenia Gravis: A Multi-center Study." Muscle Nerve.
- Rødgaard, A., F. C. Nielsen, R. Djurup, F. Somnier and S. Gammeltoft (1987). "Acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: predominance of IgG subclasses 1 and 3." Clin Exp Immunol **67**(1): 82-88.

- Romi, F., G. O. Skeie, N. E. Gilhus and J. A. Aarli (2005). "Striational antibodies in myasthenia gravis: reactivity and possible clinical significance." Arch Neurol **62**(3): 442-446.
- Rose, N. R. and C. Bona (1993). "Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited)." Immunol Today **14**(9): 426-430.
- Rother, R. P., S. A. Rollins, C. F. Mojciak, R. A. Brodsky and L. Bell (2007). "Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria." Nat Biotechnol **25**(11): 1256-1264.
- Sanders, D. B., K. El-Salem, J. M. Massey, J. McConville and A. Vincent (2003). "Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG." Neurology **60**(12): 1978-1980.
- Sanders, D. B., G. I. Wolfe, M. Benatar, A. Evoli, N. E. Gilhus, I. Illa, N. Kuntz, J. M. Massey, A. Melms, H. Murai, M. Nicolle, J. Palace, D. P. Richman, J. Verschuuren and P. Narayanaswami (2016). "International consensus guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary." Neurology **87**(4): 419-425.
- Schumm, F. and M. Stöhr (1984). "Accessory nerve stimulation in the assessment of myasthenia gravis." Muscle Nerve **7**(2): 147-151.
- Shen, C., Y. Lu, B. Zhang, D. Figueiredo, J. Bean, J. Jung, H. Wu, A. Barik, D. M. Yin, W. C. Xiong and L. Mei (2013). "Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis." J Clin Invest **123**(12): 5190-5202.
- Sine, S. M. (2012). "End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease." Physiol Rev **92**(3): 1189-1234.
- Skeie, G. O., S. Apostolski, A. Evoli, N. E. Gilhus, I. Illa, L. Harms, D. Hilton-Jones, A. Melms, J. Verschuuren and H. W. Horge (2010). "Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders." Eur J Neurol **17**(7): 893-902.
- Sommer, N., B. Sigg, A. Melms, M. Weller, K. Schepelmann, V. Herzau and J. Dichgans (1997). "Ocular myasthenia gravis: response to long-term immunosuppressive treatment." J Neurol Neurosurg Psychiatry **62**(2): 156-162.
- Terato, K., C. Do, J. Chang and T. Waritani (2016). "Preventing further misuse of the ELISA technique and misinterpretation of serological antibody assay data." Vaccine **34**(39): 4643-4644.
- Terato, K., C. T. Do, D. Cutler, T. Waritani and H. Shionoya (2014). "Preventing intense false positive and negative reactions attributed to the principle of ELISA to re-investigate antibody studies in autoimmune diseases." J Immunol Methods **407**: 15-25.
- Toyka, K. V. (2006). "Ptosis in myasthenia gravis: extended fatigue and recovery bedside test." Neurology **67**(8): 1524.

Tüzün, E. and P. Christadoss (2013). "Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis." Autoimmun Rev **12**(9): 904-911.

van der Neut Kofschoten, M., J. Schuurman, M. Losen, W. K. Bleeker, P. Martínez-Martínez, E. Vermeulen, T. H. den Bleker, L. Wiegman, T. Vink, L. A. Aarden, M. H. De Baets, J. G. van de Winkel, R. C. Aalberse and P. W. Parren (2007). "Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange." Science **317**(5844): 1554-1557.

Van Weemen, B. K. and A. H. Schuurs (1971). "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates." FEBS Lett **15**(3): 232-236.

Verschuuren, J. J., M. G. Huijbers, J. J. Plomp, E. H. Niks, P. C. Molenaar, P. Martinez-Martinez, A. M. Gomez, M. H. De Baets and M. Losen (2013). "Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4." Autoimmun Rev **12**(9): 918-923.

Vidarsson, G., G. Dekkers and T. Rispens (2014). "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions." Front Immunol **5**: 520.

Vincent, A. and J. Newsom-Davis (1985). "Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays." J Neurol Neurosurg Psychiatry **48**(12): 1246-1252.

Wang, S., H. Yang, R. Guo, L. Wang, Y. Zhang, J. Lv, X. Zhao, J. Zhang, H. Fang, Q. Zhang, Y. Zhang, J. Yang, X. Cui, P. Gao, T. Chang and F. Gao (2021). "Antibodies to Full-Length Agrin Protein in Chinese Patients With Myasthenia Gravis." Front Immunol **12**: 753247.

Witebsky, E., N. R. Rose, K. Terplan, J. R. Paine and R. W. Egan (1957). "Chronic thyroiditis and autoimmunization." J Am Med Assoc **164**(13): 1439-1447.

Witzemann, V. (2006). "Development of the neuromuscular junction." Cell Tissue Res **326**(2): 263-271.

Wolfe, G. I., H. J. Kaminski, I. B. Aban, G. Minisman, H. C. Kuo, A. Marx, P. Ströbel, C. Mazia, J. Oger, J. G. Cea, J. M. Heckmann, A. Evoli, W. Nix, E. Ciafaloni, G. Antonini, R. Witoonpanich, J. O. King, S. R. Beydoun, C. H. Chalk, A. C. Barboi, A. A. Amato, A. I. Shaibani, B. Katirji, B. R. Lecky, C. Buckley, A. Vincent, E. Dias-Tosta, H. Yoshikawa, M. Waddington-Cruz, M. T. Pulley, M. H. Rivner, A. Kostera-Pruszczyk, R. M. Pascuzzi, C. E. Jackson, G. S. Garcia Ramos, J. J. Verschuuren, J. M. Massey, J. T. Kissel, L. C. Werneck, M. Benatar, R. J. Barohn, R. Tandan, T. Mozaffar, R. Conwit, J. Odenkirchen, J. R. Sonett, A. Jaretzki, 3rd, J. Newsom-Davis and G. R. Cutter (2016). "Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis." N Engl J Med **375**(6): 511-522.

Yan, M., Z. Liu, E. Fei, W. Chen, X. Lai, B. Luo, P. Chen, H. Jing, J. X. Pan, M. H. Rivner, W. C. Xiong and L. Mei (2018). "Induction of Anti-agrin Antibodies Causes Myasthenia Gravis in Mice." Neuroscience **373**: 113-121.

Yu, Z., M. Zhang, H. Jing, P. Chen, R. Cao, J. Pan, B. Luo, Y. Yu, B. M. Quarles, W. Xiong, M. H. Rivner and L. Mei (2021). "Characterization of LRP4/Agrin Antibodies From a Patient With Myasthenia Gravis." Neurology **97**(10): e975-e987.

Zhang, B., S. Luo, Q. Wang, T. Suzuki, W. C. Xiong and L. Mei (2008). "LRP4 serves as a coreceptor of agrin." Neuron **60**(2): 285-297.

Zhang, B., C. Shen, B. Bealmear, S. Ragheb, W. C. Xiong, R. A. Lewis, R. P. Lisak and L. Mei (2014). "Autoantibodies to agrin in myasthenia gravis patients." PLoS One **9**(3): e91816.

Zhang, B., J. S. Tzartos, M. Belimezi, S. Ragheb, B. Bealmear, R. A. Lewis, W. C. Xiong, R. P. Lisak, S. J. Tzartos and L. Mei (2012). "Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis." Arch Neurol **69**(4): 445-451.

Zisimopoulou, P., T. Brenner, N. Trakas and S. J. Tzartos (2013). "Serological diagnostics in myasthenia gravis based on novel assays and recently identified antigens." Autoimmun Rev **12**(9): 924-930

I. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
AK	Autoantikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
Cy	Cyaninfarbstoff
DAPI	Diamidinophenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GFP	Green fluorescent protein
HBS	HEPES buffered saline
HEK	Human embryonic kidney
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
LRP4	Lipoprotein receptor-related protein 4
MG	Myasthenia gravis
MuSK	Muskel-spezifische Kinase
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Plasma exchange / Plasmapherese
PFA	Paraformaldehyd
PDL	Poly-D-Lysin
TMB	Tetramethylbenzidin
V.a.	Verdacht auf

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Proteine an der neuromuskulären Endplatte (Illa, Cortés-Vicente et al. 2018).....	7
Abbildung 2 Schema zum Auswertungsprinzips der ELISA Werte	26
Abbildung 3 Schematische Gegenüberstellung des Bindungsverhaltens des Sekundärantikörpers (A und B) und des daraus folgenden Cy3-Signals (A* und B*).....	33
Abbildung 4 Aufnahmen-basierte Gegenüberstellung der vorliegenden bzw. transfizierten HEK-293-Zellen (A und B) und des aus dem Bindungsverhalten des Sekundärantikörpers folgenden Cy3-Signals (A* und B*)	34
Abbildung 5 Verteilung der optischen Dichten im Cortactin-ELISA	36
Abbildung 6 IgG-Subklassen der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren.....	37
Abbildung 7 Komplementbindungsverhalten der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren	39
Abbildung 8 Starke Bindung der positiven Kontrollseren 1 und 2 an Cortactin-transfizierten HEK 293-Zellen	41
Abbildung 9 Schwache Bindung der Patientenseren 1 bis 3 an Cortactin-transfizierten HEK-293 Zellen	43
Abbildung 10 Verteilung des Gesamt-IgG-Gehalts im Gesamt-IgG-ELISA.....	44
Abbildung 11 Vergleich der ursprünglichen ELISA-Ergebnisse mit den Ergebnissen der Verlaufsseren der Patienten 1-3	46
Abbildung 12 Verteilung der optischen Dichten im Agrin-ELISA.....	53
Abbildung 13 Optische Dichten der Belgienseren im Agrin-ELISA	54
Abbildung 14 Färbungen der Agrin-transfizierten HEK-293-Zellen	56
Abbildung 15 Vergleich der Färbungen bei Serumverdünnung 1:100 und 1:500	57

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Proteine und Komplement für ELISA und Komplementbindungsversuche ..	15
Tabelle 2 Zellen und DNA für Bindungsversuche an HEK-Zellen	15
Tabelle 3 Antikörper für ELISA und Bindungsversuche an HEK-Zellen.....	15
Tabelle 4 Reagenzien und Material für ELISA und Bindungsversuche an HEK- Zellen	16
Tabelle 5 Lösungen und Puffer für ELISA und Bindungsversuche an HEK-Zellen	17
Tabelle 6 Lösungen und Puffer für Kultivierung und Transfektion von HEK-Zellen ...	18
Tabelle 7 Verwendete Geräte	19
Tabelle 8 Verwendete Programme	20
Tabelle 9 Charakterisierung der in die Studie eingeschlossenen Patient*innen	22
Tabelle 10 Titer der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren	36
Tabelle 11 Gesamt-IgG-Gehalt der Seren mit Anti-Cortactin-Autoantikörpern.....	45
Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Seren	47
Tabelle 13 Klinische Merkmale der Anti-Cortactin-Autoantikörper positiven Patient*innen	51
Tabelle 14 Vergleich der Prävalenzen von Anti-Cortactin-Autoantikörpern im Serum von Patient*innen mit Myasthenia gravis (MG) in vorliegenden Studien.....	60
Tabelle 15 Vergleich der Prävalenzen von Anti-Agrin-Autoantikörpern im Serum von Patient*innen mit Myasthenia gravis in vorliegenden Studien	62
Tabelle 16 Vergleich der klinischen Charakteristika von Anti-Cortactin- Autoantikörper positiven Patient*innen mit Myasthenia gravis in vorliegenden Studien	70

IV. Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Claudia Sommer für die ausgezeichnete langjährige Betreuung, die vielen hilfreichen Ratschläge und die allumfassende Unterstützung in der Umsetzung des Projekts danken.

Außerdem gebührt mein größter Dank Frau PD Dr. Kathrin Doppler, die mich über den gesamten Zeitraum begleitete und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Neben ihrer kompetenten und zuverlässigen Betreuung waren ihre Diskussionsbereitschaft, ihre Motivation und ihre Geduld von unschätzbarem Wert. Ohne ihr großes Engagement wäre der erfolgreiche Abschluss dieses Projekts nicht möglich gewesen.

Ebenso dankbar bin ich für die große Unterstützung, die ich innerhalb der Arbeitsgruppe und von den Mitarbeiter*innen der neurologischen Universitätsklinik Würzburg erfahren habe. Insbesondere Frau Barbara Reuter und Frau Dr. Helena Stengel sind hierbei zu nennen, die mich gewissenhaft in die Methoden der experimentellen Forschung einarbeiteten.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern, meiner gesamten Familie, meinem Partner Sören Krüger und meinen Freund*innen bedanken, die mich immer unermüdlich unterstützt haben.

V. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Antonia Hemprich
Geburtsdatum: 14.07.1995
Geburtsort: Leipzig
Nationalität: Deutsch

Berufliche Tätigkeit

Ab 03/2022 Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für
Frauenheilkunde am Universitätsklinikum Leipzig

12/2021 Approbation als Ärztin

Universitäre Ausbildung

11/2021 Drittes medizinisches Staatsexamen

11/2020 – 10/2021 Praktisches Jahr

10/2020 Zweites medizinisches Staatsexamen

08/2019 – 01/2020 Auslandssemester an der Université de Strasbourg,
Frankreich

08/2016 Erstes medizinisches Staatsexamen

10/2014 Beginn des Medizinstudiums an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

Schulische Ausbildung

08/2005 – 07/2013 Thomasschule zu Leipzig, Abitur
- 2010/11 Auslandsschuljahr Pasadena, USA

08/2001 – 07/2005 49. Grundschule, Leipzig

Stipendium

01/2015 – 11/2021 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen
Volkes

VI. Eigene Veröffentlichung

07/2021 Doppler K, Hemprich A, Haarmann A, Brecht I, Franke M, Kröger S, Villmann C, Sommer C. Autoantibodies to cortactin and agrin in sera of patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol.* 2021 Jul 15;356:577588. doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577588. Epub 2021 Apr 30. PMID: 33962172.