

Aus dem Institut für Systemische Entzündungsforschung
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jörg Köhl

Nachweis von Autoantikörpern gegen humane Acetylcholinrezeptoren unter Verwendung rekombinanter Zielantigen-Komplexe

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Jürgen Westermann
aus Uelzen

Lübeck 2017

1. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz
2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann
3. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Kai-Uwe Kalies

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.02.2017

Nachweis von Autoantikörpern gegen humane Acetylcholinrezeptoren unter Verwendung rekombinanter Zielantigen-Komplexe

Zusammenfassung

Bis zu 90% der Patienten mit generalisierter Myasthenia gravis weisen im Serum Autoantikörper gegen Epitope der adulten oder der fötalen Acetylcholinrezeptoren (AChR) auf. Sie bewirken einen Verlust von AChR-Molekülen und Signalübertragungsfehler in der Synapse. Weiterhin kommt es zu morphologischen Veränderungen der motorischen Endplatte und zu Muskelschwäche. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzymimmuntest (ELISA) zur Bestimmung der Anti-Acetylcholinrezeptor-Antikörper entwickelt, bei dem als Zielantigene rekombinante fötale und adulte AChR eingesetzt wurden, die mittels zweier, gegen unterschiedliche Epitope gerichteter Antikörper an die Festphase gekoppelt wurden.

Die Rezeptor-Untereinheiten α , β , δ sowie die fötale γ - und die adulte ϵ -Untereinheit wurden kloniert und durch Ko-Transfektion in *E. coli* verschiedene AChR-Formen generiert. Das radioaktiv markierte Schlangengift I^{125} - α -Bungarotoxin, mit einer hohen Affinität zu nativen Acetylcholinrezeptoren, zeigte auch eine starke Bindung an die rekombinanten Rezeptoren. An den Kopplungsstellen zwischen der α - und δ -Untereinheit der Rezeptoren (mit hoher Affinität für das Schlangengift) sowie zwischen der α - und γ -Untereinheit (geringere Affinität) hat das markierte Schlangengift gebunden. Dies war eine erste Bestätigung des richtigen Aufbaus und der Faltung der rekombinanten Rezeptoren. Zwei stabil transformierte HEK-293T-Zellklone wurden daraufhin entwickelt.

Die beiden Rezeptortypen wurden über eine indirekte Beschichtung („Capture“-Technik) mit einem monoklonalen Maus-Antikörper – gerichtet gegen die β -Untereinheit – und einem polyklonalen Ziege-Antikörper – gerichtet gegen die δ -Untereinheit – an eine Mikrotiterplatte gebunden. Die empfindlichen und thermolabilen Rezeptoren konnten auf der Mikrotiterplatte während und nach der Trocknung stabilisiert werden. Die weiteren Reagenzien des Testsatzes wurden so eingestellt, dass sich ein optimales Signal-Rauschverhältnis ergab.

Der neu entwickelte ELISA wurde hinsichtlich Durchführbarkeit und klinischer Aussagekraft im Vergleich zu etablierten Verfahren überprüft. In Verdünnungsversuchen wurde eine sehr gute Wiederfindung des Analyten über weite Teile der Standardkurve festgestellt, eine Einschränkung des Messbereichs zur Vermeidung nicht-proportionaler Plateau-Effekte für verdünnte Proben wie beim RIA (Auswertung von 0,25 bis maximal

3,0 nmol/l) war nur in geringerem Maße (Messbereich ELISA von 0,25 bis 6,0 nmol/l) notwendig. Hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität bei der Bestimmung von Patientenproben im Vergleich zu etablierten Radioimmuntests und zu einem auf rekombinanten Zellen basierenden indirekten Immunfluoreszenztest konnte eine gute Übereinstimmung erzielt werden. Im Gegensatz zum RIA sind die α -Bungarotoxin-Bindungsregionen unbesetzt, so dass mit dem ELISA auch etwa vorhandene gegen die Acetylcholin-Bindungsstelle gerichtete Antikörper erfasst werden konnten. Mit Hilfe einer indirekten Beschichtung über zwei Antiseren kann das gesamte Spektrum der Zielantigene des AChR auf der Festphase präsentiert werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
1. Einleitung	6
1.1 Aufbau und Funktion der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren	6
1.2 Die neuromuskuläre Synapse	12
1.3 Das Krankheitsbild der Myasthenia gravis	18
1.4 Diagnostik der Myasthenia gravis	23
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	35
1.6 Strategie der Entwicklung eines Anti-AChR-Ak ELISA	36
2. Patienten, Material und Methoden	36
2.1 Patienten	36
2.2 Chemikalien, Puffer und ELISA-Reagenzien	37
2.3 Geräte	40
2.4 Klonierung und Zellkultur	40
2.5 Kommerzielle Reagenzien zur Anti-AChR-Ak Diagnostik	44
2.6 Referenzmethode Anti-AChR-Ak Radioimmunassay	44
2.7 Referenzmethode Indirekte Immunfluoreszenz für Anti-AChR-Ak	48
2.8 Testdurchführung des neu entwickelten Anti-AChR-Ak ELISA	49
2.9 Berechnungen und Statistik	50
3. Ergebnisse	51
3.1 Validität der Referenzmethoden	51
3.2 Reaktivität rekombinanter adulter und fötaler Acetylcholin-rezeptoren	53
3.3 Eigenschaften der nAChR aus Zellkulturlinien	56
3.4 Qualität beschichteter Mikrotiterplatten	58
3.5 Ergebnisse der Testoptimierung	69
3.5.1 Konjugat	69
3.5.2 Probenpuffer	70
3.5.3 Kinetik	72
3.6 Validität des neu entwickelten Anti-AChR-Ak ELISA	75
3.6.1 Messbereich und Standardkurve	75
3.6.2 Reproduzierbarkeit	78
3.6.3 Verdünnungslinearität	79
3.6.4 Interferenzen	80
3.6.5 Klinische Sensitivität und Spezifität	80
4. Diskussion	88
4.1 Einsatz rekombinanter oder nativer AChR zur Antikörpertestung	89
4.2 Einfluss der Kopplungstechnik von AChR an die feste Phase auf die Antigenreaktivität	92
4.3 Validität des neu entwickelten ELISA im Vergleich zu etablierten Testmethoden	96
5. Literaturverzeichnis	100
6. Eigene Veröffentlichungen	107
7. Abkürzungsverzeichnis	108

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren

Zellen besitzen auf ihrer Membranoberfläche Ionenkanäle und Rezeptor-Kanal-Komplexe, die elektrisch geladenen Teilchen das Durchqueren der Zellmembran ermöglichen. Der Rezeptor-Kanal-Komplex besteht aus mehreren Proteinuntereinheiten, die in die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran eingebaut sind (Transmembranproteine). Die beim Acetylcholinrezeptor aus fünf Untereinheiten bestehenden Komplexe gruppieren sich kreisförmig und bilden eine Pore, die im Ruhezustand für Ionen undurchlässig ist. Der Acetylcholinrezeptor ist eher ein biegsames und flexibles Gebilde als eine starre Röhre. Er besitzt zwei Bindungsstellen für Acetylcholin und verändert seine räumliche Gestalt nach Bindung des Liganden. Es bedarf zweier Acetylcholin-Moleküle, die Rezeptorpore zu öffnen (Lindstrom 2009, siehe Abbildung 1).

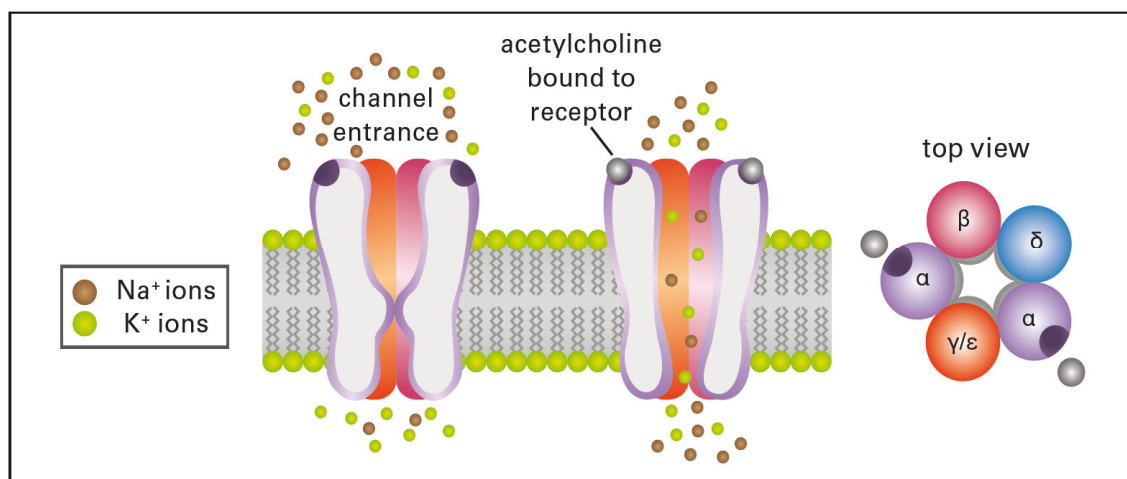


Abbildung 1: Aufbau des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) und Anordnung der Untereinheiten (α , β , δ , ϵ oder γ). Abbildung aus Westermann et al., 2014.

Die Poren von Ionenkanälen weisen oft eine hohe Selektivität hinsichtlich der Ionen auf, die sie durchtreten lassen. Durch den Fluss der Ionen wird die Spannung auf der Membranoberfläche, d. h. der Potentialunterschied zwischen innen und außen (intra-/extrazellulär) verändert.

Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (nAChR) ist ein Liganden-gesteuerter Kationenkanal, der eine zentrale Funktion in der Auslösung der Kontraktion quergestreifter

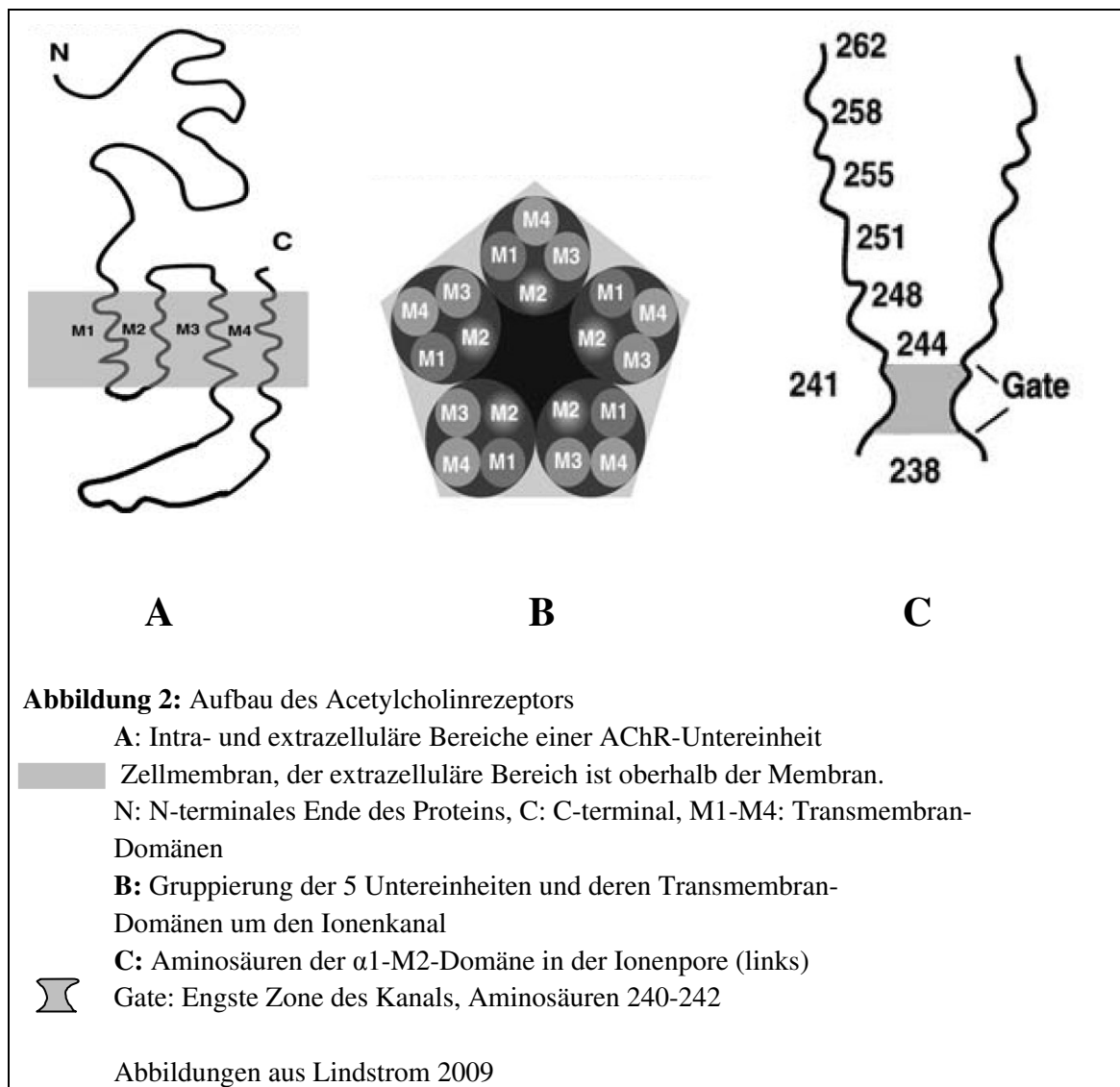
Skelettmuskulatur hat. Der in der Membran verankerte nAChR hat eine Längenausdehnung von 160 Ångström (Å), senkrecht zur Membran, und einen Durchmesser der Kanalpore von 20 Å. Das Molekulargewicht beträgt 290 Kilodalton (Unwin 2005). Das Protein entspringt einer Gen-Superfamilie, die auch für Untereinheiten des Glyzinrezeptors, des Gamma-Aminobuttersäure (GABA) -rezeptors und des Serotoninrezeptors kodiert. Alle bekannten muskulären und neurologischen Acetylcholinrezeptoren werden aus 5 Untereinheiten aufgebaut (Pentamere), die sich um den Ionenkanal gruppieren. 17 Untereinheiten sind bekannt: α 1-10, β 1-4, γ , δ und ϵ (Lindstrom 2009). Der genetische Code für die α -, γ - und δ - Untereinheiten wurde auf Chromosom 2 lokalisiert, für die β - und ϵ - Untereinheit auf Chromosom 17 (Beeson et al., 1990, Lobos 1993).

Alle AChR-Untereinheiten sind gleichartig aufgebaut: ca. 210 Aminosäuren am N-terminalen Teil des maturen Proteins formen die **große extrazelluläre Domäne**. Diese enthält eine durch Cystein-Cystein-Disulfid-Bindung gebildete Schleife (Cys-Loop), die für alle Rezeptoren der Superfamilie charakteristisch ist (Lindstrom 2009, Sine et al., 2006, Beck et al., 2015).

Anschließend folgt eine hydrophobe Sequenz von etwa 90 Aminosäuren, die 3 durch kurze Teilstücke verbundene **Transmembran-Domänen (M1-M3)** bilden. Darauf folgt eine 110 bis 270 Aminosäuren lange intrazelluläre Kette. Diese große **zytoplasmatische Domäne** ist die variabelste Sequenzregion der verschiedenen AChR-Untereinheiten und unterscheidet sich auch deutlich zwischen verschiedenen Spezies. Eine weitere Transmembranregion (**M4**) und eine **kurze extrazelluläre Kette** (10-20 Aminosäuren) schließen am C-terminalen Ende das Protein ab (Lindstrom 2009, siehe Abbildung 2A).

Die Ionenselektivität des AChR-Kanals ist durch stark elektronegative Aminosäuren im Eingangsbereich der Ionenpore und an deren Rand bedingt. Bei geöffnetem Zustand können positiv geladene Ionen wie Calcium (Ca^{2+}), Kalium (K^+) und Natrium (Na^+) ungehindert permeieren. Die Aminosäuren Glycin 240, Glutaminsäure 241 und Lysin 242 der Transmembran-Domäne 2 (M2) auf der α 1-Untereinheit haben eine besondere Bedeutung. Diese Sequenz ist in verschiedenen Spezies hoch konserviert. Kleine Bewegungen in dieser Region können den Kanal öffnen oder schließen (siehe Abbildung 2B und 2C, Connolly et al., 2004, Lindstrom 2009). Der Zugang ins Innere der Pore wird durch Aminosäuren auf der M4-Domäne bestimmt (Unwin 2005). Im extrazellulären Raum der α 1-Untereinheit befindet sich die **Bindungsregion für Acetylcholin** und das wichtigste immunogene Epitop des AChR, die „main

immunogenic region“ (**MIR**, Aminosäuren 67-76), gegen die über 50% der Autoantikörper der Myasthenia-gravis-Patienten gerichtet sind (Baets et al., 2002, Barkas et al., 1988).



Im Gegensatz zur großen Anzahl unterschiedlich aufgebauter neurologischer nAChR gibt es nur zwei muskuläre Typen: den fötalen $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ - und den adulten $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ -AChR, die jeweils zwei $\alpha 1$ -Untereinheiten besitzen (Lindstrom 2009). Im Laufe des Lebens wird im muskulären nAChR die fötale γ -Untereinheit durch die adulte ϵ -Untereinheit ausgetauscht (Rudolf et al., 2014). Dadurch nimmt die Ionenleitfähigkeit zu, die Öffnungszeit des Rezeptors verkürzt sich (Mishina et al., 1986; Schwarz et al.,

2000) und der Einstrom von Calcium-Ionen (Ca^{2+}) wird dreifach erhöht (Villarroel et al., 1996).

Die **Acetylcholin-Bindungsregion** befindet sich an der Schnittstelle der $\alpha 1$ -Untereinheit mit der δ - und γ - bzw. der ε -Kette mit der höchsten Affinität für Acetylcholin an der $\alpha 1$ - δ -Bindungsstelle. Aus Affinitätsstudien („photoaffinity labelling“, Dennis et al., 1988, Karlin et al., 1995) mit vollständigen, nativen Rezeptoren oder mit rekombinanten Rezeptoren, deren Seitengruppen durch gerichtete Mutagenese der AChR-Bindungsregion modifiziert wurden (Grutter et al., 2001), sind die für die Acetylcholin-Bindung relevanten Aminosäuren bekannt. In der Bindungsregion sind keine negativ geladenen Aminosäuren enthalten, das positiv geladene Acetylcholin wird über eine Wechselwirkung mit den π -Elektronen der hier lokalisierten aromatischen Aminosäuren gebunden. Ein strukturell ähnliches Acetylcholin-Bindungsprotein mancher Wasserschnecken (*Lymnaea stagnalis*, *Bulinus truncatus*, *Aplysia californica*) und die Acetylcholinesterase (Sussman et al., 1991) besitzen gleich gebaute Bindungsstellen (Celie et al., 2004, Hansen et al., 2005, Sine 2012).

Verbindungen mit tertiären oder quartären Aminen wie Tetramethylammonium können sich, wie Acetylcholin mit seiner quartären Amin-Gruppe, an diesen Bindungsstellen anlagern. Sie wirken daher als AChR-Agonisten (Lindstrom 2009 und Zhong et al., 1998).

Dass sich die Poren des AChR durch Bindung des Liganden Acetylcholin oder eines Agonisten an die Acetylcholin-Bindungsregion öffnen, lässt sich mit dem „quaternary twist model“ (von Monod-Wyman-Changeux, MWC-Modell) erklären. Der Übergang des Kanals von geschlossen (rested) zu geöffnet (activated) wird durch die Bindung von zwei Molekülen Acetylcholin an die α -Untereinheiten ausgelöst. Hierdurch werden die Untereinheiten um die senkrecht zur Membran-oberfläche stehende Achse gegenläufig verdreht und der Porendurchmesser um 3Å erweitert (siehe Abbildung 3). Dieser Durchmesser genügt für den Durchtritt der hydratisierten Natrium (Na^+)-Ionen (Changeux et al., 2008, Calimet et al., 2013). Im Gegensatz hierzu werden für das dauerhafte Öffnen des Kanals größere Moleküle benötigt, die sich zusätzlich zur Acetylcholin-Bindungsstelle auch an andere seitliche Stellen binden. Zu diesen Molekülen gehört α -Bungarotoxin, das Gift der Schlange *Bungarus multicinctus* (Lindstrom 2009).

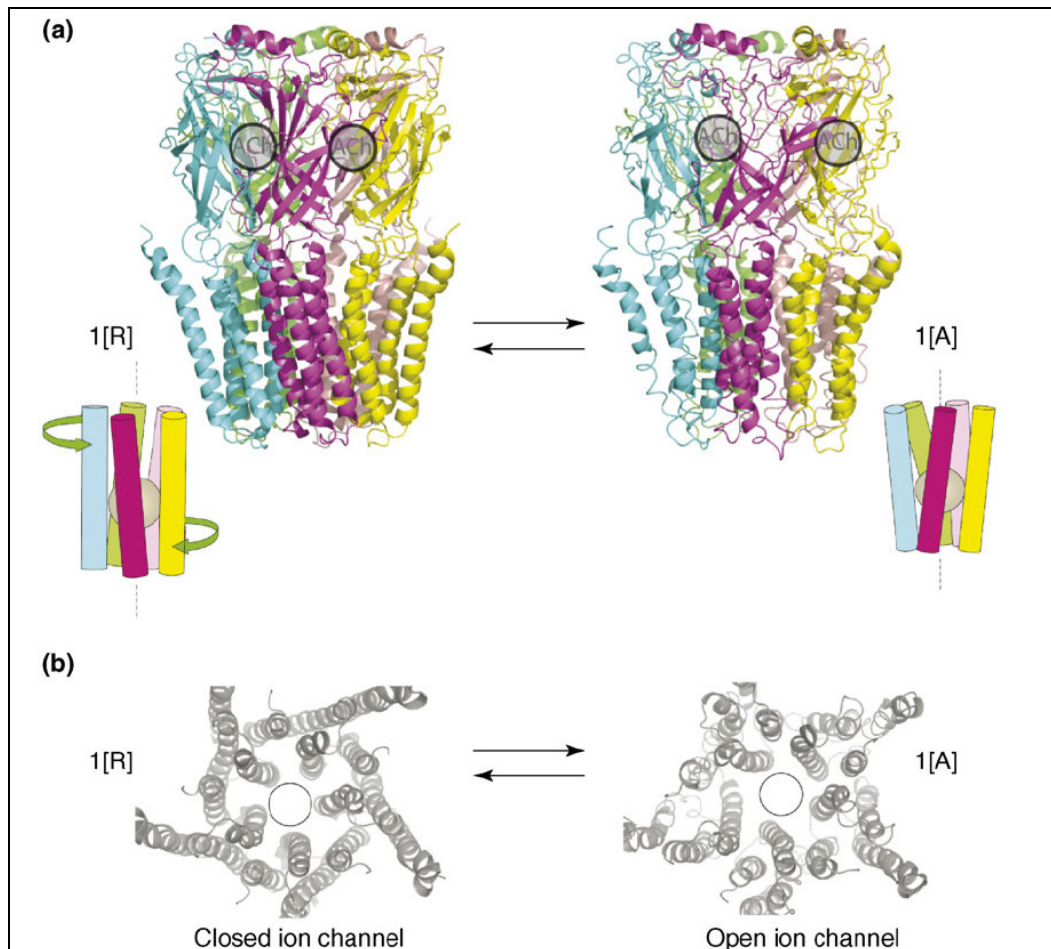


Abbildung 3: Quartäres Twist-Modell (a): Ruhender (rested 1[R]) und aktiver (activated 1[A]) Zustand des AChR in der Seitenansicht. (b): Darstellung der Transmembran-Domänen im Ruhe- und aktiven Zustand, von oben betrachtet. Im aktiven Zustand ist die Pore größer (1 [A]). Abbildung aus Changeux et al., 2006.

Die MIR (main immunogenic region): Die bei der Immunisierung von Ratten und Mäusen mit AChR-Proteinen gewonnenen polyklonalen und monoklonalen Antikörper haben immens zur Aufklärung der nAChR-Struktur und der Aufklärung der Rezeptoreigenschaften beigetragen. Sie fanden auch Verwendung zur affinitätschromatographischen Aufreinigung der AChR. Durch Immunisierung mit denaturierten Proteinen oder Fragmenten des AChR bzw. synthetischen Peptiden wurden Antikörper gegen die weniger konformitätsabhängigen Epitope der zytoplasmatischen Region hergestellt. (Lindstrom 2009). Mit der **nativen $\alpha 1$ -Untereinheit** des nAChR erhielt man vorwiegend gegen die extrazelluläre Domäne gerichtete Antikörper. Bei mehr als 50% der immunisierten Tiere wie auch bei der Hälfte der Patienten mit Myasthenia gravis wurden Antikörper gefunden, die gegen die MIR gerichtet waren, sie konkurrierten

untereinander um dieselbe Bindungsregion. Die verschiedenen Antikörper binden sich an überlappende Regionen der MIR, nicht notwendigerweise an ein Epitop (Lindstrom 2009).

Über die Kristallstruktur (Fab-Fragmente) zweier monoklonaler Antikörper, die sich mit hoher Affinität an die MIR binden, insbesondere durch die Struktur der variablen Domänen (Poulas et al., 2001, Kontou et al., 2000) und durch gerichtete Mutationen von Seitenketten konnte die MIR genauer lokalisiert werden. Sie befindet sich auf dem extrazellulären Teil der $\alpha 1$ -Untereinheit, die Region konnte auf die Aminosäuren 67-76 eingegrenzt werden. Die Aminosäuren 68 und 71 haben eine besondere Bedeutung für die Immunogenität der MIR bei den verwendeten monoklonalen Antikörpern (Saedi et al., 1990).

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von mit Anti-MIR-Antikörpern markierten und unmarkierten Rezeptoren wurde die räumliche Lage der MIR auf einen Ort oben am Kopf des Rezeptors, zum synaptischen Spalt hin gerichtet, festgestellt (Beroukhim et al., 1995).

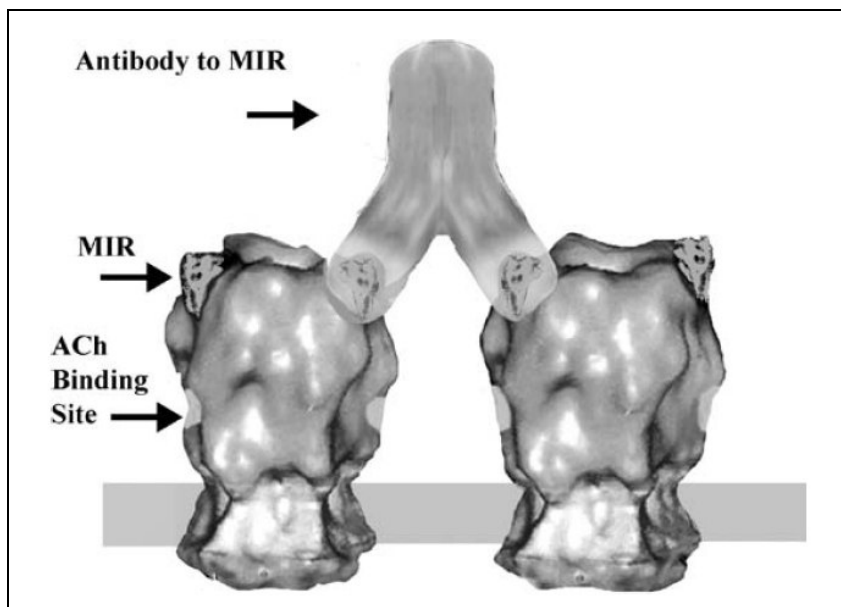


Abbildung 4: Dargestellt sind zwei Acetylcholinrezeptoren, die jeweils zwei $\alpha 1$ -Untereinheiten enthalten und damit je zwei der räumlich leicht zugänglichen MIR. Ein Antikörper kreuzvernetzt die beiden AChR durch Bindung an die jeweilige MIR. Die Bindungsstelle für Acetylcholin bleibt frei zugänglich. Abbildung aus Lindstrom 2009.

Damit ist die MIR für Antikörper (Ak) im extrazellulären Raum leicht zugänglich, wobei die Ak nur die MIR zweier benachbarter nAChR vernetzen können, aber nicht zwei MIR innerhalb eines Rezeptors. Die Acetylcholin-Bindungsstelle liegt etwas tiefer (siehe Abbildung 4).

Die Bindung von Acetylcholin an die Bindungsstelle auf der $\alpha 1$ -Untereinheit wird nicht durch an die MIR gebundene Ak behindert oder beeinflusst (keine inhibitorische oder allosterische Wirkung). Das gleiche gilt für α -Bungarotoxin: Auch wenn dieses an der $\alpha 1$ -Bindungsstelle angedockt ist, kann der gegen MIR gerichtete Autoantikörper noch reagieren (Lindstrom 2009; Voraussetzung für die Funktion der konventionellen RIA). Eine Bindung des Aks an die MIR hat keine elektronenmikroskopisch nachweisbare Konformitätsänderung des nAChR zur Folge (Beroukhim et al., 1995).

1.2 Die neuromuskuläre Synapse

Die Kontaktstellen zwischen Neuronen oder zwischen Motoneuronen und Muskelfasern dienen der Reizweiterleitung. Die neuromuskuläre Synapse (neuromuscular junction, NMJ) ist die Verbindung eines Axons einer motorischen Nervenzelle mit einer Muskelfaser. Ein relativ schwacher Nervenimpuls wird hier verstärkt und bewirkt eine Muskelkontraktion (Thanvi et al., 2004). Der prinzipielle Aufbau wird in Abbildung 5 gezeigt.

Präsynapse: An der präsynaptischen Endigung eines Motorneurons wird durch die Cholin-Acetyltransferase aus Acetyl-Koenzym A (aktivierter Essigsäurerest) und Cholin das Acetylcholin synthetisiert und in einem Quantum von 8.000-13.000 Molekülen durch ein Transportprotein in Vesikel gepackt. Das Acetylcholin-Transportprotein (**Vesicular acetylcholine transporter, VAChT**) pumpt Acetylcholin in die Vesikel im Austausch gegen Protonen, die zuvor durch die Wirkung einer vakuolären ATPase erzeugt wurden (Rand 2007). Die gesamte Sequenz der VAChT befindet sich ohne Unterbrechung im ersten Intron des Cholin-Acetyltransferase-(ChAT)-Gens. Die Erstellung der „messenger RNA“ (mRNA) erfolgt durch dieselben Promotoren. Somit sind diese beiden Proteine sehr eng miteinander verknüpft (Toll et al., 1980, Erickson et al., 1994). In den Vesikeln ist das Acetylcholin vor der Zersetzung durch Acetylcholinesterase geschützt. Die Vesikel wurden in hoher Dichte an Orten der Präsynapse gefunden (release sites), die den Regionen mit hoher AChR-Konzentration auf der postsynaptischen Seite gegenüberliegen (Ruff 2009).

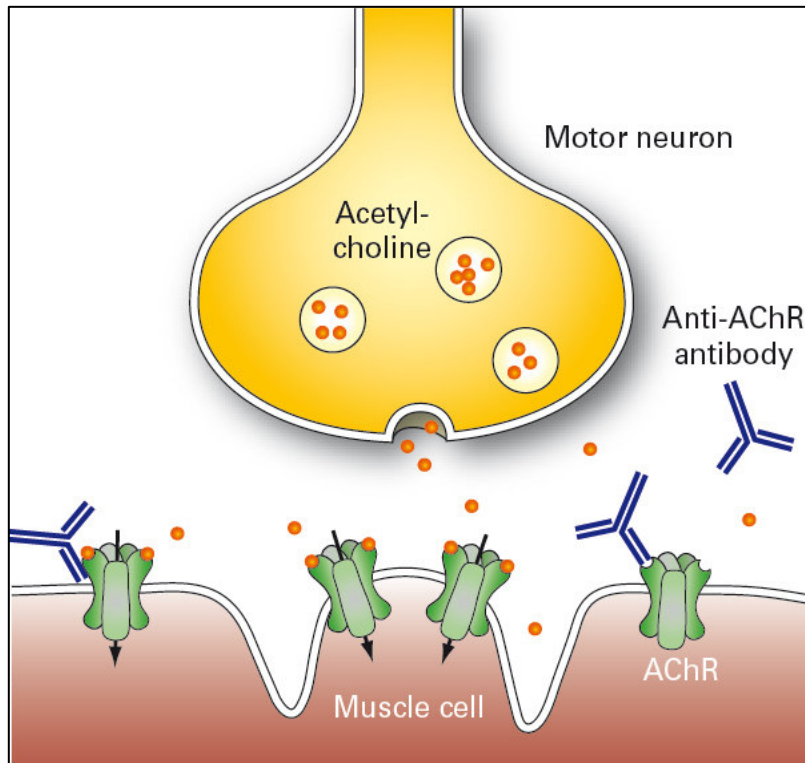


Abbildung 5: Aufbau der Synapse, Abbildung aus Westermann et al., 2012.

Durch ein eintreffendes Aktionspotential wird das Neuron depolarisiert, was einen Calcium (Ca^{2+})-Einstrom über spannungsgesteuerte Calciumkanäle vom P/Q-Typ (Voltage gated calcium channel, **P/Q type VGCC**) zur Folge hat. Die VGCC liegen unmittelbar neben den „release sites“, sie bilden 2 parallele Doppelreihen im Abstand von 20 Nanometer (nm). Benachbarte Reihenpaare haben einen Abstand von ca. 60 nm (Ruff 2009, Engel 1991, Pumplin et al., 1981). Der Eintritt der Ca^{2+} -Ionen triggert die Fusion von 50-300 Vesikeln mit der präsynaptischen Nervenzell-membran (Exozytose) und das in den Vesikeln enthaltene Quantum an Acetylcholin wird in den synaptischen Spalt freigesetzt (Nurullin et al., 2011, Thanvi et al., 2004).

Die Lambert-Eaton-Myasthenie wird durch gegen VGCC gerichtete Autoantikörper bewirkt, welche die Anzahl und die Funktionsfähigkeit der VGCC reduzieren. Viele der mit den Vesikeln assoziierten Proteine sind das Ziel einer proteolytischen Zerstörung durch das Botulinumtoxin (Ruff 2009).

Auch Adenosintriphosphat (ATP) wird bei der Exozytose frei und moduliert (synchronisiert) die Freisetzungsfrequenz der Vesikel. Die Synchronisation der Vesikel-

Exozytose optimiert die Signalübertragung und reduziert den Verbrauch von Vesikeln (Ruff 2009, Tsentsevitsky et al., 2013).

Durch die Öffnung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen und dem hieraus folgenden Ausstrom von Kaliumionen wird das ursprüngliche Membranpotential der Präsynapse wieder hergestellt. Unmittelbar nach der Exozytose wird die Vesikelmembran durch Pinozytose/ Endozytose wiedergewonnen und mit Acetylcholin beladen. Das durch die Wirkung der Acetylcholinesterase im synaptischen Spalt gebildete Cholin wird durch das Cholin-Transportprotein (CHT), lokalisiert in der Neuronenzellmembran und in den Vesikelmembranen, zurückgewonnen (Ferguson et al., 2003).

Cholinergene Neuronen haben keine Möglichkeit, Cholin *de novo* zu synthetisieren. Cholin wird überwiegend durch die Nahrung aufgenommen und daher zurückgewonnen (Ribeiro et al., 2006, siehe Abbildung 6). Da die präsynaptische Zelle autonom über alle Komponenten für wiederholte Exozytose und Membranrecycling verfügt, lässt sich die Freisetzung des Acetylcholins aus den Vesikeln vielfach wiederholen (Jahn et al., 1994).

Der **synaptische Spalt** trennt die Prä- von der Postsynapse. Das auf der Präsynapse durch Exozytose der Vesikel ausgeschüttete Acetylcholin diffundiert durch den synaptischen Spalt zur Postsynapse. Die Diffusionskonstante des Acetylcholins ist, unter anderem auf Grund seines geringen Molekulargewichtes (146 Dalton), sehr hoch (Ruff 2009). Durch die Wirkung der Acetylcholin-Esterase (AChE) aus der Membran der Muskelzelle nimmt die Acetylcholin-Konzentration im Spalt innerhalb von einer Millisekunde (ms) nach Ausschüttung wieder ab (Sine 2012) und begrenzt den Effekt des Acetylcholins auf die unmittelbare zeitliche Nähe der Freisetzung. Die AChE verhindert die mehrmalige Aktivierung der AChR durch eine einmalige Freisetzung von Acetylcholin (Land et al., 1984). Dementsprechend verlängert eine Inhibition der AChE die Verweildauer des Acetylcholins im Spalt.

In der Basal-Lamina der Muskelzellen im synaptischen Spalt wird durch die Vernetzung von Kollagen IV ($\alpha 2$ -, $\alpha 4$ - und $\alpha 5$ - Ketten) und Laminin (Laminin-4, -9 und -11) ein Grundgerüst aufgebaut. In dieses Netzwerk binden sich andere extrazelluläre Matrixproteine wie Agrin, Perlecan und Entactin (Ruff 2009).

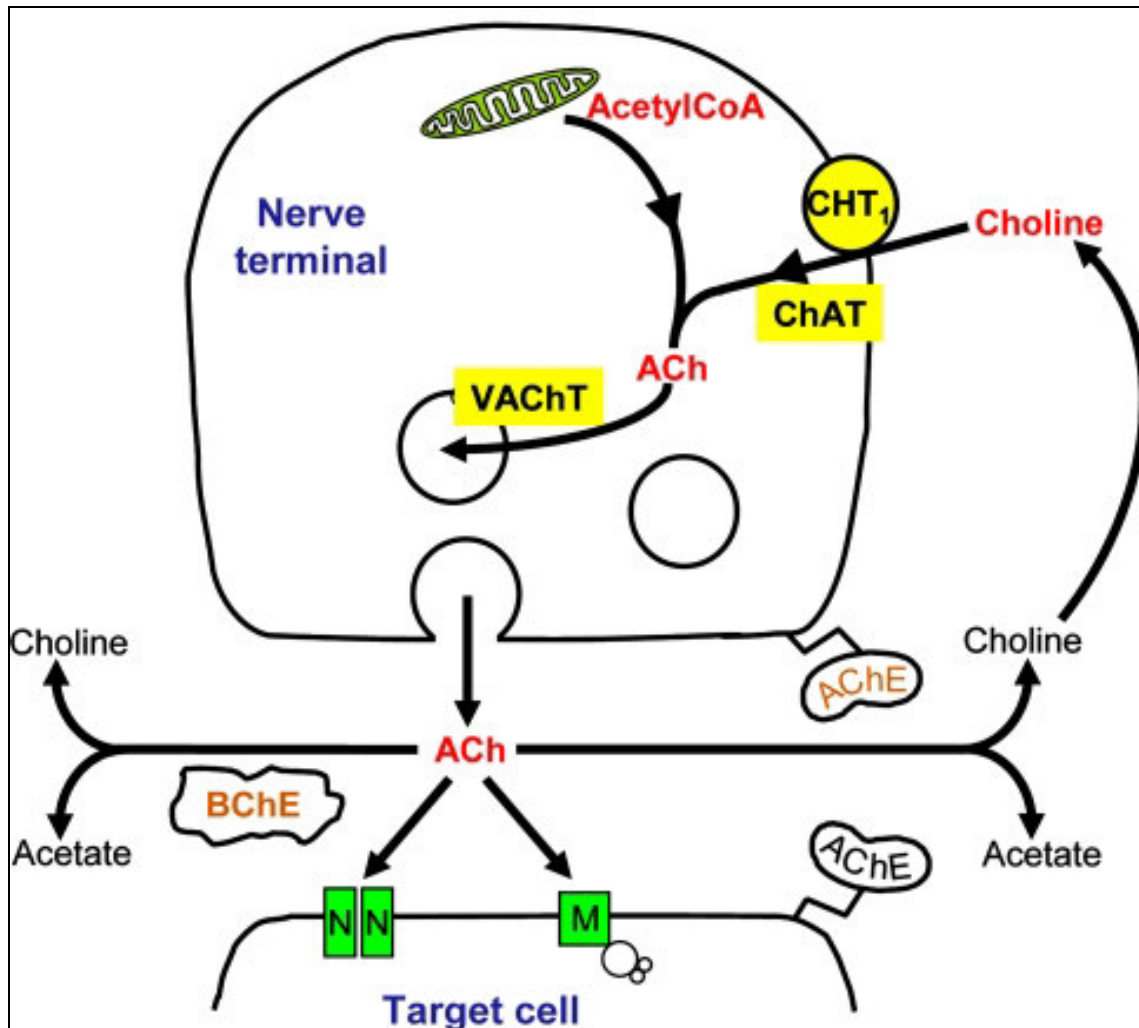


Abbildung 6: Acetylcholin (ACh) -Kreislauf

Synthese des Acetylcholins, Freigabe, Bindung an Rezeptor und der Abbau durch Acetylcholinesterase (AChE) oder durch Butyrylcholinesterase BChE.

ChAT Cholinacetyltransferase, CHT₁ hochaffiner Cholintransporter-1, M muscarinischer AChR (G-Protein gekoppelt), N nikotinischer AChR, VACHT vesikulärer ACh-Transporter. Abbildung aus Kummer et al., 2008.

Postsynapse: Die extrazelluläre Matrix (ECM) des synaptischen Spalts ist in den Membranproteinen der Muskelzelle verankert. Das kollagenhaltige Ende der AChE bindet sich an Perlecan, was sich dann wiederum über α -Dystroglycan an das β -Dystroglycan der Muskelmembran binden kann. Neben diesen bindet α -Dystroglycan die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK, muscle-specific kinase, siehe Abbildung 7). Agrin, „low density lipoprotein receptor-related protein“ 4 (LRP4) und MuSK sind mit dem AChR assoziiert, RAPSyn (receptor-associated protein of the synapse) ist für die Clusterbildung der AChR verantwortlich (Ruff, 2009). Während der embryonalen Entwicklung werden in der zentralen Region der

Muskelfasern AChR-Aggregate durch die Wirkung von Dok-7-aktivierter MuSK, im Zusammenwirken mit LRP4, gebildet. Während der Innervation, des Hineinwachsens von Nervenzellen in die Muskelfaser, stimuliert der an LRP4 gebundene neurotrophe Faktor Agrin die MuSK zur Stabilisation der AChR- Komplexe (Burden et al., 2013). In der Region der sich neubildenden Synapsen werden diese freischwimmenden AChR-Komplexe durch Rapsyn fest mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Ruff 2009). Die Konzentration der AChR in der Postsynapse wird dadurch ca. 1.000- fach gegenüber anderen Muskelzellen erhöht (Lindstrom 2009).

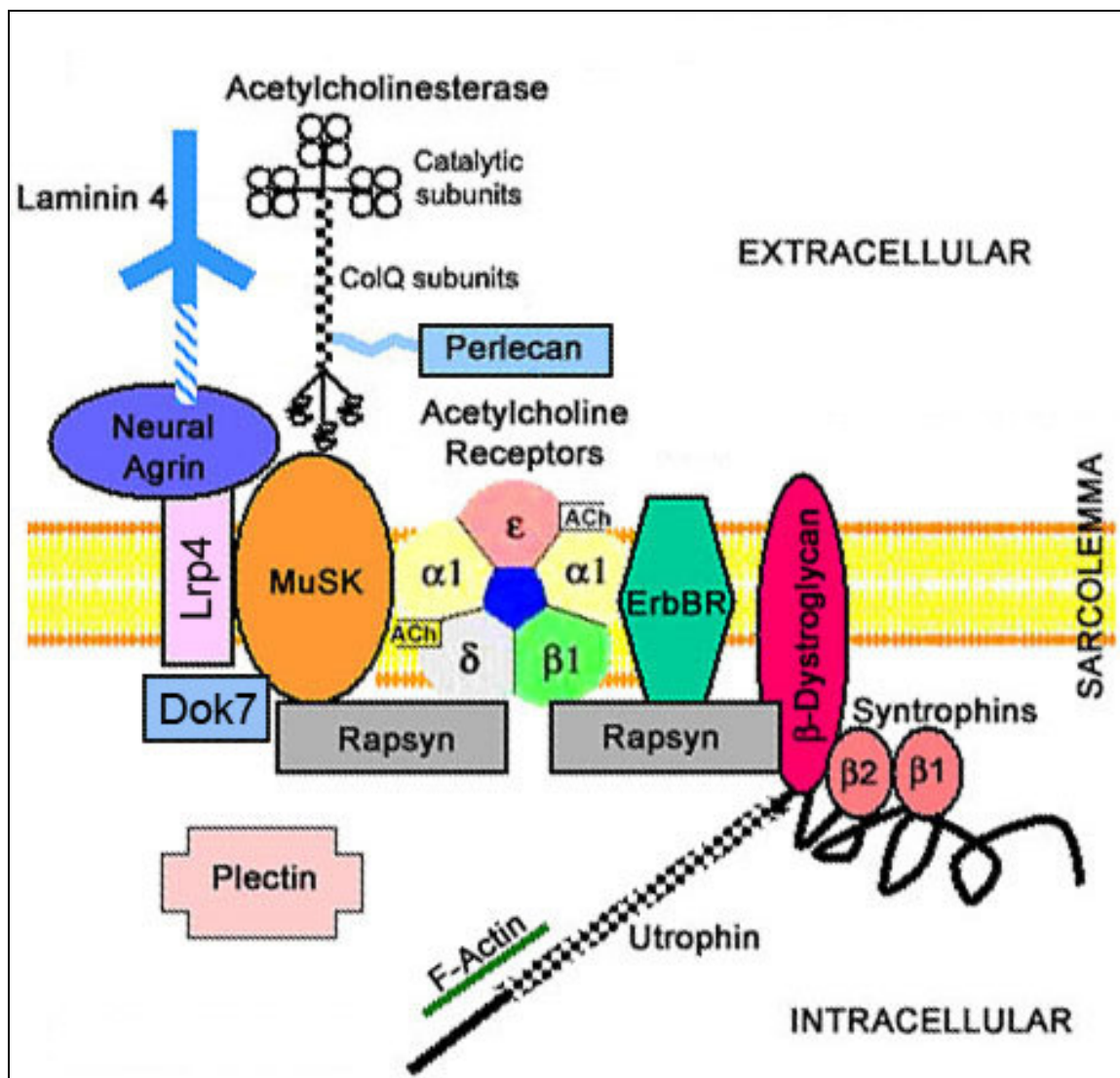


Abbildung 7: Postsynapse der neuromuskulären Verbindung; AChR und assoziierte Proteine. Abbildung vom Neuromuscular Disease Center, Washington University, St. Louis, USA, Society for neuroscience (2003) <http://neuromuscular.wustl.edu/musdist/dag2.htm>

Bei RAPsyn-defizienten transgenen Mäusen wurde keine Clusterbildung von AChR über die Bindung an den Dystroglycan-Utrophin-Komplex festgestellt. Utrophin fungiert intrazellulär als Bindeglied zwischen Aktin-Filamenten und β -Dystroglycan, an das sich wiederum das extrazelluläre α -Dystroglycan bindet (Ruff 2009).

An der Synapse findet ein kontinuierlicher Auf- und Abbau der Rezeptoren statt, die alten Rezeptoren werden abgebaut (nicht zurückgewonnen) und durch neue ersetzt. Die AChR-Halbwertszeit in der frühen Phase der Skelettmuskel-Entwicklung beträgt 13-24h, in der adulten Endplatte 8-11 Tage. Autoantikörper (AAK) gegen den AChR verkürzen diese Halbwertszeit durch die zunehmende Internalisierung des Rezeptors dramatisch (Ruff 2009).

Die Synthese der AChR erfolgt in spezialisierten, mit Synapsen ausgestatteten Muskelzellen und erfordert eine hohe Transkriptionsrate von mRNA für die AChR-Untereinheiten. Die Stimulation erfolgt durch ARIA (AChR-inducing activity, Neuregulin I). ARIA bindet sich an den ErbB-Rezeptor und erhöht die AChR-Expression über den ErbB2/ErbB3-PI3K-MAPK-Signalweg (Kim et al., 2013, Si et al., 1999).

Die postsynaptische Membran weist tiefe Einschnitte (Falten) auf. Die AChR und dazugehörige Cluster-Proteine befinden sich in hoher Konzentration nahe dem synaptischen Spalt, gegenüber den „release sites“, den aktiven Zentren der Präsynapse. Tiefer in den Einfaltungen sind spannungsgesteuerte Natriumkanäle ($\text{Na}_v1.4$) lokalisiert. Durch einen Nervenimpuls plötzlich freigesetztes ACh öffnet in den synaptischen Muskelzellen die AChR, Ionen diffundieren in beide Richtungen und rufen eine lokale Depolarisation hervor, die an tiefere Lagen innerhalb der Falten weitergeleitet und dann durch das Öffnen der spannungsgesteuerten Natriumkanäle verstärkt wird. Dies führt zu einem sich auf die gesamte Muskelfaser ausbreitenden Aktionspotential (compound muscle action potential, CMAP, Serra et al., 2012). Durch den Konzentrationsabfall des Acetylcholins im synaptischen Spalt (ca. nach 1 ms) geht die Depolarisation der Postsynapse dann innerhalb von ca. 6-9 ms auf das Basisniveau zurück (Sine 2012).

Die Effektivität der neuromuskulären Verbindung ist abhängig von einem **Sicherheitsfaktor** (safety factor **SF**), der beschreibt, wie zuverlässig die Ausschüttung von Acetylcholin einen CMAP bewirkt. Eine angemessene Dichte von AChR und Natriumkanälen in der neuromuskulären Verbindung bestimmt die Größe des SF und garantiert die Funktionsfähigkeit der Synapse (Serra et al., 2012). Ebenso ist eine

ausreichende Dichte der VGCC in der Präsynapse für den SF notwendig, da diese Kanäle durch das spannunggesteuerte Öffnen den Ca^{2+} -Einstrom ermöglichen und damit die Exozytose der Vesikel auslösen.

Damit sich die Position der postsynaptischen Strukturen bei Anspannung eines Muskels gegenüber den Endigungen der Axone nicht verschiebt, können sich die extrajunktionale Muskelzellen falten und entfalten, während die Zellen der motorischen Endplatten unelastisch sind. Im Bereich von 80-125% der Ruhelänge einer sich ausdehnenden oder kontrahierenden Muskelfaser ändert sich der SF nicht. So wird sichergestellt, dass auch weiterhin die aktiven Zonen der Präsynapse den Regionen hoher AChR-Packungsdichte auf der Postsynapse gegenüber liegen und ein Signal sicher übertragen wird (Ruff 2009).

1.3 Das Krankheitsbild der Myasthenia gravis

Eine der frühesten Beschreibungen einer Muskelschwäche stammt von dem in Oxford geborenen Arzt Thomas Willis. In seinem 1672 erschienenen Buch "De Anima Brutorum" hat er typische Symptome der Myasthenie bei einer Frau beschrieben (Afifi 2005, Vincent 2002).

Das Hauptsymptom der Myasthenia gravis (MG) ist eine Schwäche der quergestreiften Muskulatur, die unter Belastung zunimmt. Die nachlassende Muskelkontraktion nach indirekten galvanischen Reizungen, die sich nach Ruhephasen erholt, wurde 1895 von Jolly beschrieben (Jolly 1895, Thanvi et al., 2004). Er nannte dieses Krankheitsbild *myasthenia gravis pseudoparalytica*.

Wegen der Ähnlichkeit der Lähmungserscheinungen bei MG mit einer durch das Pfeilgift Curare erzielten Symptomatik behandelte man die Krankheit zuerst mit dem Curare-Antidot Physostigmin, einem Indol-Alkaloid aus dem Samen der Kalabariohne (Walker 1934). Curare besetzt kompetitiv die Bindungsstellen am Acetylcholinrezeptor, ohne ihn zu aktivieren. Das Gegenmittel Physostigmin inhibiert die Acetylcholinesterase im synaptischen Spalt. Damit erhöht sich die Konzentration des ausgeschütteten Acetylcholins und verdrängt Curare von der Bindungsstelle. Die länger anhaltende erhöhte Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt bewirkt auch bei MG-Patienten eine Verbesserung der Symptome. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung von kurz wirkenden Inhibitoren der Acetylcholinesterase für die

Diagnostik (Tensilon-Test) sowie von lang wirkenden Inhibitoren für die Therapie der MG (Vincent 2002). Erst 1936 wurde die Wirkung des Neurotransmitters Acetylcholin in der Synapse erkannt (Dale et al., 1936).

Die **Beteiligung des Thymus** an der Myasthenia gravis wurde bereits 1896 von Hope erkannt, der bei einem MG-Patienten einen Thymustumor erkannte (Otto 2013). In der Folgezeit wurden auch Patienten mit einer Kombination aus MG und einer Thymushyperplasie identifiziert. Veränderungen des Thymus werden bei bis zu 75% der MG-Patienten festgestellt, 85% von diesen in Form einer Hyperplasie und 15% in Form eines Tumors (Thymom), der operativ entfernt werden sollte. Für den Nutzen einer Thymektomie bei Patienten mit MG und Thymus-Hyperplasie gibt es noch keine stichhaltigen Beweise (Gronseth et al., 2000). Eine Verbesserung des Krankheitsverlaufs oder eine Remission tritt zum Teil erst nach einer Latenzzeit von einigen Monaten bis zu mehreren Jahren auf (Thanvi et al., 2004).

Im Thymus von MG-Patienten werden Zellen gefunden, die eine große histologische und morphologische Ähnlichkeit zu quergestreiftem Muskelgewebe aufweisen (Myoidzellen) und AChR auf der Oberfläche exprimieren (Thanvi et al., 2004). MG-Patienten mit Thymom weisen in der indirekten Immunfluoreszenz zu 70% Antikörper gegen die quergestreifte Muskulatur auf (Stöcker 2013).

Heute weiß man, dass es sich bei der MG um eine Autoimmunerkrankung handelt (Engel et al., 1977) und diese Muskelschwäche kann mit anderen Autoimmunkrankheiten assoziiert sein, besonders wenn der Thymus beteiligt ist. Häufig wurden in MG-Patienten Autoantikörper gegen Antigene der Schilddrüse (Thyreoglobulin 5-26%, Thyreoperoxidase 19%, TSH-Rezeptoren 7%) gefunden (Vrolix et al., 2010). Bei 13% aller Patienten wurde eine manifeste Schilddrüsenerkrankung (Hyperthyreose, Hypothyreose, Struma) festgestellt (Ossermann et al., 1971). Es wurden bei MG überzufällig häufig auch AAK gegen Cardiolipin (Anti-Phospholipid-Syndrom 20-40%) oder Zellkerne (Systemischer Lupus Erythematoses SLE 6-60%) gefunden (Vrolix et al., 2010).

MG ist oftmals auch mit einer atrophischen Gastritis assoziiert. Hierbei liegen AAK gegen Parietalzellen und „intrinsic factor“ sowie eine Vitamin-B12-Mangel-Anämie vor (Agius et al., 2009).

In einer Pilotstudie wurde die Plasmakonzentration des 25-Hydroxy-Vitamin D bei MG-Patienten erniedrigt gegenüber einer alters- und geschlechtsspezifisch angepassten Kontrollgruppe gefunden (51 ± 19 vs. 69 ± 21 nmol/l). Eine Vitamin-D₃-Supplementation ergab eine Verbesserung der Symptome und der klinischen Klassifizierung (MG fatigue Score; Askmark et al., 2012).

Ätiologie: Aufgrund der Assoziation mit anderen autoimmunen Erkrankungen und durch den Transfer einer transienten MG auf den Fötus (was eine Antikörpervermittelte Erkrankung nahelegt) wurde vermutet, dass die Ursache der MG in einem autoimmunen Prozess zu suchen ist, der gegen Proteine der neuromuskulären Endplatte gerichtet ist (Simpson 1960). Nachdem mit Hilfe von Schlangentoxin (α -Bungarotoxin) nAChR aus dem elektrischen Organ (Elektroplax) des Zitteraals (*Electrophorus electricus*) affinitätschromatographisch gereinigt werden konnten (Cuatrecasas 1971), zeigten mit gereinigtem Zitteraal-AChR immunisierte Hasen die typischen Zeichen einer Muskelblockade, die sich durch Gabe von Acetylcholinesterase-Inhibitoren besserten (Patrick et al., 1973). Diese experimentelle autoimmune MG (EAMG) konnte mit Serum auf gesunde Tiere übertragen werden, was eine durch Ak verursachte Wirkungsweise unterstrich. Später wurden in einem Radioimmunoassay Ak gegen AChR bei 87% der Seren von MG-Patienten gefunden (Lindstrom et al., 1976). Als weiterer Beweis für die autoimmune Ursache konnten durch immunzytologische und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen die Kollokalisierung von Immunglobulinen und Komplement mit AChR an den Endplatten von MG-Patienten nachgewiesen werden (Engel et al., 1977). Die Muskulatur weist auch bei MG im Vergleich zu Normalpersonen eine geringere Dichte der synaptischen AChR auf (Fambrough et al., 1973).

Die autoimmune Attacke ist primär gegen den AChR gerichtet, andere Proteine der neuromuskulären Verbindung sind seltener betroffen. Es wurden andere assoziierte AAK bei Myasthenie gefunden, wie gegen muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) und gegen „voltage gated calcium channels“ (VGCC). Der Verlust von AChR und Natriumkanälen im synaptischen Spalt durch die Wirkung der Ak bewirkt eine Reduktion von jeweils 59% und 40% des „Sicherheitsfaktors“ und hat einen Signalübertragungsfehler in der Synapse zur Folge (Serra et al., 2012). Die Attacke ist B- und T-Zell-vermittelt und führt zu einer morphologischen postsynaptischen Veränderung der motorischen Endplatte und zu den typischen Symptomen der Muskelschwäche (Rostedt 2011).

Als ein Sonderfall der MG ist die **transiente neonatale Myasthenie** anzusehen, die als Folge des passiven Transfers mütterlicher Anti-AChR-Ak auf den Fötus entsteht. Eines von zwölf Neugeborenen aller an Myasthenie leidenden Mütter ist betroffen.

Die Symptome der Neugeborenen klingen innerhalb weniger Wochen ab, mit einem erhöhten Krankheitsrisiko im späteren Leben ist nicht zu rechnen.

Auch beim Stillen werden Autoantikörper mit der Muttermilch übertragen. Die Konzentration der AAK in der Milch ist besonders in den ersten Tagen nach der Geburt hoch und geht bald auf nicht messbare Titer zurück. In den extrem seltenen Fällen der AAK-vermittelten Variante der Arthrogryposis multiplex congenita führen mütterliche AAK gegen die fötale γ -Untereinheit des AChR zu intrauteriner Hypomobilität des Fötus, zu multipler Gelenkversteifung und oft zu Abort oder Totgeburt (Diener et al., 2012).

Eine **Muskelschwäche** kann auch **durch Medikamente induziert** werden – Penicillamin, Curare, Aminoglykoside, Chinin, Procainimid und Calciumkanal-blocker. Die Symptome verschwinden nach dem Absetzen der Substanzen (Thanvi et al., 2004). Auch **genetisch bedingte Erscheinungsformen der MG** (congenital myasthenic syndrome CMS) sind bekannt, aber sehr selten. Die Prävalenz wurde in England auf 5 pro 1 Million Personen geschätzt. Sie betreffen Mutationen in den Genen für die AChR-Untereinheiten, die Acetylcholintransferase, den spannungsabhängigen Natriumkanal, RAPSyn, MuSK und Dok-7. Bei der erblichen Form der Myasthenia gravis (ca. 5-10% aller MG-Fälle) werden keine AAK gefunden und die Patienten sprechen nicht auf eine immunsuppressive Therapie an (Beeson 2009).

Das **klinische Kennzeichen der MG** ist eine schmerzlose, ermüdende Schwächung, vor allem der proximalen Muskelgruppen des Halses, des Gesichts, der Schultern, der Arme und Beine und in wenigen Fällen der Atemmuskulatur. Die Ausprägung der Muskelschwäche kann täglich schwanken, jedoch verstärkt sie sich in der Regel nach körperlicher Aktivität und verbessert sich mit der Ruhe. Die MG verläuft variabel, in den meisten Fällen aber chronisch, und erfordert lebenslange immunsuppressive Medikation. Bei vielen Patienten verschlechtern sich die Symptome zeitweise, etwa durch emotionalen Stress, durch eine Hochregulation des Immunsystems aufgrund viraler oder bakterieller Infektionen oder durch unterschiedliche Medikamente, einschließlich bestimmter Antibiotika (Rostedt 2011).

Die Krankheit beginnt bei 85% der Patienten mit okulären Symptomen: Ptosis und Diplopie (**okuläre MG**). Innerhalb von 2 Jahren entwickeln 50% dieser Patienten die

generalisierte Form, die alle Muskelgruppen umfasst. Eine Muskelbeteiligung der Kau- und Kiefermuskulatur im Laufe der Erkrankung kann in 60% der MG-Patienten beobachtet werden, erkennbar durch Schluckbeschwerden und einer Erschöpfung beim Kauen. Weiterhin entstehen Probleme beim Artikulieren und einer Zunahme der Nasalität, einer starken Beteiligung des Nasenraumes bei der Bildung von Lauten. Sind die Gesichtsmuskeln betroffen, wird die Mimik ausdruckslos. Letztendlich können auch die Skelettmuskulatur (Arme stärker betroffen als Beine) und die Atemfunktion betroffen sein. 39% der MG-Patienten entwickeln im Laufe der Jahre eine schwere Muskelschwäche mit Schluckbeschwerden, unterdrücktem Hustenreiz und verringertem Atemvolumen (Jayam-Trouth et al., 2012). Bei einer starken Ausprägung besteht die Gefahr myasthener Krisen mit lebensgefährlichen Schluck- oder Atemstörungen, die eine intensivmedizinische Betreuung erfordern (Buettner 2003).

Die Myasthenia gravis kann entsprechend dem Profil der Autoantikörper (AChR, MuSK, LRP4), dem Ort der Wirkung (okulär, generalisiert), dem Alter des Einsetzens erster Symptome (early oder late onset) und einer Beteiligung des Thymus (paraneoplastisch) klassifiziert werden. Weitere Einteilungen charakterisieren die MG nach dem Schweregrad der Erkrankung (siehe Tabelle 1) oder der Assoziation mit anderen Immunerkrankungen (Hyperthyreose, Hashimoto- Thyreoiditis; Berrih-Aknin et al., 2014).

Klasse I	Rein okuläre Myasthenie, beschränkt auf äußere Augenmuskeln und Lidschluss
Klasse II	Leicht- bis mäßiggradige generalisierte Myasthenie mit Einbeziehung anderer Muskelgruppen, oft einschließlich der Augenmuskeln
Klasse III	Mäßiggradige generalisierte Myasthenie, oft einschließlich der Augenmuskeln
Klasse IV	Schwere generalisierte Myasthenie
Klasse V	Intubationsbedürftigkeit mit und ohne Beatmung
Die Klassen II bis IV lassen sich in 2 Subgruppen unterteilen	
A	Betonung der Extremitäten und/oder Gliedergürtel, geringe Beteiligung oropharyngealer Muskelgruppen
B	Besondere Beteiligung oropharyngealer Muskelgruppen und/oder der Atemmuskulatur, geringere oder gleichstarke Beteiligung der Extremitäten oder rumpfnahen Muskelgruppen

Tabelle 1: Klinische Klassifikation von MG-Patienten nach Schweregrad der Erkrankung. Gemäß der Myasthenia gravis Foundation of America (modifizierte MGFA-Klassifikation 2000) und den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2012 (Diener et al., 2012).

Die **Prävalenz** der Myasthenia gravis ist gering. In einer Sichtung von 44 epidemiologischen Studien vorwiegend aus Europa (Carr et al., 2010) im Zeitraum 1950-2007 wurde ein Wert von 78 Kranken (Konfidenzintervall des Mittelwertes 64-94; beobachteter Bereich 15-179) pro 1 Million ermittelt. Innerhalb dieser Zeit hat die Prävalenz mit einem linearen Trend leicht zugenommen, was aber vorwiegend durch die sich verbessernde Diagnostik der MG und die zunehmende Lebenserwartung von MG-Patienten begründet wird (Phillips et al., 1996).

Die **Inzidenz** wurde in „High-Quality-Studien“ ab 1987 zu einem Wert von 9,4 Neuerkranken pro eine Million Personen und pro Jahr (Konfidenzintervall 7,7-11,4; beobachteter Bereich 7,4-14,7) berechnet (Carr 2010). Die MG kann in jedem Alter auftreten. Die alters- und geschlechtsspezifischen Inzidenzraten zeigten aber einen Anstieg für beide Geschlechter im Alter von 60-80 Jahren (bei den Männern stärker) und einen Anstieg bei den Frauen in der dritten Lebensdekade (20-29 Jahre) an (Carr et al., 2010).

Die **Mortalitätsrate** liegt bei 0,43 (Konfidenzintervall 0,34-0,55, beobachteter Bereich 0,06-0,89, 8 Studien) pro 1 Million Personen und Jahr (Carr et al., 2010).

1.4 Diagnostik der Myasthenia gravis

Die Diagnose der MG beruht auf der Anamnese und dem klinischen Bild, dem Test auf Wirksamkeit von Acetylcholinesterase (AChE)-Inhibitoren, der Detektion spezifischer AAK und einer signifikanten Abnahme der elektrischen Signale nach mehrfacher Reizung bei einer elektrophysiologischen Untersuchung (Berrih-Aknin et al., 2014). Für die Erstdiagnose werden zunächst die MG-Symptome erfasst und das Ausmaß der Beeinträchtigung anhand eines semiquantitativen Beurteilungsbogens (Buettner 2003, siehe Tabelle 2) abgeschätzt.

Bei der okulären MG werden die Verbesserung des Lidhebers vor und nach Behandlung durch Eis, Ruhe (30 Minuten Entspannung bzw. Schlaf) oder **Tensilon** (Wirksubstanz Edrophonium) geprüft (Buettner 2003, Daroff et al., 2009). Eine Herabsetzung der Temperatur im Augenbereich bewirkt eine Verringerung der Muskelblockade. Edrophonium, ein kurz wirkender Acetylcholinesterase-Inhibitor, führt ebenfalls zu einer messbaren Aufhebung der Muskelblockade. Dieser Test kann auch an anderen

Skelettmuskeln durchgeführt werden, besonders an solchen, die starke Ermüdungserscheinungen zeigen.

Die elektrophysiologischen Tests umfassen repetitive Nervenstimulationen (RNS) und die Einzelfaser-Elektromyographie (single fibre electromyography SFEMG).

Testelement Punkte	Normal 0	leicht 1	mittel 2	schwer 3
1. Arme vorhalten 90° (Sekunden s)	>180	>60–180	10–60	<10
2. Beine gestreckt, liegend 45° (s)	>45	>30–45	5–30	<5
3. Kopf liegend 45° angehoben (s)	>90	>30–90	5–30	<5
4. Vitalkapazität (Liter) Männer Frauen	>4,0 >3,0	>2,5–4,0 >2,0–3,0	1,5–2,5 1,2–2,0	<1,5 <1,2
5. Kauen / Schlucken	normal	Erschöpfung beim Kauen fester Speisen	nur weiche Speisen möglich	Magenschlauch
6. Gesichtsmuskulatur	normal	leichte Schwäche beim Lidschluss	Lidschluss unvollständig	keine Mimik
7. Doppeltsehen beim Seitwärtsblick (nach s)	>60	>10–60	>0–10	spontane Fehlstellung
8. Ptosis beim Aufwärtsblick (nach s)	>60	>10–60	>0–10	spontane Ptosis

Tabelle 2: Abschätzung der Muskelbeeinträchtigung.
Modifizierter Besinger-Score (klinischer Score für Myasthenia gravis).
Maximale Punktzahl 24. (Buettner 2003)

Beim **Repetitiven Nerven-Stimulationstest (RNS)** werden durch elektrische Impulse (3 Hz) präsynaptisch ausgelöste Muskelaktionspotenziale gemessen. Bei normalen Probanden ist die vierte evozierte Aktion geringfügig kleiner als die erste, die Reduktion beträgt nicht mehr als 7%. Verringert sich die Amplitude um mehr als 10%, wird der Test als positiv bezeichnet (dekrementale Antwort; Thanvi et al., 2004).

Bei der **Einzelfaser-Elektromyographie (SFEMG)** werden die Aktionspotentiale eng benachbarter Fasern eines Muskels mit einer feinen Nadel erfasst. Die Reizung des Muskels verläuft nicht in allen Fasern völlig synchron, bei gesunden Personen beträgt der Gangunterschied der Signale (englisch: jitter) zwischen zwei Muskelfasern nicht mehr als 55 Mikrosekunden (μ s), bei Myasthenia gravis dagegen üblicherweise über

100 μ s. Dies ist auf die außergewöhnlich niedrigen und bei Wiederholung absteigenden Endplatten-Potentiale (EPP) zurückzuführen. Bei MG ist die Amplitude des EPP erniedrigt und die Aktionsschwelle wird später erreicht. Dies führt zu einer Desynchronisation der Aktionspotentiale der verschiedenen Fasern. Auch reichen einige der nur schwachen Impulse nicht aus, Muskel-aktionspotentiale in einer oder mehreren Fasern zu generieren (Impulsblockade).

Neben der notwendigen kostenträchtigen Ausrüstung der Elektromyographie und der geschulten und erfahrenen Verwendung des Geräts hat die Methode auch eine andere Limitierung: Positive Ergebnisse treten bei allen Personen mit reduziertem Sicherheitsfaktor (SF) der neuromuskulären Synapse auf, zum Beispiel bei Patienten mit peripheren Neuropathien und Kinderlähmung (Poliomyelitis und Postpolio-Syndrom; Thanvi et al., 2004).

Serologische Tests zur Diagnostik der MG: Der pathogene Einfluss der Anti-AChR-AAk auf die neuromuskuläre Übertragung hat die drei entsprechenden Mechanismen: 1. Bindung des Antikörpers mit Aktivierung des Komplements und Lyse der Zelle, 2. Funktionsblockade des AChR und 3. beschleunigter Abbau des AChR durch Internalisierung (Conti-Fine et al., 2006). Nach diesen Prinzipien richten sich auch die **serologischen Tests** zur Erfassung der MG-assoziierten AAK gegen Acetylcholinrezeptoren: Die meisten Tests messen die Bindung der Ak an den gesamten Acetylcholinrezeptor-Komplex. Das Antigen wird aus humanem Muskelgewebe, aus kultivierten Rhabdomyosarkomzellen (TE671) oder aus transfizierten HEK-293-Zellen extrahiert. Einige Tests erfassen nur die Blockade der Acetylcholin-Bindungsstelle durch die Ak, andere das Ausmaß der Rezeptor-Internalisierung (Messung **bindender, blockierender und modulierender Anti-AChR-Autoantikörper**).

Bis in die 1970er Jahre war die Messung der Autoantikörper gegen die quergestreifte Muskulatur durch indirekte Immunfluoreszenz der einzige serologische Test für MG, vornehmlich für Thymom-involvierte MG. Dies änderte sich mit dem Aufkommen eines Radioimmunpräzipitationsassays für **AChR-bindende Ak** (Messprinzip siehe 2.6 Referenzmethode Radioimmunassay), der aufgrund der Erkenntnis, dass diese Ak direkt pathogen waren, rasch an Bedeutung gewann. Die sich bindenden Anti-AChR-Ak richten sich vorwiegend gegen die „main immunogenic region“ (MIR) und gehören überwiegend den Immunglobulin-Subklassen IgG1 oder IgG3 an, sie weisen überwiegend hohe Affinitäten (Dissoziationskonstante von 10^{-10} M) auf (Vincent et al., 1985).

Die Ak sind heterogen in ihrer Reaktivität mit den verschiedenen Untereinheiten der adulten und fötalen AChR. Sie erkennen klar die native Konformation und nicht isolierte Peptide oder rekombinante Fragmente. Derzeit basiert der Routinenachweis der Serum-Anti-AChR-Ak überwiegend auf Jod¹²⁵-Bungarotoxin-markierten AChR, mit gleichen Anteilen von fötalen und adulten Rezeptoren (Leite et al., 2010). Der RIA gilt als diagnostischer „Goldstandard“, die Anti-AChR-Ak sind in 80%-85% der Patienten mit generalisierter Myasthenia gravis und in 50%-60% der Fälle von okulärer Myasthenia gravis zu finden (Thanvi et al., 2004). Dieser Test ist hochspezifisch für Myasthenia gravis, AChR-bindende Ak treten aber auch bei Patienten mit Thymom ohne Myasthenie auf. Weiterhin sind vereinzelte Fälle von Patientinnen bekannt, bei denen sich wahrscheinlich während der Schwangerschaft Ak gegen den fötalen AChR entwickelten (Leite et al., 2010). Da die AChR im Erwachsenenalter nur noch adulte Rezeptoren in den Muskeln aufweisen, bilden diese Frauen keine MG aus. Dagegen enthält der Thymus des Erwachsenen nach wie vor auch fötale Rezeptoren (Lindstrom 2009, Vincent 2002).

In einer Studie wurden 120 Patienten aufgrund einer Kombination ihres klinischen Bildes und der Reaktion auf kurz wirkende AChE-Inhibitoren (Edrophonium und Neostigmin) als MG-positiv diagnostiziert und mit drei weiteren Methoden untersucht: Serum-Anti-AChR-Ak-Test, repetitive Nervenstimulation (RNS) und Elektromyographie-Test (SFEMG). Bei 73% dieser Patienten wurden Anti-AChR-Ak gefunden. Mit dem RNS-Test distaler Muskeln erhöhte sich die Sensitivität auf 87%, mit dem zusätzlichen RNS-Test proximaler Muskeln auf 91%. Mit der Ergänzung durch zusätzliche SFEMG-positive Patienten konnten alle 120 MG-Patienten erkannt werden. Eine Bewertung der Spezifität des Tests auf Ak gegen AChR zu treffen ist bei diesem gemischten Kollektiv von Patienten mit okulärer und generalisierter MG schwierig, da auch Ak gegen andere Antigene (VGCC, MuSK) für die Erkrankung verantwortlich sein können. Jedoch zeigt die Arbeit, dass die Bestimmung der Ak gegen AChR allein nicht ausreichend ist (Oh et al., 1992).

Die Anti-AChR-Ak-Bestimmung ist wertvoll für die Verlaufskontrolle. Der Antikörperspiegel korreliert nicht immer mit dem klinischen Status verschiedener Individuen. Patienten mit milder Erkrankung können hohe Antikörperkonzentrationen aufweisen und Patienten mit schwerer Krankheit niedrige Antikörpertiter. Jedoch wird innerhalb eines Individuums eine gute Korrelation mit den Veränderungen des klinischen Zustandes deutlich. Kurzfristig, insbesondere nach Plasmaaustausch oder

nach Immuntherapie, und längerfristig bei der Thymektomie (Leite et al., 2010) sinkt die Konzentration ab.

Insbesondere in der Altersgruppe über 50 Jahre hilft der Anti-AChR-Ak-Test bei der Unterscheidung der MG von anderen Erkrankungen mit manchmal ähnlicher Symptomatik, wie amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder Schlaganfall (Leite et al., 2010). Das mittlere Erkrankungsalter für ALS liegt zwischen 50 und 70 Jahren.

Blockierende Anti-AChR-Antikörper binden sich an die $\alpha 1$ -Untereinheiten der Rezeptoren und inhibieren die Wechselwirkung von ACh mit dem AChR. Die Rezeptoren öffnen sich nicht mehr trotz ausreichender ACh-Konzentration. In eigenen Messungen mit einem Assay zur Bestimmung blockierender Ak wurden in 55 bis 60% der rund 100 Seren mit AChR-bindenden-Ak auch blockierende Ak gefunden.

Diese Antikörper treten in der Regel in Assoziation mit AChR-bindenden Antikörpern auf und haben eine höhere Prävalenz in der generalisierten MG gegenüber der rein okulären MG. Eine Korrelation zwischen dem Grad der AChR- Blockade und der Schwere der generalisierten Muskelschwäche wurde beobachtet (Howard et al., 1987). Der diagnostische Test auf blockierende Anti-AChR-Ak ist nur von begrenztem Wert, da sie nur sehr selten in Abwesenheit von AChR-bindenden Antikörpern vorliegen (Meriggioli et al., 2012). Dieser Test wird vorwiegend in den USA als Routineuntersuchung eingesetzt und wird in Europa nur zu Forschungszwecken verwendet.

Modulierende Anti-AChR-Antikörper beschleunigen die AChR-Internalisierung durch die Vernetzung benachbarter Rezeptoren (Antigen-Modulation). Unter Internalisierung versteht man den Rückzug (Translokation) von membran-gebundenen Rezeptoren und ähnlichen Strukturen (Transporter, Kanäle) von der Zelloberfläche in das Zellinnere. Die AChR werden anschließend in Lysosomen abgebaut (Sher et al., 1987).

Im Test auf modulierende Ak wurden AChR auf der Oberfläche von in Zellkultur gehaltenen fötalen Myotuben mit I^{125} - α -Bungarotoxin radioaktiv markiert. Myotuben sind unreife Skelettmuskelfasern, die während einer frühen Entwicklungsstufe durch die Fusion von Myoblasten gebildet werden. Nach Inkubation des Patientenserums mit den Zellen (16h bei 37°C) wurde die durch Internalisierung freigesetzte Menge an Radioaktivität im Überstand gemessen. Die gemessene Radioaktivität ist proportional

zur Internalisierung und zum Ak-Titer. Patienten mit generalisierter MG hatten im Durchschnitt höhere Titer und eine größere Häufigkeit positiver Ergebnisse als Patienten in Remission oder mit einer Schwäche der Augenmuskulatur (okuläre MG). Die serologischen Befunde bei den letzten beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (Howard et al., 1987). Der Assay unterscheidet die modulierenden Ak nicht von den blockierenden Ak, die das I^{125} - α -Bungarotoxin ohne Internalisierung aus dem AChR freisetzen (Meriggioli et al., 2012).

Bei einer Studie mit 49 MG-Patienten unter Verwendung eines Säugetier-Skelettmuskel-Gewebekultursystems (Rhabdomyosarkom-Zelllinie) war der Abbau von AChR und die relative Zunahme der Abbaugeschwindigkeit eng mit dem klinischen Zustand korreliert (Lyons et al., 1998).

In einem Bio-Assay mit humanen Muskelzellen in Monolayer-Kultur haben die modulierenden Ak von 93 der 126 AChR-bindenden Ak-positiven Seren zu einem über 90% igen Abbau der AChR geführt. 125 der 126 MG-Patienten waren im Test auf modulierende Ak positiv, allerdings auch 13 von 75 (17%) Patienten mit Thymom ohne diagnostizierte MG. Hohe Konzentrationen von modulierenden Anti-AChR Antikörpern wurden in MG-Patienten mit Thymom gefunden und häufig in Patienten mit Ak gegen den quergestreiften Muskel (Vernino et al., 2004).

Generell ist der Assay auf die sich bindenden AChR-Ak der nützlichste serologische Test, da die Bestimmung der modulierenden oder besonders der blockierenden Anti-AChR-Ak relativ wenig zur diagnostischen Sensitivität beiträgt (Meriggioli et al., 2012).

Antikörper gegen die **Muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK)**, ein Membranprotein mit drei immunglobulinähnlichen extrazellulären Domänen, wurden in einer Untergruppe der MG-Patienten ohne Ak gegen den AChR gefunden und waren zunächst in einem ELISA mit MuSK aus Zelllinien bestimmt worden. Ein Assay unter Verwendung von I^{125} -markierter rekombinanter MuSK wurde anschließend entwickelt und zeigte eine gute Sensitivität und Spezifität. Die in den Patienten gefundenen Ak gegen MuSK sind von hoher Affinität (Dissoziationskonstante um 100 pmol/l) und bestehen überwiegend aus **IgG4**. Sie binden sich vor allem an die erste und zweite extrazelluläre Domäne (Leite et al., 2010). An den Synapsen von Anti-MuSK-positiven MG-Patienten wird nur wenig Komplement abgelagert, im Gegensatz zu den Komplement-aktivierenden IgG1- und IgG3-Antikörpern der Anti-AChR-Ak-positiven MG-Patienten. Ein weiterer Unterschied zwischen Anti-MuSK- und Anti-AChR-Ak-

positiven Patienten ist das häufig schlechte Ansprechen der Anti-MuSK-positiven MG-Patienten auf Acetylcholinesterase-Hemmer, sogar eine Verschlechterung der Symptome kann auftreten. Anti-MuSK-positive MG-Patienten können auch relativ resistent sein gegen die herkömmliche Immuntherapie. Die Behandlung mit intravenösem Immunglobulin neigt dazu, weniger effektiv zu sein (Farrugia et al., 2010). Mit der weltweiten Verfügbarkeit der MuSK-Antikörpertests wurde deutlich, dass die Anti-MuSK-positive MG in jedem Alter auftreten kann und der Anteil von Frauen an den Patienten überwiegt. Es wurde eine vom Breitengrad abhängige Verteilung der Erkrankung gefunden. Während die höchste Frequenz in mediterranen Ländern (30-50° nördlicher Breite) sowie in Ländern ähnlicher Breite in Nordamerika und Asien festgestellt wurde, trat diese Form der Erkrankung mit einer geringeren Frequenz in nördlicheren Staaten auf (Leite et al., 2010). Daher wurde in den Studien aus verschiedenen geografischen Regionen, die sich aber auch methodisch unterschieden, ein sehr variabler Anteil von 0-60% der Anti-MuSK-Ak-positiven Proben an seronegativen MG-Patienten (SNMG) Patienten gefunden (Cossins et al., 2012). Die große Mehrheit der MuSK-MG-Patienten hat eine generalisierte MG ohne Thymus-Beteiligung. Eine starke Assoziation mit den Genen für die Leukozytenantigene HLA-DR14, -DQ5 wurde festgestellt. Bei diesen Patienten wurden in der Regel keine anderen AAK oder anderen Autoimmunerkrankungen festgestellt (Leite et al., 2010).

LRP4 (low density lipoprotein receptor-related protein 4) ist ein Endplatten-Protein, das zusammen mit MuSK als Agrinrezeptor fungiert und für die Bildung von AChR-Clustern und der normalen Ausbildung der Postsynapse erforderlich ist. Ak gegen LRP4 wurden im Serum von 9,2% doppelt seronegativen MG-Patienten (120 Patienten, AChR- und MuSK-negativ) gemessen, aber nicht in 61 Anti-AChR-Ak-positiven Patienten. Diese Ak schienen MG-spezifisch zu sein, da sie nur selten (2 von 76, 2,6%) in Patienten mit anderen neurologischen oder psychischen Erkrankungen gefunden wurden (Zhang et al., 2012).

Bei japanischen SNMG-Patienten wurden lediglich 2% der Seren positiv auf LRP4-Ak gefunden, vorwiegend IgG1, das Komplement aktiviert (Higuchi 2011). In einer in Süddeutschland durchgeführten Studie mit Patienten aus der Region wurde ein Immunfluoreszenztest mit fixierten LRP4-exprimierenden HEK293-Zellen verwendet. Es wurden 50% der 38 doppelt seronegativen MG-Proben positiv auf LRP4 getestet (Pevzner et al., 2011).

Die hohe Bandbreite der prozentualen Ergebnisse (2-50%) ist bemerkenswert, mag aber neben den verschiedenartigen Methoden auch an regionalen Unterschieden der untersuchten Kollektive liegen.

In einer neueren LRP4-Studie mit 800 MG-Patienten aus 10 Ländern (9 Länder in Europa und Israel) wurde ein mittlerer Anteil der LRP4-positiven Proben an 635 SNMG- (Anti-Musk- und Anti-AChR-Ak-negativen) Patienten von 18,7% (Bereich 7,0% Norwegen - 32,7% Polen) ermittelt. Mit dem verwendeten zellbasierten Immunfluoreszenz-Test, mit LRP4-exprimierenden HEK-293-Zellen, wurden auch in 7,5% der Anti-AChR-Ak-positiven MG- und in 14,9% der Anti-Musk-Ak-positiven MG-Proben Anti-LRP4-Ak detektiert. Der Anteil an einem gesunden Kollektiv war 0% und 3,6% in einer Kontrollgruppe mit anderen neuroimmunologischen Erkrankungen, vorwiegend Patienten mit multipler Sklerose (Zisimopoulou et al., 2014).

Anti-LRP4-Ak können die Agrin-Signalwege verändern und haben einen negativen Effekt auf die Agrin-LRP4-Wechselwirkung und die AChR-Clusterbildung. Der Mechanismus für die potentielle Pathogenität von LRP4-Antikörpern muss weiter untersucht werden (Meriggioli et al., 2012).

Nach den verfügbaren veröffentlichten Untersuchungen haben etwa 7-8% der MG-Patienten weder gegen AChR noch gegen MuSK gerichtete Ak (**seronegative MG-Patienten, SNMG**, Meriggioli et al., 2012). Diese Patientengruppe reagiert auf immunsuppressive Behandlung und Plasmaaustausch in ähnlicher Weise wie Patienten mit positivem serologischen Befund und hat ebenso häufig Thymusveränderungen. In einer Studie wurden nicht fixierte rekombinante Zellen (HEK-293-Zellen ko-transfiziert mit AChR-Untereinheiten und dem Clusterprotein RAPSyn) mit SNMG-Patientenserum inkubiert und die an der Oberfläche gebundenen Ak wurden über Immunfluoreszenz nachgewiesen. Es wurden Anti-AChR-Ak in 66% (25/38) der Fälle gefunden, die Ak waren zur Komplementaktivierung fähig (IgG1). Die niedrig affinen Antiseren benötigen anscheinend die hohe Dichte der AChR in den Clustern auf der Oberfläche der Zellen, um nachweisbar zu sein. Eventuell müssen sich die schwachen IgG bivalent (mit beiden Bindungsregionen) an zwei AChR binden können (Leite et al., 2008). Dieser Test hat noch keinen Zugang zur Routinediagnostik gefunden, die Produktion der Zellen ist arbeitsaufwendig und die Verwendung von lebenden Zellen erschwert den kommerziellen Vertrieb.

Hitzeschockproteine (HSP) sind hochkonservierte intrazelluläre Proteine, die als sogenannte Chaperone während der intrazellulären Faltung und Translokation von Proteinen helfen und damit Proteinfehlfaltung und Aggregation verhindern. Sie spielen eine Rolle bei der Antigen-Präsentation zur Erzeugung einer immunologischen Antwort und induzieren proinflammatorische Zytokine. Die Expression der HSP ist erhöht, wenn die Zellen starker Hitze, Strahlung, hohen Konzentrationen von Entzündungsmediatoren oder anderen Formen von physiologischem Stress ausgesetzt sind (Helgeland et al., 2010). AAK gegen HSP sind in bis zu 80% der MG-Patienten zu finden. Die Anti-HSP-Ak-Titer korrelieren nicht mit Anti-AChR-Ak-Titern oder Dauer der Erkrankungen, sie spiegeln aber sowohl den klinischen Verlauf als auch die Wirksamkeit der Behandlungen wieder. Die Ak sind nicht spezifisch für MG. Sie wurden auch in Patienten mit mehreren anderen Autoimmunerkrankungen, wie SLE, Multipler Sklerose und rheumatoider Arthritis und sogar in etwa 5% der Kontrollproben gesunder Spender gefunden. Dies zeigt keine direkte Rolle der Anti-HSP-Ak in der Pathogenese von MG an, eher eine allgemeine Fehlfunktion des Immunsystems (Vrolix et al., 2010).

Durch die Inhibition des HSP90 mit 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) in mit Typ-VII-Kollagen immunisierten Mäusen (experimentelle autoimmune Epidermolysis bullosa acquisita, eine blasenbildende Autoimmunerkrankung) konnte der Antikörpertiter deutlich gesenkt werden. In diesen Versuchstieren war die Erkrankung weniger stark entwickelt als in Mäusen, bei denen 17-DMAG nicht angewendet wurde. Die Inhibition von HSP90 moduliert die humorale Immunreaktionen auf der B-Zell-Ebene. An einer weiteren Einführung von Hsp90-Hemmern für die Behandlung von Autoantikörpererkrankungen wird geforscht (Tukaj et al., 2014).

Cortactin ist ein sich an Aktin bindendes Protein, das die Aktin-Polymerisation (Aufbau des Aktin-Zytoskeletts) unterstützt und als Signalprotein an vielen zellulären Prozessen, einschließlich der Zelladhäsion, Migration, Endozytose und Tumordinvasion beteiligt ist (Berrih-Aknin 2014 II). In kultivierten Muskelzellen wurde Cortactin mit AChR ko-lokalisiert gefunden und es ist in die Agrin-induzierte AChR-Clusterbildung einbezogen (Madhavan et al., 2009). Kürzlich wurde gezeigt, dass Cortactin ein neuartiges Zielantigen in Patienten mit Autoimmunerkrankungen ist. Dies gilt insbesondere für Patienten mit Myositis oder immunvermittelter nekrotisierender Myopathie sowie für Patienten mit seronegativer MG (Labrador-Horrillo et al., 2014, Gallardo et al., 2014). Bei beiden Muskelerkrankungen, MG und Myositis, gibt es immer noch eine Untergruppe von Patienten ohne definierte Ak. Das Vorhandensein

von Cortactin-Antikörpern bei den Patienten, in denen keine anderen bekannten Ak der jeweiligen Autoimmunerkrankung vorlagen, wurde in beiden Studien beschrieben. Das legt nahe, dass diese Antikörper eine klinische Relevanz haben.

Anti-Cortactin-Ak wurden in 19,8% (18/91) der SNMG-Patienten (Anti-AChR- und Anti-MuSK-Ak-negativ) gefunden, ein signifikant höherer Anteil als in den seropositiven MG-Patienten (4,9%; 5/103). Bei einer gesunden Kontrollgruppe wurden in 5,3% (1/19) und bei der Kontrollgruppe mit anderen neurologischen oder immunologischen Erkrankungen wurden in 12,5% (5/40) der Proben AAK gegen Cortactin nachgewiesen (Gallardo et al., 2014).

Offen ist noch, ob sich die Anti-Cortactin-Ak-Konzentrationen mit der Schwere der Erkrankung und/oder der Behandlung verändern. Obwohl die Sensitivität und Spezifität dieses Markers nicht sehr hoch sind, könnte dies die einzige serologische Methode sein, die den Verlauf der Krankheitsaktivität in Anti-Cortactin-positiven Patienten mit SNMG widerspiegelt (Berrih-Aknin et al., 2014).

Thymom-assoziierte MG: Bei Patienten mit Thymom tritt die MG im Alter zwischen 25 und 70 Jahren auf. Die Identifizierung des Thymoms geschieht in der Regel durch CT oder MRT. Ak gegen den **quergestreiften Muskel, Titin oder den Ryanodinrezeptor (RyR)** und die Anti-Zytokin-Ak (**Interferon-alpha, Interferon-omega und Interleukin 12**, Meager et al., 2003) treten bei einer Thymom-MG sehr häufig auf und insbesondere die Anti-Zytokin-Ak neigen zum Anstieg, wenn ein Rezidiv auftritt (Leite et al., 2010). **Ak gegen die quergestreifte Muskulatur** erkennen intrazelluläre Proteine der Muskelzelle (Titin, Myosin, Aktin und Ryanodinrezeptoren) und werden in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen. Sie sind nicht direkt zugänglich für AAK und daher nicht direkt pathogen. Jedoch sind einige der Proteine mit der Schwere der MG korreliert, was daher zur Muskelschwäche durch unbekannte Mechanismen beiträgt. Diese Autoantikörper sind nicht spezifisch für MG und können bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen oder bei Patienten mit Thymom ohne begleitende MG auftreten. Ihre Anwesenheit ist bei MG-Patienten mit markanten klinischen Merkmalen (Thymom, Myositis und Myokarditis) sowie mit einem schweren Krankheitsverlauf mit prominenten oropharyngealen Symptomen und Atembeschwerden assoziiert. Ak gegen die quergestreifte Muskulatur können auch gegen mehrere andere myofibrilläre Proteine (**Myosin, Actin, Tropomyosin und Troponin**) gerichtet sein, die eine Rolle bei der Muskelkontraktion spielen. Ihre klinische Bedeutung ist unklar, die praktische Verwendbarkeit der Antikörperspiegel in

Prognose und Vorhersage von Behandlungseffekten muss noch weiter untersucht werden (Meriggioli et al., 2012).

Bei Patienten mit Anti-AChR-Ak-positiver MG im gemeinsamen Auftreten mit einem Thymom oder mit einer Myokarditis/Myositis ist das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen den spannungsgesteuerten Kaliumkanal **Kv1.4 (VGKC)** assoziiert (Leite et al., 2010). Bei japanischen Patienten wurden Anti-Kv1.4-Ak in schweren Krankheitsverläufen mit bulbärer Schwäche (*bulbär*: die Stimme, die Sprache und das Schlucken betreffend) vermehrt gefunden. Diese Ak wurden dann auch in milder oder überwiegend okulärer MG in einer kaukasischen Kohorte gefunden. Da diese Ak ohne Folge einer klinischen oder elektrischen Neuromyotonie aufgetreten sind, ist anzunehmen, dass das eigentliche Zielprotein nicht der neuronale VGKC sondern vielmehr das VGKC auf den Muskelfasern ist (Meriggioli et al., 2012).

Anti-Titin-, Anti-RyR- und Anti-Kv1.4-Ak und auch Anti-Zytokin-Ak und Anti-Interleukin-Ak wurden mit Interesse untersucht, aber ihre allgemeine Verwendung in der klinischen Praxis ist noch ungewiss (Leite et al., 2010).

RAPsyn ist ein intrazelluläres Endplattenprotein, das für die Clusterbildung von AChR in den postsynaptischen Falten notwendig ist. Anti-RAPsyn-Ak wurden in bis zu 15% der MG-Patienten gefunden, vorwiegend bei Thymom-assoziiierter MG. Aber auch in Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen konnten diese AAK nachgewiesen werden (Meriggioli et al., 2012, Vrolix et al., 2010).

Das **Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom (LEMS)** beruht auf einer immunvermittelten Störung der Präsynapse durch Ak gegen den **Spannungsgesteuerten Kalzium-Kanal** (Voltage-Gated Calcium Channel **VGCC P/Q-Typ**, Cav2.1), der in 50 bis 60% der Fälle mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC) verbunden ist. Durch eine retrospektive Befragung von 97 LEMS-Patienten wurde deutlich, dass LEMS-Patienten mit SCLC schneller fortschreitende LEMS-Symptome aufwiesen als solche ohne Tumor. Das Vorhandensein von Ak gegen SOX-Proteine (**SRY-like high motility group box**) diskriminiert LEMS in Verbindung mit SCLC von tumorloser LEMS (Sensitivität 67%, Spezifität 95%) ohne eine Überlebensprognose für SCLC-Patienten abgeben zu können (Titulaer et al., 2009, Farrugia et al., 2010).

In der Regel wird das SCLC zum Zeitpunkt der Ausprägung neurologischer Symptome noch nicht erkannt (okkult). Auf der Außenmembran von SCLC-Tumorzellen werden

Kalziumkanäle exprimiert, deren hohe Konzentration eine Immunreaktion auslösen kann (paraneoplastische Ak). Die These einer durch die Tumorantigene initiierten Immunantwort wird durch eine hohe Remissionsrate (70%) bei erfolgreicher Behandlung des SCLC unterstützt (Harper et al., 2009).

Wenn neuronale VGCC funktionell beeinträchtigt sind, wird die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) verringert. Dies senkt den Sicherheitsfaktor für die synaptische Transmission an den neuromuskulären Synapsen in bestimmten vegetativen Nervenenden. Eine Muskelschwäche des Hüftbeugers und der unteren Beinmuskeln wurde festgestellt, oft verbessert sich die Muskelkraft anfänglich nach Bewegung. Andere häufige Symptome sind Mundtrockenheit, Impotenz und eine verminderte Schweißsekretion (Hypohidrose, Harper et al., 2009).

Die Muskelschwäche bei LEMS betrifft in der Regel die Beine, besonders die schnell reagierenden Muskeln des Unterschenkels. Eine die Augenmuskeln betreffende (okuläre) Form tritt meistens nur in milder Form auf, bulbäre Symptome waren im Vergleich zur Anti-AChR-Ak-positiven MG selten (5%). Besteht daher bei einem Patienten initial eine Augenschwäche, dann ist LEMS praktisch ausgeschlossen und MG wahrscheinlich. Nur bei generalisierter MG wurde eine auf die Arme beschränkte Muskelschwäche festgestellt, nicht bei LEMS-Patienten. Ak gegen den VGCC-P/Q-Typ wurden in 89% (32/36) der LEMS-Patienten gefunden (Wirtz et al., 2002). Zur Bestätigung des LEMS und zum Ausschluss einer MG ist die Bestimmung der Ak gegen VGCC-P/Q-Typ notwendig. Bei einem positiven LEMS-Befund ist die Suche nach einem SCLC angezeigt. Es wird geschätzt, dass der Anteil der neu erkrankten LEMS-Patienten an allen neu in den USA festgestellten Muskelschwäche-Fällen etwa 10% beträgt (Harper et al., 2009).

Die **Differenzialdiagnostik der MG** erfordert die Berücksichtigung eines ganzen Spektrums antineuronaler und antimuskulärer Ak, da sich die klinischen Symptome zum Teil überlappen (z. B. LEMS und MG). Wie sich bei der Untersuchung von Anti-AChR-Ak in Kombination mit der repetitiven Nervenstimulation (RNS) und Elektromyographietest (SFEMG) gezeigt hat, war es notwendig, mehrere Testverfahren zu kombinieren, um alle MG-Patienten zu erfassen (Oh et al., 1992). Eine Kombination von Testverfahren mit verschiedenen Antigenen (AChR, MuSK, VGCC) auf immunpathogene AAK wird zurzeit in der serologischen Routinebestimmung der MG durchgeführt. Die Untersuchungen von AAK gegen weitere Antigene geben wertvolle Hinweise, z. B. auf eine Thymom-assoziierte MG.

Wie im Methodenteil (Referenzmethode Indirekte Immunfluoreszenz) näher beschrieben wird, lassen sich mit der Immunfluoreszenztechnik (IFT) AAK gegen Antigene auf rekombinanten Zellen nachweisen. Üblicherweise werden in der IFT Gefrierschnitte verschiedener Gewebe verwendet (z. B. quergestreifter Muskel). Für den Aufbau der Biochip-Mosaik können je Reaktionsfeld 20 oder mehr unterschiedliche Antigensubstrate aus Gewebe oder rekombinanten HEK-293-Zellen nebeneinander angeordnet und mit der Patientenprobe inkubiert werden. So werden diagnostisch relevante Ak gegen intrazelluläre und Oberflächenantigene erfasst und ein Antikörperprofil erstellt (Stöcker et al., 2013 II). Bei der initialen Untersuchung von Patienten mit Verdacht auf MG ist die Biochip-IFT besonders geeignet. Ein Biochip-Mosaik aus rekombinanten HEK-293-Zellen, die AChR, MuSK, LRP4 und Anti-Kv1.4 exprimieren, in der Kombination mit Gewebeschnitten von quergestreiftem Muskel (Titin, Agrin und weitere), Magen, Nebenniere, Schilddrüse und Primaten-Pankreas erfasst eine Vielzahl der MG-typischen AAK. Darüber hinaus werden AAK anderer Krankheitsbilder erkannt, die mit der MG assoziiert sind (Thyreoiditis, perniziöse Anämie mit B12-Mangel, Diabetes mellitus, Morbus Addison) und eine Autoimmun-Polyendokrinopathie wird angezeigt. Ein Suchtest mit multiparametrischer Analyse der verschiedenen Antigene anstatt der sukzessiven Bestimmung einzelner Parameter spart wertvolle Zeit (Stöcker et al., 2013 II). Die qualitativen Ergebnisse der IFT müssen dann durch ELISA oder RIA bestätigt und quantifiziert werden.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die serologische Diagnose der Myasthenia gravis, eine durch AAK gegen humane nikotinische Acetylcholinrezeptoren verursachte Muskelschwäche, erfolgt zurzeit immunologisch mit radioaktiven Testsystemen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein nicht radioaktives Testsystem zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen adulte und fötale Acetylcholinrezeptoren zu entwickeln. Für die Generierung der Zielantigene sollte ein Proteinexpressionssystem in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) verwendet werden, um immunologisch reaktive Acetylcholinrezeptoren zu erhalten. Die Antigene sollten auf der festen Phase einer Mikrotiterplatte in der Weise immobilisiert werden, dass alle Epitope des Rezeptors für die Autoantikörper der Patienten präsentiert werden. Der neu zu entwickelnde ELISA sollte mit den etablierten Radioimmunoassays (RIA) verglichen werden.

1.6 Strategie der Entwicklung eines Anti-AChR-Ak ELISA

Strategie

- Herstellung der Expressionskonstrukte
- Ko-Transfektion in *E. coli* zu unterschiedlichen AChR-Varianten
- Prüfung der Konstrukte auf Bindung von Jod¹²⁵- α -Bungarotoxin
- Prüfung der Reaktivität der markierten AChR-Varianten im RIA
- Identifikation geeigneter Positivkontrollseren
- Entwicklung von zwei stabil transformierten HEK293T- Zellklonen
- Beschichtung von Mikrotiterplatten
- Aufbau des Enzymimmunassays
- Testvergleich mit geeigneten Referenzsystemen und Referenzproben

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

51 Seren von klinisch klassifizierten MG-Patienten wurden im Rahmen der Genehmigung (Antragsnummer 172 (22/03/2016)) des lokalen Ethik Komitees der Kirov State Military Medical Academy, St.Petersburg, zusammengestellt.

151 Zitratplasmen und 29 Seren von Blutspendern wurden aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck erhalten.

82 Serumproben von Patienten mit Myasthenia gravis, festgestellt auf Grundlage des serologischen RIA-Befundes, wurden vom Klinisch-immunologischen Labor Prof. Stöcker (Lübeck) zur Verfügung gestellt. Ebenso 9 Seren mit einer grenzwertigen Anti-AChR-Antikörperkonzentration von 0,4 bis 0,5 nmol/l (RIA).

2.2 Chemikalien, Puffer und ELISA-Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von unterschiedlichen kommerziellen Anbietern in hoher Reinheitsstufe bezogen.

Reagenz	Hersteller / Lieferant
α -Bungarotoxin	Fisher Scientific GmbH
Brij 35 (30%ige Lsg.)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bromonitrodioxan (BND)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	Merck KGaA
Coating Stabilizer	Scripps
Chloramin-T	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ciprofloxacin	BIOTREND Chemikalien GmbH
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA
N,N-Dimethylformamid	Merck KGaA
Di-Natrium-EDTA-Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
D-MEM high Glucosemedium	PAA Laboratories GmbH
Entionisiertes Wasser	EUROIMMUN AG (Leitfähigkeit > 18 M Ω * cm)
Enzymkonjugat-Stabilisierungsp.	EUROIMMUN AG
Erioglaucin-Lösung	EUROIMMUN AG
Ethanol (absolut)	Honeywell International Inc
Hydroxy-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hygromycin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA
Methylisothiazolon (MIT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Morpholinopropansulfonsäure	SERVA Electrophoresis GmbH
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumhydroxid	Merck KGaA
Natriumdisulfit	Merck KGaA
PBS (phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Penicillin	PAN-Biotech GmbH
Phenylmethylsulfonylfluorid PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure (HCl)	VWR International GmbH

Reagenz	Hersteller / Lieferant
Stopp-Lösung für ELISA, 0,5 M Schwefelsäure	EUROIMMUN AG
Streptomycin	PAN-Biotech GmbH
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TMB/H ₂ O ₂ -Substratlösung	EUROIMMUN AG
Trishydroxymethylaminomethan	Merck Millipore Corporation
Triton X-100	Merck KGaA
Trypsin/EDTA (10-fach)	PAA Laboratories GmbH
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Waschpuffer für ELISA	EUROIMMUN AG

Extraktionspuffer

Die in der Tabelle 3 genannten Substanzen wurden abgewogen, mit entionisiertem Wasser auf 800 ml aufgefüllt und bis zur Auflösung aller Reagenzien gerührt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung mit entionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Substanz	Menge
K ₂ HPO ₄ (Dikaliumhydrogenphosphat)	6,6 g ± 0,01 g
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat)	1,14 g ± 0,01 g
NaCl (Natriumchlorid)	0,54 g ± 0,01 g
Na ₂ EDTA	0,694 g ± 0,01 g
NaN ₃ (Natriumazid)	0,188 g ± 0,01 g
Triton X 100 (2 % v/v)	20,0 ml ± 0,1 ml

Tabelle 3: Reagenzien des Extraktionspuffers

Vor Gebrauch des Extraktionspuffers wurde der Proteinase-Inhibitor PMSF in Ethanol (40 mg/ml) in 1:400-Verdünnung zugegeben (Endkonzentration 100 µg/ml); die Lösung wurde innerhalb von 2 Tagen verwendet (Lagerung bei 4°C), da sich das Reagenz schnell zersetzt.

Probenpuffer

Zunächst wurden $68,0\text{g} \pm 0,1\text{g}$ NaCl abgewogen und in 4,25 l PBS (von Sigma #D5652: KCl 0,2 g/L, KH_2PO_4 0,2 g/L, NaCl 8.0 g/L und Na_2HPO_4 1,15 g/L mit pH 7,4) gelöst. Anschließend wurden folgende Reagenzien zugegeben:

500 ml \pm 1,0 ml FKS (fötales Kälberserum)

200 ml \pm 1,0 ml Mausserum

50 ml \pm 1,0 ml Zitratplasma

4,5 g \pm 0,1 g Natriumazid

Standards und Kontrollplasmen

Aus 10 Plasmakonserven einer Blutbank wurde durch Messung im Anti-AChR- ELISA das Plasma mit der geringsten Konzentration ausgewählt. Das Signal dieser Konserve sollte im Bereich (\pm 0,050 OD) der Hintergrundaktivität des bereits verwendeten Nullstandards liegen. Für die Herstellung der Standards wurden 50 ml Zitratplasma im Becherglas vorgelegt und 0,5 ml Natriumazidlösung in dest. Wasser (9%) zur Konservierung dazu gegeben. Auf dem Magnetrührer wurde die Lösung für 10 min. bei 200 – 600 rpm gerührt. Es wurden für die Standards (0; 0,25, 0,75, 2,5 und 8 nmol/l) je 10 ml Plasma vorgelegt und die berechnete Menge eines Positivserums zugegeben. Die Herstellung der Standards durch gezielte Zugabe eines hochkonzentrierten Anti-AChR-Ak-positiven Serums zu jedem einzelnen Standard (spiken) erwies sich reproduzierbarer als durch eine Verdünnungsreihe des höchsten Standards.

In 4 Testansätzen wurden die Standards in 4-facher Bestimmung inkubiert und mit einer gut charakterisierten Standardreihe (Goldstandards) ausgewertet. Aus den 16 Messwerten (nmol/l) pro Standard wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet. Bei Abweichungen von mehr als 5% von der berechneten Konzentration wurden die Standards weiter verdünnt bzw. aufgestockt.

Die **Kontrollplasmen**, die in jedem Testlauf mitbestimmt wurden, um die Funktion der Standards zu überprüfen, wurden analog hergestellt. Es wurde eine negative (0,25 nmol/l) und eine positive Kontrolle (2 nmol/l) verwendet.

2.3 Geräte

Gerät	Hersteller/Lieferant
Analysenwaage ABJ 220-4NM	Kern & Sohn GmbH
Bioreaktor Labfors 3	Infors GmbH
Columbus Pro washer	Tecan Deutschland GmbH
Gamma Counter LB2111	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
Hettich Zentrifugen Rotanta 460 R mit Ausschwingrotor 4446	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
IFT Mikroskop EUROStar III Plus /cLED	Euroimmun AG
Magnetrührer C-MAG HS 10	IKA-Werke GmbH & CO. KG
Reinstwasseranlage	Millipore
Sunrise Reader	Tecan Deutschland GmbH
Ultraschallbad RK512H	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG
Ultrazentrifuge L90K	Beckman Coulter GmbH
UZ Rotor, Type 45 Ti, 6 x 94 ml	Beckman Coulter GmbH
Vortex-Schüttler, lab dancer	VWR International
Washer HydroSpeed	Tecan Deutschland GmbH

2.4 Klonierung und Zellkultur

In der Molekularbiologie der Euroimmun AG wurden die folgenden Klonierungen vorgenommen:

CHRNA1: Die cDNA, kodierend für die Isoform 1 der α -Untereinheit des humanen AChR (Arbeitsgruppe Vincent, Universität Oxford, siehe Leite et al., 2008) wurde für die Herstellung des cDNA-Fragmentes durch „polymerase chain reaction“ (PCR) unter Verwendung der DNA-Oligonukleotid-Primer EP03130 und EP03713 eingesetzt (Nukleotidsequenz siehe Tabelle 4).

CHRN1: Die cDNA, kodierend für die Isoform 1 der β -Untereinheit des humanen AChR (Template IRATp970A049D, BioScience, UK) wurde für die Herstellung des cDNA-Fragmentes durch PCR unter Verwendung der DNA-Oligonukleotid-Primer EP03142 und EP03714 eingesetzt.

CHRND: Die cDNA, kodierend für die Isoform 1 der δ -Untereinheit des humanen AChR (Template IRATp970G03119D, BioScience, UK) wurde für die Herstellung des cDNA-Fragmentes durch PCR unter Verwendung der DNA-Oligonukleotid-Primer EP03164 und EP03715 eingesetzt.

CHRNE: Da für die Epsilon-Untereinheit der humanen AChR nur eine unvollständige cDNA kommerziell zur Verfügung stand, wurde der fehlende Bereich durch Gensynthese ergänzt. Zur Gensynthese wurde als Template ein Gemisch der Oligodesoxynukleotide EP3145 bis 3151 und EP3154 bis 3161 eingesetzt, die PCR-Amplifikation erfolgte mit dem Primerpaar EP3144 und 3153. Der als cDNA (BioSciences, UK) verfügbare Teilbereich wurde, unter Verwendung der Primer EP3162 und 3719, amplifiziert. Die Herstellung der vollständigen cDNA erfolgte durch overlap-PCR ausgehend von den beiden CHRNE-Teilfragmenten unter Verwendung der Primer EP3718 und 3719.

CHRNG: Die Herstellung der für die γ -Untereinheit des humanen AChR kodierenden cDNA erfolgte aufgrund des Fehlens einer vollständigen cDNA ausgehend von zwei komplementären und partiell korrekten cDNA-Teilstücken (BioScience, UK Template ET582, sowie von Angela Vincent, Universität Oxford Template P2711). Unter Verwendung der Primer EP3840 und EP3841 bzw. EP3844 und 3845 wurde der in der cDNA korrekte Bereich in zwei Teilfragmenten amplifiziert. Mit Hilfe der Primer EP3842 und EP3843 wurde der korrekte Sequenzbereich amplifiziert.

Die durch das Restriktionsenzym BsmBI gespaltenen CHRNA/B/D/G-Amplifikate und das NcoI/XhoI-behandelte CHRNE-Fragment wurden in NcoI/XhoI-geschnittene pTriEx-1 (Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland) ligiert und anschließend in *E. coli* XL-2 transformiert. Korrekte Klone wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung identifiziert. Die rekombinanten Proteine entsprachen den entsprechenden Uniprot-Referenzsequenzen (CHRNA1- CH471058, CHRNB1- BC011371, CHRND-BC093923, CHRNE-CH471108 und CHRNG-BC111802). Die unterschiedlichen Konstrukte (z. B. A1B1G; siehe Ergebnisse Kapitel 3.2) wurden koexprimiert, das bedeutet, dass die für die darzustellenden Untereinheiten kodierenden Plasmide im Gemisch transfiziert wurden. Die Plasmid-Herstellung wurde im *E. coli*-Stamm XL-2 durchgeführt. Die Reinigung der zur Säugerzelltransfektion genutzten Plasmid-DNA erfolgte mit dem NucleoBond-System der Firma Macherey & Nagel entsprechend den Herstellerangaben.

Zwei **stabil transformierte HEK-293T-Zellklone**, die adulte bzw. fötale Acetylcholinrezeptoren nach Doxycyclin-Induktion generieren, wurden zusätzlich in der Abteilung Molekularbiologie der Firma Euroimmun entwickelt und später verwendet.

Zellmedium für die HEK-293T-Zellklone: Das Zellkulturmedium DMEM mit 4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin und Pyruvat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) wurde im Vorkulturmedium ergänzt mit 10% FKS (Sigma-Aldrich), 1% Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech, Aidenbach) und 200 µg/ml Hygromycin B (Fisher Scientific, Schwerte). Die rekombinante Proteinsynthese wurde anschließend direkt in induzierendem Medium (D-MEM, 10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin und 2 µg/ml Doxycyclin) durchgeführt.

Die HEK293T-Zellen wurden auf eine Zelldichte von $2,3 \times 10^5$ /ml eingestellt. Pro cm² einer Kultivierungsoberfläche wurden 0,325 ml der Zellsuspension eingesetzt.

Die rekombinante Produktion erfolgte in HYPERFlasks von Corning Incorporated (USA) im induzierenden Medium bei 37°C, 95% rel. Luftfeuchtigkeit und 8,5% Kohlendioxid über 3 Tage. Zur Ernte wurden die Zellen durch Trypsin/EDTA-Behandlung abgelöst (50 ml Trypsin/EDTA, PAN-Biotech, Aidenbach in 500 ml 0,9% NaCl-Lösung pro Flasche). Die Trypsin-Behandlung wurde durch Zugabe von FKS-haltigem-Medium beendet. Nach Zentrifugation (1.970*g, 4°C für 10 Minuten) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden tiefgefroren (-20 °C).

EP 03130 [sense CHRNA1_1]	ATAACGTCTCCCATGGAGCCCTGGCCTCTCCTCCTGCTC
EP 03713 [asense CHRNA-Stopp]	ATAACGTCTCCTCGAGTCATCCTTGCTGATTTAATTCAATGAGTCGAC
EP 03142 [sense CHRNB1]	ATAACGTCTCCCATGACCCAGGGGCTCTGCTGATGC
EP 03714 [asense CHRNB1-Stopp]	ATAACGTCTCCTCGAGTTAAGGAAAGGGGTCTGGAGGGGGCAAGTG
EP 03164 [sense CHRND]	ATAACGTCTCCCATGGAGGGGCCAGTGCTGACACTGG
EP 03715 [asense CHRND-Stopp]	ATAACGTCTCCTCGAGTTAGATGAAGCGCTTGTCTGCACGTTG
EP 03144	ATACCATGGCAAGGGCTCCG
EP 03145	CTTGGGGTCTGCTCCTCTTGGGGCTTCTCGGCAGGGGTG
EP 03146	TGGGGAAGAACGAGGAACTGCGTCTTTATCACCATCTCTT
EP 03147	CAACAACATGACCCAGGAAGCCGGCCAGTGCGGGAGCCT
EP 03148	GAGGATACTGTCACCATCAGCCTCAAGGTCACCCTGACGA
EP 03149	ATCTCATCTCACTGAATGAAAAAGAGGAGACTCTCACCAC
EP 03150	TAGCGTCTGGATTGGAATCGATTGGCAGGATTACCGACTC
EP 03151	AACTACAGCAAGGACGACTTTGGGGGTATAGAAACCCTGC
EP 03152	GAGTCCCTTCAGAACTCGTGTGGCTGCCAGAGATTGTGCT
EP 03153	AGCACAATCTCTGGCAGCCA
EP 03154	CACGAGTTCTGAAGGACTCGCAGGGTTTCTATACCCCA
EP 03155	AAGTCGTCTTGCTGTAGTTGAGTCGGTAATCCTGCCAAT
EP 03156	CGATTCCAATCCAGACGCTAGTGGTGAGAGTCTCCTCTT
EP 03157	TTCATTCACTGAGATGAGATTCGTCAGGGTGACCTTGAGG
EP 03158	CTGATGGTGACAGTATCCTCAGGCTCCCGCACTGGCCGGC
EP 03159	TTCCTGGGTCATAGTTGTTGAAGAGATGGTGATAAAGACG
EP 03160	CAGTTCCTCGTTCTTCCCCACACCCCTGCCGAGAAGCCCC
EP 03161	AAGAGGAGCAGGACCCCAAGCGGAGCCCTTGCCATGGTAT
EP 03162 [sense CHRNE_2]	GTGTGGCTGCCAGAGATTGTGCTGGAAAACAATATTG
EP 03719 [asense CHRNE]	ATACTCGAGTTAAGGCTGGATACACGGCGCGTAGGGGAG
EP 03718 [sense CHRNE]	ATACCATGGCAAGGGCTCCGCTTGGGGTCTCG
EP 03840 [sense CHRNG_1]	ATACGTCTCACATGCATGGGGGCCAGGGGCCGCTGCT
EP 03841 [asense CHRNG_1]	ATACGTCTCTCCAGCACGATATCCGGCC
EP 03842 [sense CHRNG_2]	ATACGTCTCTGGAGAATAACGTGGACGGTGTC
EP 03843 [asense CHRNG_2]	ATACGTCTCACAATGAGGATGGTCACCACCAGGAG
EP 03844 [sense CHRNG_3]	ATACGTCTCCATTGTCGTGAATGCTGTGGTTGTG
EP 03845 [asense CHRNG_3]	ATACGTCTCCTCGAGTCAGTCTGGTGAGGGCAGGTAGGGGCGT

Tabelle 4: Nukleotidsequenzen (5' - 3') der verwendeten Primer

2.5 Kommerzielle Reagenzien zur Anti-AChR-Ak Diagnostik

Reagenz	Hersteller / Lieferant
Acetylcholinrezeptor-Ak (ARAb) RIA	IBL International GmbH
Anti-Acetylcholinrezeptor (AChR) RIA	Euroimmun AG
Anti-AChR-Ak-positives Serum	The binding site GmbH
BSA (bovines serumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FKS (fötales Kälberserum)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
IFT-Reagenzien	Euroimmun AG
Maus-Anti-human-IgG-Poly-POD	SDT GmbH
Maus-Anti-human- β -AChR-Ak	AbD Serotec-Bio-Rad Laboratories, Inc
Mausserum	PAN-Biotech GmbH
Mikrotiterplatten, Lockwell C8	Nunc-Thermo Fisher Scientific Inc.
StabilCoat	SurModics, Inc.
Steroid-freies-Humanserum	Scantibodies Laboratory, Inc.
Ziege Anti-human- δ -AChR-Ak	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Zitrat-Plasmakonserven	UKSH Lübeck

2.6 Referenzmethode Anti-AChR-Ak Radioimmunassay

Extraktion der TE 671 Zellen

Für die TE 671 Zellen wurde der Extraktionspuffer mit einer erhöhten Konzentration (3,0 % v/v) Triton x-100 verwendet. Vor Gebrauch des Extraktionspuffers wurde der Proteinase-Inhibitor PMSF in Ethanol (40 mg/ml) in 1:400-Verdünnung zugegeben (Endkonzentration 100 μ g/ml). Es werden 40 g TE671-Zellen in einem Becherglas abgewogen und 133 ml Extraktionspuffer mit PMSF hinzugegeben (0,3g Zellen/ml Extraktionspuffer). Anschließend werden die Zellen mit einem Magnetrührer (200-600 rpm) für mindestens 1 min gut gemischt und bei 2-8°C für 1,5 h inkubiert. Währenddessen wurden alle 30 min für 1 min gemischt. Die Suspension wurde für 10 min ins Ultraschallbad gestellt und dann für 1,5 h bei 2-8°C inkubiert, dabei wurde die Suspension erneut ebenfalls alle 30 min für 1 min mit einem Magnetrührer gemischt. Danach wurde die Zellsuspension in 50 ml Schraubröhren von Sarstedt mit Spitzboden

überführt. Die Zentrifugation erfolgte für 30 min bei 4°C und 2500 g in einer Hettich Zentrifuge Rotanta 460 R mit einem Hettich Ausschwingrotor (Katalog Nummer 4446). Der Überstand wurde vorsichtig in leere Schraubröhren abgegossen und bis zum Gebrauch bei 2-8°C gelagert. Die spätere Extraktion und Zentrifugation der HEK-293-Zellen erfolgte gleichartig.

I¹²⁵-Markierung von α -Bungarotoxin: α -Bungarotoxin wurde gemäß der Chloramin-T-Methode (Hunter und Greenwood, 1962) oxydativ markiert. Unter dem Radionuklid-Abzug wurden die in der Tabelle 5 genannten Reagenzien, in der genannten Reihenfolge, in ein Glasröhrchen pipettiert und anschließend mindestens 5 Sekunden gemischt.

Substanz	Menge
NaJ ¹²⁵ in 0,01 mM NaOH, Perkin Elmer Katalog Nummer #NEZ033A	300 MBq \pm 10 MBq
PBS	160 μ l \pm 1 μ l
α -Bungarotoxin-Lösung 1mg/ml in PBS Thermo Fisher Scientific	80 μ l \pm 1 μ l
Chloramin-T-Lösung 1mg/ml in dest. Wasser Frisch angesetzt, innerhalb 1h verwenden	80 μ l \pm 1 μ l

Tabelle 5: Mengen für einen 300 MBq-Ansatz zur Markierung von α -Bungarotoxin

Mit der Zugabe des Oxidationsmittels Chloramin T beginnt die nukleophile Substitution eines Wasserstoffatoms durch ein J¹²⁵-Atom in den Tyrosinring des α -Bungarotoxins. Die Reaktionszeit bei Raumtemperatur betrug 60 s und wurde mit 160 μ l Natriumdisulfit-Lösung (1 mg/ml in dest. Wasser) gestoppt. Durch Zugabe von 1 ml PBS-BSA (1g BSA pro Liter PBS) wurde verhindert, dass sich I¹²⁵- α -Bungarotoxin unspezifisch an die Gefäßwand anlagerte. Das molare Verhältnis α -Bungarotoxin / J¹²⁵ wurde auf ca. 3,0 eingestellt, um einen hohen Anteil von mono-jodiertem α -Bungarotoxin zu erhalten. α -Bungarotoxin, bestehend aus 74 Aminosäure-Resten (Molmasse 7.984 g/mol) enthält 2 Tyrosinreste, von denen ausschließlich Tyr⁵⁴ einfach und doppelt markiert werden kann (Wang et al, 1980).

Auftrennung des I¹²⁵- α -Bungarotoxin über Sephadex-Gelsäule: Verwendet wurde eine Chromatographiesäule der Dimensionen 50 cm x 1 cm (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Katalognummer # 737-1052), die mit 5 g Sephadex G-50 fine in 70 ml PBS mit 0,1% Azid gefüllt wurde. Zur Äquilibration der Säule wurden 5 ml PBS-BSA mit 0,1% Na-Azid auf die Säule gegeben und anschließend 10 ml PBS mit 0,1%

Na-Azid. Der I^{125} - α -Bungarotoxin-Ansatz wurde vollständig mit einer Pipette mittig auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde danach mit 50 ml PBS (+ 0,1% Na-Azid) eluiert und die Fraktionen à 1 ml gesammelt (40-50 Fraktionen), 0,5 ml PBS-BSA (+ 0,1% Na-Azid) wurde vorgelegt. Die radioaktive Strahlung der Fraktionen wurde gemessen.

Austestung der I^{125} - α -Bungarotoxin Fraktionen: Für die Prüfung der radioaktiven Fraktionen wurden diese mit AChR inkubiert und anschließend mit den Standards 0 und 8 nmol/l (Anti-AChR-Ak) im Anti-Acetylcholinrezeptor (AChR)-RIA getestet. Hierfür wurden je 1 ml TE671-Zellextrakt mit 40% FKS versetzt und durch Zugabe aus den radioaktiven Fraktionen auf 80.000-100.000 cpm/100 μ l eingestellt. TE671 ist eine humane Zelllinie aus einem **Rhabdomyosarkom**, ein Tumor der Weichteile, der fötale Acetylcholinrezeptoren auf der Membran aufweist, die mit Detergenzien solubilisiert werden können. Nach einer Inkubation über Nacht wurde der I^{125} - α -Bungarotoxin-AChR Komplex (Tracer) 2 Stunden mit den Standards bei 2-8°C inkubiert und der Test wie üblich zu Ende geführt. Die Messdaten wurden gesichtet und Fraktionen, die mit dem Standard 8 nmol/l hohe Radioaktivwerte anzeigen, vereinigt.

Herstellung der Rezeptorlösung und Inkubation mit I^{125} - α -Bungarotoxin: Es wurden solche TE671-Extrakte ausgewählt und gepoolt, die mit zuvor geprüften, guten Fraktionen des I^{125} - α -Bungarotoxin eine Bindung von über 15% ($B_{max}/T\%$) aufwiesen. Mindestens 3 verschiedene Chargen der Zellextrakte wurden zusammen gegeben, um auch über verschiedene Produktionen homogene Zusammensetzungen zu erzielen. Zudem wurden 2-5% der ϵ -Rezeptor-Extrakte (je nach Reaktivität) zum Pool gegeben sowie 40% fötales Kälberserum und 5% Sucrose (Saccharose).

Das I^{125} -markierte α -Bungarotoxin der gewählten Fraktionen inkubierte anschließend wenigstens 24 Stunden bei 4°C mit dem Acetylcholinrezeptor-Pool und bindet sich auf Grund der hohen Bindungskonstante fast irreversibel an AChR (Ringler et al., 1997). Anschließend wurde der Tracer tiefgefroren und gefriergetrocknet. Die Zugabe von FKS und Sucrose waren notwendig, damit die Rezeptoren das Einfrieren und Trocknen mit geringem Reaktivitätsverlust überstanden.

Messprinzip: Autoantikörper binden sich im ersten Inkubationsschritt an die mit Jod^{125} - α -Bungarotoxin markierten adulten und fötalen Rezeptoren. Nach Zugabe eines Anti-human-IgG-Antikörpers werden die humanen Ak präzipitiert. Durch Zentrifugation wird die freie von der gebundenen Radioaktivität getrennt und die gebundene (Präzipitat) im Gamma-Counter gemessen. Die gemessene Radioaktivität ist proportional zur AAK-Konzentration.

Testansatz: Je 20 µl der Standards, Kontrollen und Patientenproben (oder verdünnte Patientenproben) wurden in Polystyrolröhrchen pipettiert und anschließend 100 µl des rekonstituierten gefriergetrockneten Tracers in alle Röhrchen zugegeben. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität (Totalaktivität T) wurde nur der Tracer pipettiert, der unbehandelt später gemessen wurde und als Maß der eingesetzten Radioaktivität dient. Nach gründlichem Mischen und einer Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden 200 µl des Ziege-anti-human-IgG-Antikörpers (80% Antikörper plus 20% PBS, 0,1% Azid) zu allen Röhrchen außer T pipettiert, gründlich gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Fällung). Nach Zugabe von 750 µl Waschpuffer (10 mmol Phosphatpuffer mit 8,5g/l NaCl, 0,05% Tween, pH 7,2) wurde 15 Minuten bei wenigstens 2.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt oder dekantiert. Anschließend wurde das Pellet gewaschen: Nach weiterer Zugabe von 750 µl Waschpuffer wurden die Röhrchen gründlich aufgeschüttelt (mindestens 10 Sekunden), um das Pellet zu zerstören. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 2.000g wurde wiederum abgesaugt oder dekantiert. Anschließend wurden die Niederschläge und die Totalaktivität für 1 Minute im Gamma-Counter gemessen.

2.7 Referenzmethode Indirekte Immunfluoreszenz für Anti-AChR-Ak

Herstellung rekombinanter Substrate für den indirekten Immunfluoreszenztest (IFT):

Die für die Untereinheiten A1, B1, D und E bzw. G des humanen AChR kodierenden cDNAs sowie die für das die Clusterbildung unterstützende Protein RAPsyn kodierende cDNA wurde stabil in das Genom von HEK-293-Zellen integriert. Die so erzeugten Zelllinien HEK-293(AChR($\alpha_1\beta_1\delta\gamma$) + RAPsyn) und HEK-293(AChR($\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$) + RAPsyn) wurden durch Zugabe von Doxycyclin (Induktion) zur rekombinanten Herstellung fötaler bzw. adulter Acetylcholinrezeptoren angeregt.

Die auf 0,15 mm dicken Glasträgern kultivierte HEK-293-Zelllinien wurden mit Doxycyclin versetzt. Als Kontrollsubstrate wurden nicht induzierte Zellen mitgeführt. 42 Stunden nach Induktionsstart der Testsubstrate wurden die Zellen unter Verwendung von Formalin fixiert und anschließend luftgetrocknet. Die fixierten Substrate wurden fragmentiert. Diese Fragmente können auch mit anderen Substraten zu Mosaiken kombiniert werden.

Testprinzip: Die auf den Objektträgern fixierten, induzierten bzw. nicht induzierten Zellen wurden mit verdünnten Patientenproben inkubiert, die spezifischen Autoantikörper der Patienten oder der positiven Kontrolle wurden an das Substrat gebunden. Ungebundene Ak wurden aus den fixierten Zellen ausgewaschen und die gebundenen AAK wurden mit einem biotinylierten Anti-human-IgG-Antiserum markiert. Nach einem Waschschrift wurde mit Extravidin-Fluorescein-Konjugat inkubiert, das sich an den biotinylierten Anti-human-IgG-Ak bindet. Nach dem Abtrennen des überschüssigen nicht gebundenen Konjugates durch Waschen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop das Muster sowie die Intensität der positiven Proben ausgewertet. Als Referenz wurden nicht-induzierte Zellen mitgeführt (siehe Abbildungen 21, 22). Die Ak-Konzentrationsbewertung erfolgt semi-quantitativ an Hand der Fluoreszenzintensitäten (siehe Tabelle 6).

Intensität	Bedeutung
0	keine spezifische Fluoreszenz
1	spezifische Fluoreszenz sehr schwach zu erkennen
2	spezifische Fluoreszenz schwach zu erkennen
3	spezifische Fluoreszenz gut zu erkennen
4	starke spezifische Fluoreszenz
5	sehr starke spezifische Fluoreszenz

Tabelle 6: Skalierung der Fluoreszenzintensitäten

Testdurchführung mit den IFT-Reagenzien der Euroimmun AG: Proben und Kontrollen wurden nach Bedarf (1:10, 1:32, 1:100, 1:320, 1:1.000) in Albumin-Azid-Probenpuffer verdünnt und davon 25 µl in ein Inkubationsfeld pipettiert, das 30 min bei Raumtemperatur (+18 °C bis +25 °C) inkubierte. Danach wurde mit ca. 10-20 ml PBS/Tween aus einem Becherglas gespült und die Objektträger wurden für 5 Minuten in eine mit PBS/Tween gefüllte Küvette gestellt, die mit einem Rotationsschüttler bewegt wurde. Anschließend wurde der Objektträger der Küvette entnommen, die Flüssigkeit wurde ablaufen gelassen und pro Reaktionsfeld wurde mit 25 µl Anti-human-IgG-Biotin 30 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden 25 µl Extravidin-FITC pro Feld pipettiert. Die Objektträger wurden nach 30 Minuten Inkubation wie zuvor gewaschen und mit 10 µl Eindeckmedium pro Feld versehen und mit dem Deckglas versiegelt. Im Fluoreszenzmikroskop wurde bei 200-facher Vergrößerung und einer Anregungswellenlänge von 488 nm die Intensität des spezifischen Fluoreszenz-musters bei 510 nm (Sperrfilter 520 nm) ausgewertet.

2.8 Testdurchführung des neu entwickelten Anti-AChR-Ak ELISA

Um präzise und reproduzierbar dispensieren zu können wurde ein Mindestvolumen von 10 µl für alle Pipettierschritte gewählt. Standards, Kontrollen und Proben wurden 1:26 mit Probenpuffer verdünnt, hierzu wurden 10 µl der Standards, Kontrollen und Proben mit 250 µl Probenpuffer versetzt und dann gemischt. Je 100 µl der Verdünnungen wurden in die Vertiefungen pipettiert, die Mikrotiterplatte wurde anschließend mit einer Adhäsiv-Folie abgedeckt und inkubierte 90 min in einem Inkubationsschrank bei 37°C.

Die Platte wurde dreimal mit 450 µl Waschpuffer (10 mmol Phosphatpuffer mit 8,5g/l NaCl, 0,05% Tween, pH 7,2) im „Overflow Modus“ gewaschen, hierzu wurde ein Tecan Columbus Pro Washer verwendet, mit einer Einwirkzeit von 30s je Waschzyklus. Nach dem letzten Waschgang wurden die Platten kräftig auf Vliespapier ausgeschlagen, um Waschpufferreste vollständig zu entfernen.

Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl der gebrauchsfertigen Anti-human-IgG-Polyperoxidase-Lösung. Die Reagenzgefäße wurden abgedeckt und 60 min bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 µl der TMB- Substratlösung zugegeben, die 15 Minuten inkubierte und dann durch 100 µl 0,5M Schwefelsäure gestoppt wurde.

2.9 Berechnungen und Statistik

Die statistischen Analysen für die „Receiver Operating Characteristic“ (ROC), Prävalenz und die Regression wurden mit Hilfe der EUROStat-Software, Version 1.0.5 erstellt. Alle Funktionen wurden vor Verwendung der Programmmodule (ROC, Prävalenz, Korrelation) durch Vergleich mit Berechnungen in Excel oder Analyse-It validiert.

Für die beschreibende Statistik wie Mittelwert und Standardabweichung wurden Microsoft Excel 2010 und das Statistik-Add-In für Microsoft® Excel WinSTAT (Version 2012.1) verwendet. Der Homogenitätstest der Plattenherstellung wurde mit dem Softwarepaket XLStat der Firma STATCON (Witzenhausen, Deutschland) mit den Verfahren Pettitt-Test, Standard-Normal-Homogenitätstest (SNHT), Buishand-Test und dem von-Neumann-Test durchgeführt.

Die Übernahme der Messwerte vom Photometer und die Berechnung der Standardkurven erfolgte mit dem Softwarepaket Mikrowin 2000 der Firma Mikrotek (Overath, Deutschland). Dieses Programm erfüllt die Anforderungen über elektronische Aufzeichnungen der Food and Drug Administration (FDA, USA, 21CFR part 11, Electronic Records; Electronic Signatures - Scope and Application). Zur Kurvennäherung wurde die 4-Parameter-Logistik verwendet, ein für die Berechnung des nicht linearen, sigmoiden Kurvenverlaufes von Immunassays akzeptiertes Referenzverfahren (Findlay et al., 2007).

3. Ergebnisse

3.1 Validität der Referenzmethoden

Als Referenzsysteme zur Prüfung des zu entwickelnden ELISA wurden zwei Radioimmunassays als etablierte Methoden verwendet, die sich in der Antigenquelle unterschieden. Der RIA der Firma IBL Hamburg verwendet **Extrakte nativer Muskelzellen** (Amputate) während der Euroimmun-RIA fötale Acetylcholinrezeptoren aus **TE671-Zellkultur-Extrakten** und Extrakte rekombinanter adulter Acetylcholinrezeptoren aus HEK-293-Zellen verwendet.

Zum Vergleich wurden mit beiden Tests 126 Proben gemessen. Hierbei wurde bewusst ein Kollektiv gewählt, dessen Proben vermehrt Konzentrationen in der Nähe der Positivgrenze (0,4-0,5 nmol/l) aufwiesen. Für beide Assays ist neben dem positiven Grenzwert ein Graubereich für nur leicht erhöhte Proben definiert, die zwar höher als der Normalbereich sind, jedoch noch nicht als positiv gewertet wurden. Ohne Berücksichtigung dieser grenzwertigen Proben hat der Referenz-RIA von Euroimmun im Vergleich zum IBL-Assay eine Spezifität von 100% (Blutspender, richtig negativ) und eine Sensitivität von 100% (richtig positiv). Wurden grenzwertige Proben als positiv gewertet, ergibt sich eine Spezifität von 94,3% bei einer Sensitivität von 97,8%.

Diese gute Übereinstimmung, die auch in der Korrelationsanalyse ($r=0,963$) deutlich wurde, bestätigt die immunologische Ähnlichkeit der verwendeten verschiedenen Antigene in den beiden Assays (siehe Abbildung 8). Damit waren die 126 Proben vorcharakterisiert, um später im ELISA geprüft zu werden.

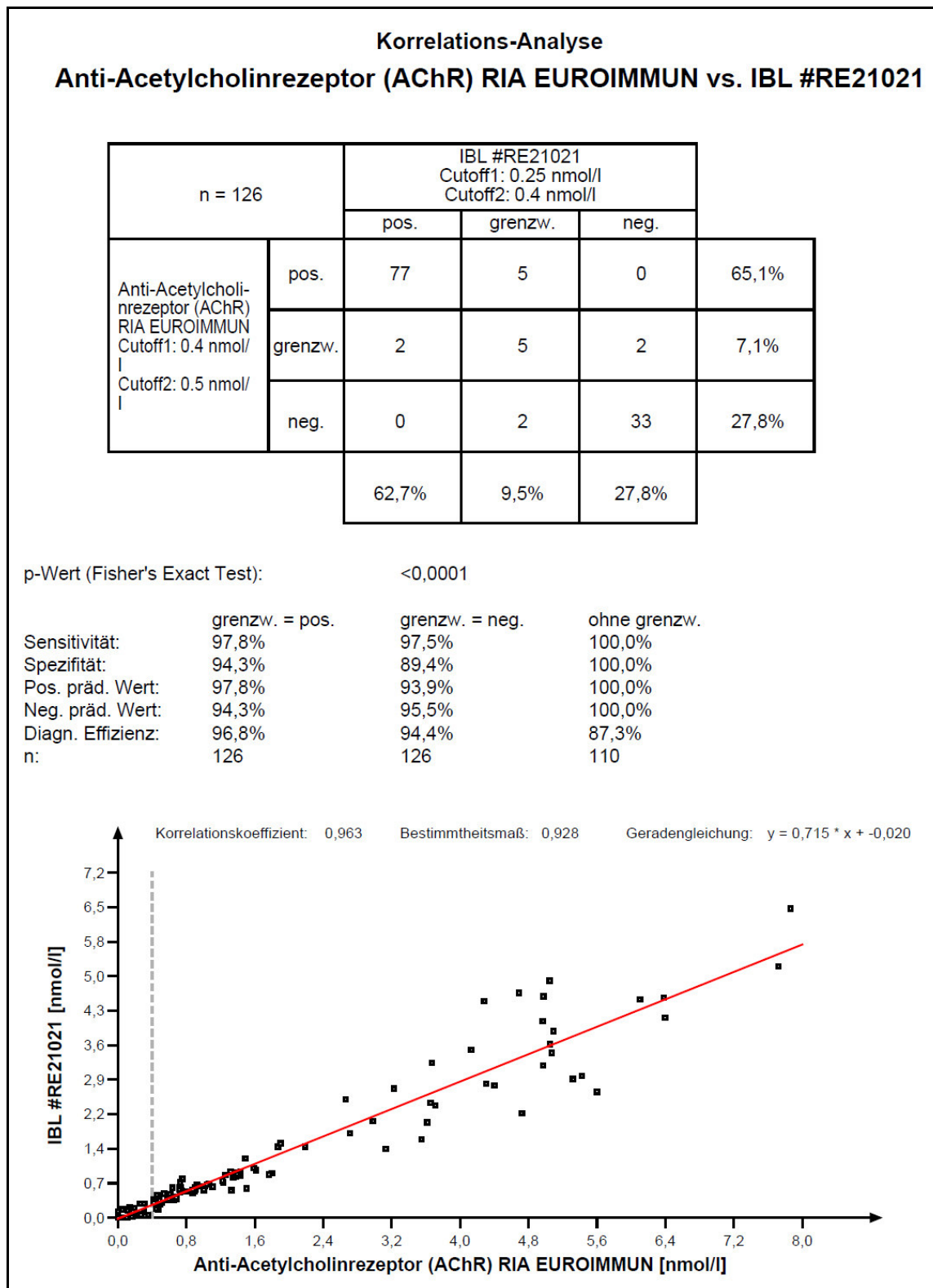


Abbildung 8: Testvergleich RIA der Firmen IBL (Hamburg, Katalognummer #RE21021) und Euroimmun AG (Lübeck). **Oben:** In der Kreuztabelle werden die Anzahl der klassifizierten Proben eingetragen, 126 Proben wurden in beiden Tests gemessen. **Mitte:** Berechnung der Sensitivität und Spezifität, grenzwertige Proben werden positiv, negativ oder nicht gewertet. **Unten:** Korrelationsanalyse.

3.2 Reaktivität rekombinanter adulter und fötaler Acetylcholinrezeptoren

Die Klonierungsstrategie war so angelegt, dass Konstrukte generiert wurden, die für die einzelnen AChR-Untereinheiten kodieren. Diese wurden dann kombiniert, um unter anderem einen **fötalen ($\alpha_1\beta_1\delta\gamma$)-** und einen **adulten ($\alpha_1\beta_1\delta\varepsilon$)-Rezeptor** zu generieren.

Die membrangebundenen Proteine wurden aus den transient transfizierten Zellen extrahiert. 100 mg Zellen pro ml Extraktionspuffer wurden eingesetzt, die Zellsuspension wurde 10 Minuten mit Ultraschall behandelt und inkubiert insgesamt 3h (siehe Schema in Abbildung 9). Nach einem Zentrifugationsschritt wurde zum Überstand des Extraktes Jod¹²⁵- α -Bungarotoxin zugegeben und auf 100.000 cpm (counts per minute - radioaktive Zerfälle pro Minute) in 100 μ l eingestellt. Als Referenz wurde ein TE671-Zellextrakt mitgeführt und zeitgleich mit dem radioaktiv markierten Schlangengift Jod¹²⁵- α -Bungarotoxin über Nacht bei 4° C inkubiert. Auf Grund der hohen Bindungskonstante des Giftes zu nativen Rezeptoren wird eine fast irreversible Bindung erreicht (Ringler et al, 1997).

Anschließend wurden 20 μ l der Standards oder definierte Proben mit 100 μ l der markierten Extrakte inkubiert. Gamma-Immunglobuline (IgG) wurden dann mit 50 μ l eines Anti-human-IgG-Antiserums gefällt und zentrifugiert. Tabelle 7A zeigt die radioaktiven Messwerte (cpm) der Standards im gewaschenen Präzipitat. Die aus der Standardkurve berechneten anti-AChR-AK-Konzentrationen in den Patientenseren sind in nmol/l angegeben. Die **spezifische Radioaktivität** des gereinigten monojodierten Schlangengiftes (I¹²⁵-Tyrosin 54, in Mikrocurie Radioaktivität pro Nanomol α -Bungarotoxin) erlaubt die Berechnung der äquimolaren Menge an präzipitierten Antikörpern über die Radioaktivität des rezeptorgebundenen α -Bungarotoxins. Damit erfolgt die Kalibration der Standards in SI-Einheiten (nmol/l), statt der sonst üblichen willkürlichen Einheiten oder internationalen Einheiten bei der Konzentrationsangabe von spezifischen Antikörperpopulationen.

	Valide Messungen: α -Bungarotoxin- I^{125} Bindung erfolgreich und Antikörper gebunden.				Keine I^{125} - α -Bungarotoxin Bindung oder keine Antikörper gebunden.		Referenz Euroimmun RIA Muskel-Zelllinie TE671	
Totalaktivität TA [cpm]	107.424	100.719	98.865	111.948	100.392	105.139	105.664	
Standard 0 nmol/l [cpm]	3.742	2.342	3.984	2.832	858	963	1.334	
Standard 0,25 nmol/l [cpm]	5.086	3.019	5.824	4.089	1.277	1.595	2.574	
Standard 0,75 nmol/l [cpm]	7.264	3.337	9.540	5.157	1.439	1.738	5.163	
Standard 2,5 nmol/l [cpm]	11.079	4.406	18.990	8.326	1.292	1.776	12.135	
Standard 8,0 nmol/l [cpm]	15.840	6.199	30.341	15.174	1.378	1.713	21.675	Sollwerte Proben
QK 1 [nmol/l]	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,04
QK 2 [nmol/l]	0,16	0,00	0,29	0,17	0,00	0,04	0,26	0,27
QK 3 [nmol/l]	0,60	0,15	0,48	0,20	1,28	0,24	0,48	0,52
QK 4 [nmol/l]	0,69	0,34	0,57	0,73	Ovr	Ovr	0,66	0,70
QK 5 [nmol/l]	0,26	0,05	0,45	0,23	0,01	0,05	0,60	0,64
QK 6 [nmol/l]	1,52	0,75	0,85	0,57	Ovr	Ovr	0,89	0,85
QK 7 [nmol/l]	2,22	0,38	1,03	0,48	0,01	0,11	0,94	0,99
QK 8 [nmol/l]	1,67	0,40	2,03	2,17	0,00	0,00	2,10	2,55
QK 9 [nmol/l]	1,97	11,61	2,79	4,73	Ovr	Ovr	3,04	3,30
Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten enthaltend	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$		$\alpha 1$	$\alpha 1$	
	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$		$\beta 1$	$\beta 1$	
			δ	δ			δ	
		ϵ		ϵ				
	γ		γ				γ	
			fötal	adult	pTriEx 1			fötal

Tabelle 7A: Verschiedene Acetylcholinrezeptor-Konstrukte wurden aus den Zellmembranen der Zellen extrahiert und mit I^{125} - α -Bungarotoxin inkubiert. Anschließend wurde mit diesen Tracern ein Radioimmunassay durchgeführt. Messwerte.

- TA Totalaktivität, Tracer-Aktivität in cpm (counts per minute), wurde ohne Präzipitation gemessen
- QK1-9, Qualitätskontrollseren
- Ovr oberhalb des auswertbaren Bereichs (over, >8nmol/l)
- Plasmid pTriEx-1 (Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland) für die Transfektion, Leervektor

	Valide Messungen: α -Bungarotoxin- I^{125} Bindung erfolgreich und Antikörper gebunden.				Keine I^{125} - α -Bungarotoxin Bindung oder keine Antikörper gebunden.		Referenz Euroimmun RIA Muskel-Zelllinie TE671	
NSB%	3,5	2,3	4,0	2,5	0,9	0,9	1,30	
Bmax/T%	11,7	3,9	27,8	11,3	0,5	0,7	19,5	
ED20% [nmol/l]	0,479	0,426	0,708	0,795	0,000	0,027	0,798	
ED50% [nmol/l]	1,752	2,138	2,074	2,906	0,003	0,076	2,303	
ED80% [nmol/l]	4,354	5,204	4,542	5,788	0,076	0,199	4,840	
Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten enthaltend	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$		$\alpha 1$	$\alpha 1$	
	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$		$\beta 1$	$\beta 1$	
			δ	δ			δ	
		ϵ		ϵ				
		γ		γ			γ	
			fötal	adult	pTriEx1		fötal	
Korrelationskoeffizient r von QK1-9 zu den Sollwerten	0,721	0,775	0,994	0,953	-0,174	-0,270	0,996	

Tabelle 7B: Verschiedene Acetylcholinrezeptor-Konstrukte wurden aus den Zellmembranen der Zellen extrahiert und mit I^{125} - α -Bungarotoxin inkubiert. Anschließend wurde mit diesen Tracern ein Radioimmunassay durchgeführt. Auswertung.

- NSB% Non specific binding, unspezifische Bindung: cpm Standard 0 nmol/cpm dividiert durch die Totalaktivität in %
- Bmax/T% Maximale Bindung beim Standard 8 nmol/l abzüglich NSB (cpm 0-Std) dividiert durch die zugegebene Totalaktivität
- ED20,50,80% (nmol/l), Konzentration bei 20, 50 und 80% Bindung (von Bmax)

Eine Bindung (Bmax/T%) deutlich oberhalb der unspezifischen Bindungen (NSB%) wurde in den Konstrukten mit $\alpha 1$ - und δ -Untereinheiten oder in Konstrukten mit $\alpha 1$ - und γ -Untereinheiten gefunden (siehe Tabelle 7B). Die beiden Bindungsregionen zwischen den genannten Untereinheiten (α - δ und α - γ) wurden als Regionen mit hoher und niedriger Affinität für α -Bungarotoxin beschrieben (Samson et al., 2008 et al., Arias 2000). Die höchste Bindung (Bmax/T%) wurde mit dem fötalen nAChR (**A1₂B1DG**) festgestellt. Sowohl die Bindung als auch die unspezifische Bindung war mit diesem rekombinant hergestellten Konstrukt höher als mit den Extrakten der Zelllinie TE671.

Die Standardkurven aller gebundenen Konstrukte entsprachen in ihrem Verlauf (Äquivalentdosis ED 20%; 50%; 80%) näherungsweise der Standardkurve des TE671-Zellextrakts. Mit den rekombinanten fötalen Rezeptoren wurde bereits eine sehr gute Übereinstimmung der Konzentrationen der Patientenserum mit den Werten der TE671 Muskelzellen gefunden (Korrelationskoeffizient $r = 0,994$). Der Extrakt der Zellen mit dem Leervektor pTriEx1 zeigt radioaktive Messwerte auf NSB-Niveau.

3.3 Eigenschaften der nAChR aus Zellkulturlinien

Nach der positiven Austestung der ϵ - und γ -Rezeptoren aus transient transfizierten Zellen wurden stabile HEK-293-Zelllinien etabliert. Es wurde davon ausgegangen, dass stabile Zelllinien deutlich höhere Expressionsraten an AChR aufweisen als transiente Ansätze. Um ein optimiertes Produktionsverfahren für das Biomaterial festzulegen, wurden die Extrakte aus Zelllinien titriert (10 mg Zellen/ml Extraktionspuffer, 30 mg/ml, 90 mg/ml) und mit I^{125} - α -Bungarotoxin inkubiert. Mit dem Komplex aus I^{125} - α -Bungarotoxin an adulten Rezeptoren wurden mit dem Standard 8 nmol/l deutlich geringere cpm gemessen als mit dem fötalen Rezeptor (Tabelle 8), da die Standardpräparation vorwiegend γ -(fötale)-Rezeptoren erkennt. Ein Poolserum, dessen AAK vermehrt an die ϵ -Untereinheit binden, wurde daher in 1:10-Verdünnung mitgeführt.

Bereits die Extrakte von 10 und 30 mg Zellen/ml Extraktionspuffer ergaben eine hohe Bindung, d. h. die Menge an extrahierten Rezeptoren war ausreichend für die verwendeten 60.000-80.000 cpm/100 μ l I^{125} - α -Bungarotoxin. Eine weitere Erhöhung der Konzentration (90 mg/ml) führte zu unmarkierten Rezeptoren und damit zum Absinken der Bindung (B_{max}/T).

Aus praktischen Gründen wurden im späteren Verlauf 50 mg Zellen pro ml Extraktionspuffer verwendet, mit guter Ausbeute extrahiert und mit Puffer weiter verdünnt (siehe Abbildung 9).

Verwendete Zelllinien für AChR bzw. TE671	Adulter Rezeptor	Adulter Rezeptor	Adulter Rezeptor	Fötaler Rezeptor	Fötaler Rezeptor	Fötaler Rezeptor	TE 671 Zellen
mg Zellen pro ml Extraktions-puffer [mg/ml]	10	30	90	10	30	90	300
TA [cpm]	62.239	75.227	66.068	78.918	75.287	75.601	75.225
0 nmol/l [cpm]	979	1.146	1.197	1.671	2.008	2.248	744
8,0 nmol/l [cpm]	8.029	4.567	3.239	19.754	17.101	9.781	9.643
QK 8 [cpm]	800	906	994	6.387	5.024	3.392	3.823
Patientenprobe [cpm]	1.260	1.449	1.639	16.950	16.344	8.088	6.169
Anti- ϵ -AChR-Ak-Pool 1:10 [cpm]	8.529	5.497	3.521	2.347	2.845	3.147	918
NSB [%]	1,6	1,5	1,8	2,1	2,7	3,0	1,0
Bmax/T [%]	11,5	4,6	3,1	23,4	20,6	10,3	11,9
Acetylcholin-rezeptor-Untereinheiten enthaltend	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$	$\alpha 1$
	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$	$\beta 1$
	δ	δ	δ	δ	δ	δ	δ
	ϵ	ϵ	ϵ	γ	γ	γ	γ

Tabelle 8: AChR wurden aus den Zellmembranen der Zellen extrahiert und mit I^{125} - α -Bungarotoxin inkubiert. Anschließend wurde mit diesen Tracern ein Radioimmunassay durchgeführt. Die adulten und fötalen Zellextrakte wurden in 3 Konzentrationen (10, 30 und 90 mg/ml) im RIA eingesetzt. Zur besseren Beurteilung der adulten Rezeptoren wurde ein Pool stark positiver anti- ϵ -Rezeptor-Ak-Seren in 1:10-Verdünnung mitgeführt.

TA Totalaktivität, Tracer-Aktivität in cpm (counts per minute), wurde ohne Präzipitation gemessen, NSB% Non specific binding, unspezifische Bindung: cpm Standard 0 nmol dividiert durch die cpm Totalaktivität in %, Bmax/T% Maximale Bindung beim Standard 8 nmol/l abzüglich NSB (cpm 0-Std) dividiert durch die zugegebene Totalaktivität.

Die aus der früheren RIA-Entwicklung gewonnenen Erfahrungen der Zellextraktion von TE671-Zellen konnten zum großen Teil auf die Extraktion für den ELISA übertragen werden. Es wurde ein Niedrigsalzpuffer (hypotones Medium) verwendet mit physiologischem pH-Wert (7,4). Auf Grund der geringeren Zelldichte wurde die Triton-X100-Konzentration von 3% auf 2% reduziert. In diesem Puffer war der Extrakt 2-3 Wochen bei 2-4°C haltbar, Einfrieren bei -20°C führte zu einem Aktivitätsverlust von mehr als 60%.

Nachdem zu Beginn der Entwicklung mit einer Ultrazentrifuge bei 100.000 g zentrifugiert wurde, zeigten die Überstände aus der 2500g-Zentrifugation annähernd ebenso gute Ergebnisse.

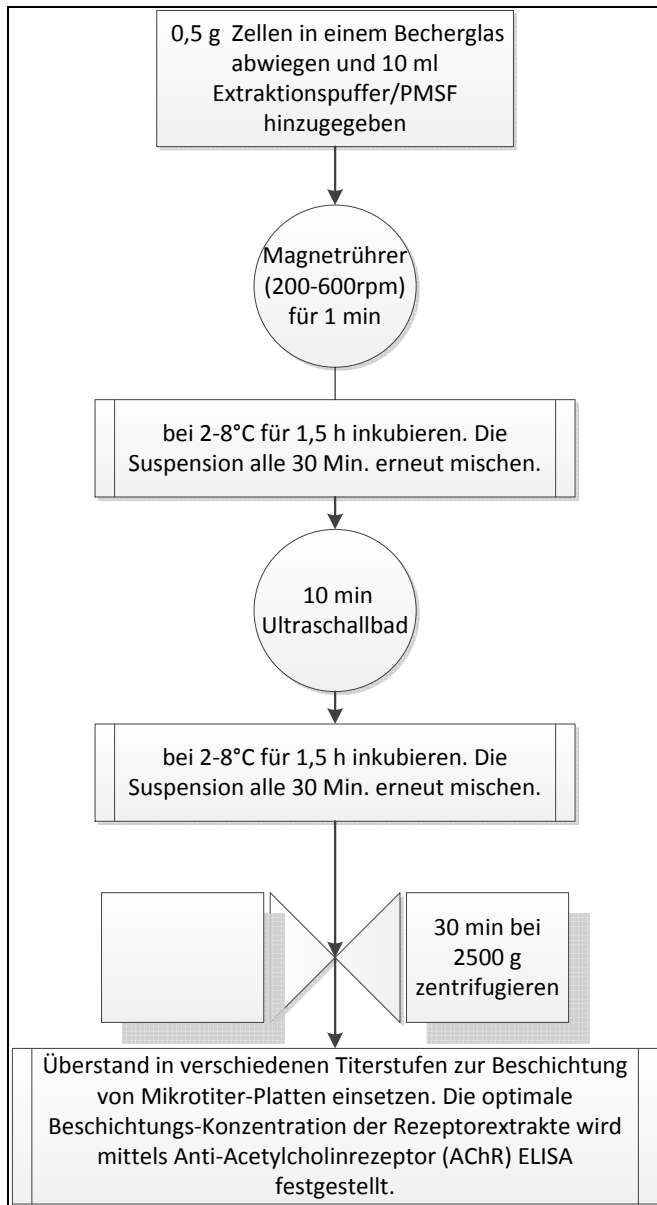


Abbildung 9: Ablaufschema der Zell-Extraktion für den ELISA.
PMSF: Proteinase-Inhibitor Phenylmethansulfonyl-fluorid
g Erdbeschleunigung, rpm Umdrehungen pro minute

3.4 Qualität beschichteter Mikrotiterplatten

Als Grundlage für den ELISA dient die mit den Rezeptoren beschichtete Mikrotiterplatte. Es wurde eine Mikrotiterplatte mit 96 einzeln abbrechbaren Vertiefungen gewählt. Die Maxisorp Platte von Thermo Scientific Nunc (Roskilde, Dänemark) aus

Polystyrol mit erhöhter Bindungsfähigkeit für Proteine (durch Gamma-Bestrahlung) erwies sich bei meinen Beschichtungsversuchen als besonders geeignet.

Bei den ersten Versuchen einer direkten Beschichtung der Platten mit Rezeptorextrakten zeigten sich auf Grund der geringen Reinheit des Rezeptorpräparats zu geringe Messsignale und zu hohe unspezifische Bindungen. Eine weitere Aufreinigung der Extrakte durch Größenausschluss-Chromatographie erwies sich als schwierig. Der hohe Detergenzanteils des Extraktes (2% Triton), der nötig war um die Rezeptoren aus der Membran zu lösen, störte die Auftrennung der Proteine. Die Mizellen blieben stabil und auch kleinere Fremdproteine in den Mizellen wanderten mit.

Auf eine Markierung mit Oligo-Histidin-Tag, die für eine weitere Aufreinigung mit Nickelionen-Chelat-Affinitätschromatographie sinnvoll ist, sollte verzichtet werden, um möglichst native Rezeptoren zu schaffen. Störungen durch diesen Oligo-Histidin-Tag bei der Immunfluoreszenztechnik mit rekombinanten Zellen wurden uns von einer anderen Arbeitsgruppe (Angela Vincent, Universität Oxford, persönliche Mitteilung) berichtet.

Daher wurde eine Affinitätsreinigung in der Mikrotiterplatte, während der Beschichtung, gewählt. Ak gegen die β - und δ -Untereinheit des AChR verschiedener Hersteller wurden auf der Platte beschichtet, die anschließend mit den Extrakten der rekombinanten HEK-293-Zellen inkubierten und die fötalen und adulten Rezeptoren immobilisierten. Die Platten wurden dann sorgfältig gewaschen und die Rezeptoren mussten nicht mit hohen Salzkonzentrationen oder pH-Gradient eluiert werden, da Sie bereits an der richtigen Stelle waren. Als Beschichtungsantikörper wurde ein Maus Anti-Human β -AChR (AbD Serotec) und ein Ziege-Anti-Human- δ -AChR der Firma Santa Cruz gewählt. Durch die Verwendung von zwei Antikörpern verschiedener Epitop-Erkennung sollte sichergestellt werden, dass alle Untereinheiten der zusammengesetzten Rezeptoren räumlich zugänglich sind (siehe Abbildung 10).

Beschichtung mit Antikörpern: Verwendet wurden Protein-G-gereinigte Ak, die in einer Konzentration von $< 1 \mu\text{g/ml}$ eingesetzt wurden, um die maximale Proteinbindungskapazität von 400 ng/Vertiefung nicht zu überschreiten. Es wurden 100 μl der hergestellten Antikörperlösung in Phosphatpuffer in jedes Well pipettiert. Anschließend inkubierten die Platten über Nacht bei Raumtemperatur und wurden anschließend zweimal gewaschen.

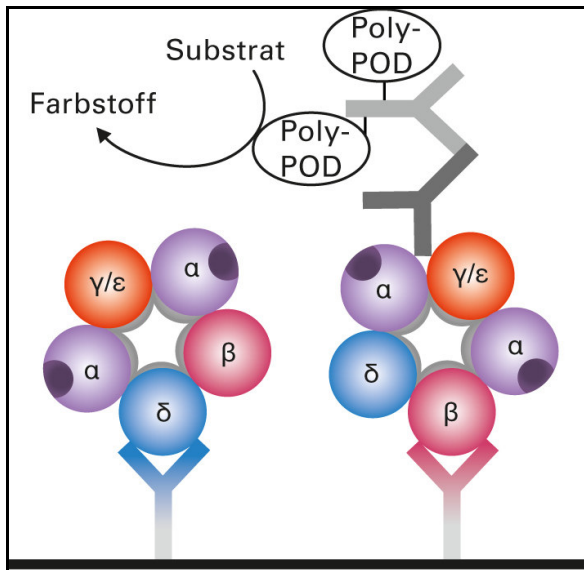


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des Anti-AChR-AK ELISA

— Mikrotiterplatte beschichtet mit Anti- β -AChR-Ak (Y rot) und Anti- δ -AChR-Antikörpern (Y blau)

Y Humane Autoantikörper

Y Monoklonaler Antikörper gerichtet gegen das Fc-Fragment von humanem IgG, konjugiert mit Polyperoxidase

Abbildung aus Westermann et al., 2014.

Blockieren der Platte: In den ersten Versuchen wurden der Blockierungsschritt und die Beladung mit Rezeptoren gleichzeitig durchgeführt und die Rezeptoren zusammen mit der Rinderserum-Albumin (BSA)-Lösung in die Platte gegeben. Ein Extraschritt für das Blockieren mit einer Proteinlösung, statt der gleichzeitigen Beschichtung mit Rezeptoren und Blockierung mit BSA, zeigte geringere Hintergrundwerte und ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis. Zur Ermittlung des am besten geeigneten Blockierungsproteins wurden bei einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur die folgenden Lösungen verwendet: 1g/l BSA, 5g/l BSA, 1g/l BSA in Casein-Blockierungspuffer und Casein-Blockierungspuffer allein. Anschließend wurde 3 Mal gewaschen und der Rezeptorextrakt in bekannter Konzentration zugegeben (γ -Rezeptoren 1:22,4 ; ε -Rezeptoren 1:100).

Die Casein-haltigen Lösungen führten zu sehr hohem Hintergrund und die 5g/l-BSA Lösung ergab im Vergleich zur 1g/l-BSA-Lösung keine weitere Verbesserung. Mit einem kommerziell erhältlichen Blockierungspuffer (SuperBlock Blocking Buffer Art-Nr: 37515, Thermo Scientific) wurden ähnliche Ergebnisse gefunden wie mit BSA, aber keine deutliche Verbesserung, so dass weiterhin die 0,1%-BSA-Lösung verwendet wurde.

Bindung der Rezeptoren: Auf das Waschen nach der Blockierung folgte das Pipettieren des verdünnten eisgekühlten Zellextrakts. Das Kühlen der Lösung reduzierte auftretende **Randeffekte**, die durch das schnellere Absinken der Temperatur in den äußeren Kavitäten im Kühlhaus (Randeffekt) auftreten würden und konservierte den Rezeptor. In jedes Well wurde 150µl der hergestellten Rezeptorlösung pipettiert und die Platten wurden rasch nach der Zugabe in Zehnerstapeln bei 4°C gelagert. Die Platten inkubierten dann über Nacht bei 4° C.

Statt der Inkubation über Nacht ist auch eine 2- bis 4-stündige Inkubation bei Raumtemperatur denkbar, da es sich um eine schnell ablaufende (nicht adsorptive) Bindung an einen Ak handelt. Diese Beschichtungen mit Kurzinkubation erzielten ähnlich gute Ergebnisse im Signal und im Signal-Rausch-Verhältnis. Für den zeitlichen Verlauf war hier eine Inkubation über Nacht praktikabel.

Nach der Rezeptorbeladung der Platten wurden diese 3 Mal mit mindestens 300µl Waschpuffer gewaschen, um die nicht gebundenen Rezeptoren und die Detergenzhaltige Lösung zu entfernen. Dann wurde die Mikrotiterplatte mit den Öffnungen nach unten kräftig auf Vliespapier geschlagen, um Waschpufferreste vollständig zu entfernen.

Desweiteren wurde versucht, mit einer weiteren Inkubation nach der Rezeptorbeladung der Platten mit humanem IgG-Fab-Fragment das Hintergrundsignal weiter zu reduzieren. Das Fab-Fragment des Immunglobulins IgG (von engl. *Fragment antigen binding*) ist das sich an Antigen bindende Fragment eines Antikörpers, das durch Abspaltung des Fc-Fragments (engl. *fragment crystallisable*) mit dem Enzym Papain gewonnen werden kann. Das Fab-Fragment sollte Oberflächenantigene der Platte (unspezifische Bindung an Fremdproteine aus den HEK-293-Zellen) blockieren, ohne den Fc-Teil wird der Ak nicht vom Konjugat erkannt. Nach der Rezeptorbeschichtung wurden je 200µl humanes IgG-Fab-Fragment von EMD Biosciences, Inc. (San Diego, USA) als 1:150-Verdünnung in 1g/l PBS/BSA pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es konnte keine zusätzliche Verringerung des Hintergrundsignals erkannt werden.

Platte konservieren: Nach dem Waschen und Ausklopfen der MT-Platte wurde unverzüglich (um Austrocknen zu vermeiden) je 200 µl der Stabilisierungslösung in jedes Well pipettiert.

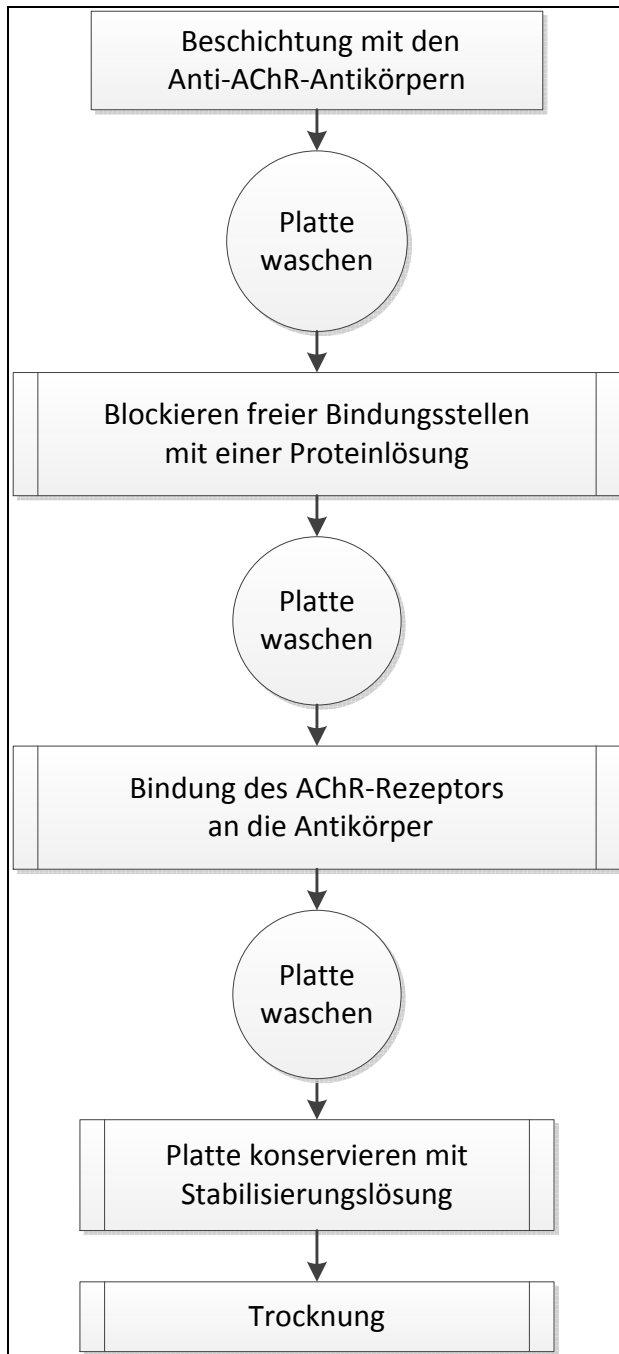


Abbildung 11: Schema der Plattenbeschichtung

Zu Beginn der Entwicklung wurde eine 20%-Karion-Lösung (Sorbitol) zur Stabilisierung verwendet. Bei thermischen Stresstests (Lagerung der Platten bei 37°C) zur Ermittlung der Lagerungsstabilität und bereits bei 4°C-Lagerung über 5 Tage zeigte sich ein zu starker Abbau der Reaktivität. Dies geht vermutlich auf den Abbau der Rezeptoren zurück, da die verwendeten Ak stabil waren. Die Stabilität der mit AChR beschichteten MT-Platten konnte auch mit dem Zusatz von β -Cyclodextrin (0,5% w/w) zur Karion-Lösung nicht weiter verbessert werden.

Stabilisierungslösung	Scripps pur		Scripps in 200g/l Karion		StabilCoat 1:4 in dest. H ₂ O		StabilCoat 1:4 in 200g/l Karion		200g/l Karion	
	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C
Lagerung 5 Tage bei	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C
OD Standard 0 nmol/l	0,139	0,120	0,134	0,124	0,133	0,159	0,144	0,144	0,319	0,450
OD Standard 8 nmol/l	2,849	3,091	2,908	3,046	2,686	2,919	2,817	2,954	2,006	1,651
OD Kontrolle 2 Mittelwert aus 12 Bestimmungen	1,091	1,063	1,083	1,074	1,018	1,049	1,042	1,074	0,870	0,944
Standardabweichung	0,055	0,049	0,035	0,036	0,043	0,035	0,021	0,039	0,054	0,047
Variationskoeffizient %	5,0	4,6	3,2	3,3	4,2	3,4	2,0	3,6	6,2	5,0
S/N Verhältnis	20,6	25,8	21,8	24,6	20,2	18,4	19,6	20,6	6,3	3,7

Tabelle 9: Stresstest Mikrotiterplatten. Lagerung der Mikrotiterplatten bei 37°C zur Simulation der Langzeitlagerung mit verschiedenen Stabilisierungslösungen.

S/N: signal/noise – Signal-Rausch-Verhältnis (OD Std 8 nmol/l/ OD Std 0 nmol/l)

Zwei kommerzielle Stabilisatoren, StabilCoat[®] Immunoassay Stabilizer von Surmodics (Artikelnummer: SC01-0050; Eden Prairie, USA) und Plate Coating Stabilizer von Scripps (Artikelnummer: 90388-0125; San Diego, USA) wurden daraufhin getestet. Das Signal des höchsten Standards war bei 4°C-Lagerung der MT-Platten bei den kommerziellen Stabilisierungslösungen ähnlich hoch, mit einer optischen Dichte (OD) um 3,0, dagegen wurde bei den Platten mit reiner Karion-Stabilisierung nur eine OD von ca. 2,0 erreicht. Dies deutete auf eine partielle Denaturierung des Rezeptors bereits während der Trocknung hin. Das Hintergrundsignal (OD Null-Standard) bei der Stabilisierung mit 200g/l Karion war auffällig hoch und wurde noch höher bei der 37°C-Lagerung.

Unter den Bedingungen eines beschleunigten Lagertestes (1 Tag bei 37°C entspricht näherungsweise 14 Tagen bei 4°C) fällt das Signal des höchsten Standards in den Karion-Platten bereits auf 80% des Ausgangssignals (4°C) ab. Damit verschlechtert sich das Signal-Rausch-Verhältnis dieser Platten zusätzlich (Abbildung 12). Auch die Präzision der mit Karion stabilisierten Platten war mit einem Variationskoeffizienten über 5% nicht so gut wie mit den anderen Platten (Abbildung 13).

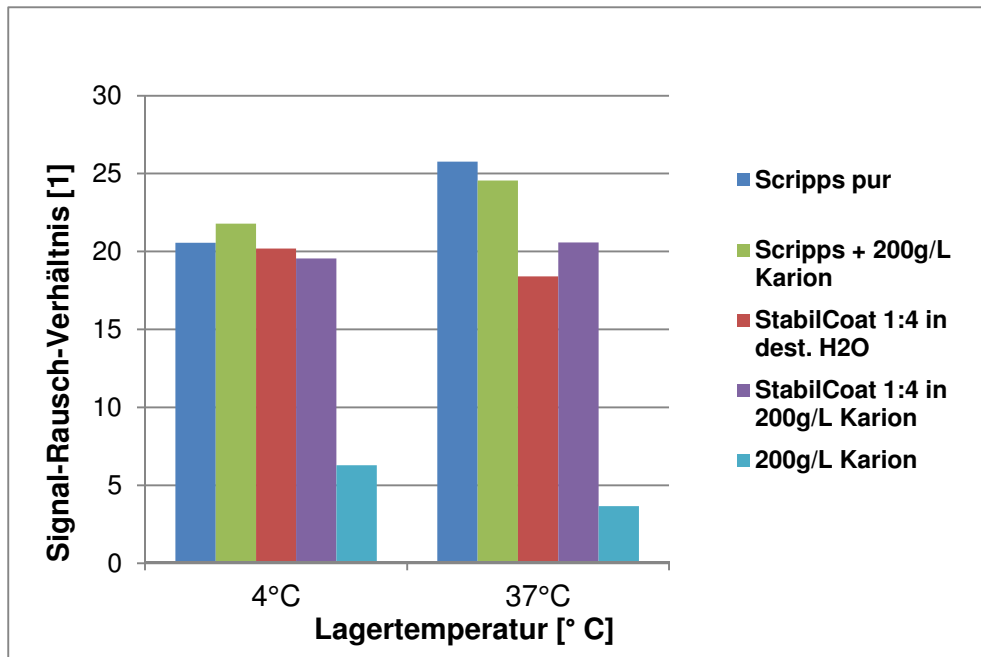


Abbildung 12: Einfluss der verschiedenen Stabilisierungslösungen auf das Signal-Rausch-Verhältnis. (OD Std 8 nmol/l/ OD Std 0 nmol/l).

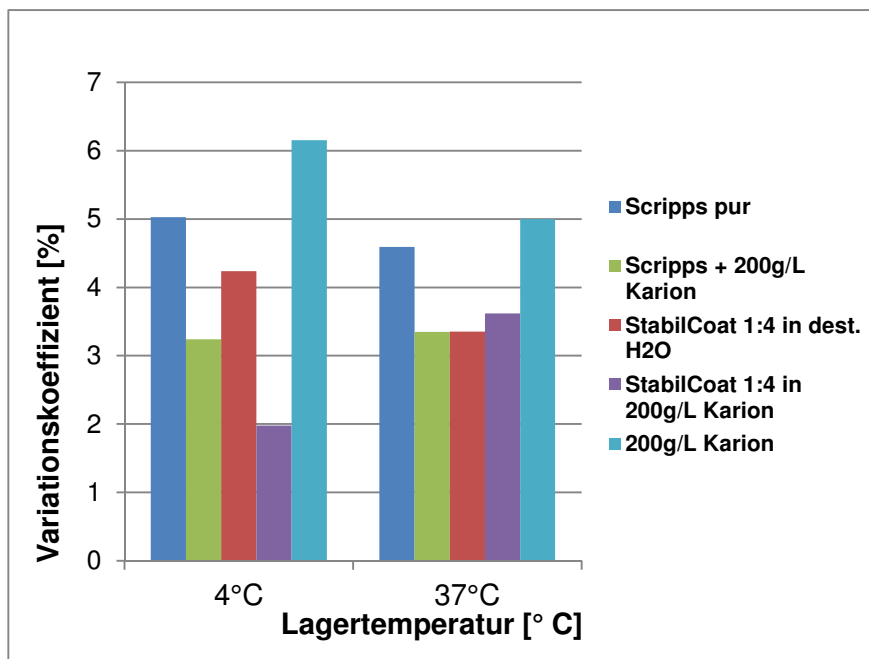


Abbildung 13: Einfluss der verschiedenen Stabilisierungslösungen auf die Präzision. Kontrolle 2 wurde in einem Ansatz 12-fach im Anti-AChR-ELISA gemessen, die Präzision (Variationskoeffizient %) wurde aus der optischen Dichte (OD) von 12 Bestimmungen berechnet.

Bei weiteren Austestungen der StabilCoat-Lösung und des Plate Coating Stabilizers von Scripps wurden Unterschiede bei der Bestimmung von Blutspender-Zitratplasmen erkennbar. Mit der Lösung von Scripps wurden 2 positive Proben, bei einem angenommenen Grenzwert von 0,5 nmol/l, gefunden. Dies entspricht 6,9% (2/29) falsch positiven Proben. Unter der Annahme einer Normalverteilung wurde mit den Mittelwerten plus 3 Standardabweichungen (99% Konfidenzintervall) das obere Ende des Normalbereichs berechnet, das dem angenommenen Wert von 0,5 nmol/l recht nahe kommt (Tabelle 10B). Im späteren Verlauf wurde die Normalwertberechnung mit dem Median und Perzentilen durchgeführt, da die Messwerte nicht normalverteilt waren. Aufgrund der zuverlässigeren Bestimmung der Blutspender wurde die Stabilcoat-Lösung, in destilliertem Wasser verdünnt, gewählt.

Verwendete Stabilisierungslösungen	StabilCoat in 20% Karion-Lösung	StabilCoat 1:4 in dest. Wasser	Coating Stabilizer in 20% Karion-Lsg.	Coating Stabilizer pur
OD Std 0 nmol/l	0,147	0,147	0,158	0,149
OD Std 0,25 nmol/l	0,166	0,202	0,196	0,178
OD Std 0,75 nmol/l	0,413	0,475	0,494	0,480
OD Std 2,5 nmol/l	1,113	1,271	1,327	1,319
OD Std 8 nmol/l	2,621	2,999	2,947	2,938
S/N Verhältnis [1]	17,8	20,4	18,7	19,7
ED20% [nmol/l]	1,343	1,228	1,225	1,236
ED50% [nmol/l]	3,205	3,208	3,003	2,995
ED80% [nmol/l]	5,667	5,715	5,486	5,462
Kontrolle 1 [nmol/l]				
Mittelwert von n=10	0,473	0,452	0,486	0,513
Standardabweichung	0,018	0,024	0,042	0,035
Variationskoeffizient %	3,8	5,2	8,7	6,8
Positive Seren				
120521-308 [nmol/l]	1,860	1,803	1,886	2,109
120828-126 [nmol/l]	0,971	0,898	0,938	1,130
120614-188 [nmol/l]	1,707	1,744	1,837	1,978

Tabelle 10A: Messergebnisse der mit unterschiedlichen Stabilisierungslösungen behandelten Mikrotiterplatten nach Trocknung. Die Standardkurven (ED20, 50, 80% -Konzentration bei 20, 50 und 80% der maximalen OD) und Signalhöhen waren recht ähnlich bei allen Lösungen, das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N: OD Std 8 nmol/l / OD Std 0 nmol/l) daher ebenfalls. Bei Verwendung der beiden StabilCoat enthaltenden Stabilisatoren wird eine gute Präzision bei der 10-fach Bestimmung des Kontrollserums 1 gefunden.

Verwendete Stabilisierungslösung	StabilCoat in 20% Karion-Lösung	StabilCoat 1:4 in dest. Wasser	Coating Stabilizer in 20% Karion-Lsg.	Coating Stabilizer pur
Messung der Seren von 29 Blutspendern [nmol/l]				
1	0,333	0,189	0,207	0,328
2	0,000	0,000	0,000	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,117
4	0,047	0,007	0,081	0,060
5	0,000	0,206	0,000	0,049
6	0,000	0,000	0,000	0,044
7	0,066	0,156	0,040	0,086
8	0,285	0,232	0,127	0,226
9	0,086	0,000	0,000	0,012
10	0,471	0,461	0,491	0,661
11	0,080	0,000	0,031	0,042
12	0,174	0,123	0,108	0,192
13	0,000	0,000	0,000	0,000
14	0,108	0,252	0,098	0,124
15	0,285	0,128	0,126	0,211
16	0,263	0,129	0,115	0,224
17	0,110	0,112	0,090	0,149
18	0,017	0,000	0,000	0,019
19	0,000	0,000	0,015	0,040
20	0,143	0,155	0,084	0,175
21	0,023	0,031	0,000	0,078
22	0,008	0,211	0,049	0,068
23	0,000	0,055	0,000	0,073
24	0,000	0,000	0,000	0,056
25	0,000	0,011	0,000	0,079
26	0,000	0,000	0,000	0,003
27	0,000	0,002	0,000	0,032
28	0,330	0,426	0,459	0,613
29	0,011	0,000	0,000	0,028
Mittelwert [nmol/l]	0,098	0,100	0,073	0,131
Standardabw.[nmol/l]	0,132	0,128	0,124	0,162
Variationskoeffizient [%]	135	129	170	124
Mittelwert +3Standardabw. nmol/l	0,495	0,484	0,446	0,617

Tabelle 10B: Ergebnisse der mit unterschiedlichen Stabilisierungslösungen behandelten Mikrotiterplatten nach Trocknung. Angegeben sind die Anti-AChR-Antikörper-Serumkonzentrationen von 29 Blutspendern. Unter der Annahme einer Normalverteilung der Antikörperkonzentration in den Blutspendenserien ergeben sich die oberen Grenzen des Normalbereichs bei der Summe der Mittelwerte plus 3 Standardabweichungen. Werte > 0,500 nmol/l wurden rot hervorgehoben.

Trocknen: Nach Ablauf der Inkubation mit den Stabilisierungslösungen von 5 bis 15 Minuten wurden die MT-Platten kräftig ausgeschlagen und 16 – 24h an der Luft getrocknet. Danach wurden die Platten in Siegelrandbeutel aus Aluminium mit 2

Trockenbeuteln verpackt und eingeschweißt. Gegenüber der Lufttrocknung ergab die Trocknung in einem Vakuumschrank keine Verbesserungen.

Homogenität der Beschichtung: Die mit den vorgenannten Reagenzien und dem beschriebenen Beschichtungsverfahren hergestellten MT-Platten wurden hinsichtlich der Präzision innerhalb einer Platte untersucht. Aliquote einer Probe mit einer Konzentration im mittleren Bereich der Standardkurve (1-3 nmol/l) wurde nach der 1:26-Verdünnung in alle Vertiefungen der MT-Platte pipettiert und der Assay wurde gemäß 2.8 (Testdurchführung des neu entwickelten Anti-AChR-Ak ELISA) weiter durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	MW Reihe	VK % Reihe
A	0,786	0,772	0,793	0,745	0,722	0,722	0,752	0,717	0,763	0,739	0,744	0,736	0,749	3,4%
B	0,763	0,732	0,745	0,755	0,739	0,717	0,742	0,734	0,759	0,725	0,745	0,746	0,742	1,8%
C	0,764	0,746	0,755	0,743	0,743	0,705	0,742	0,737	0,761	0,719	0,701	0,741	0,738	2,7%
D	0,732	0,734	0,748	0,764	0,759	0,707	0,739	0,755	0,750	0,698	0,740	0,732	0,738	2,7%
E	0,745	0,707	0,748	0,748	0,739	0,749	0,738	0,741	0,764	0,718	0,722	0,745	0,739	2,1%
F	0,751	0,741	0,705	0,727	0,741	0,702	0,750	0,743	0,780	0,715	0,720	0,733	0,734	3,0%
G	0,852	0,720	0,739	0,739	0,760	0,712	0,732	0,742	0,766	0,707	0,723	0,767	0,747	5,2%
H	0,900	0,790	0,740	0,769	0,869	0,741	0,741	0,787	0,819	0,746	0,740	0,758	0,783	6,9%
MW Spalte	0,787	0,743	0,747	0,749	0,759	0,719	0,742	0,745	0,770	0,721	0,729	0,745	n=96	
VK % Spalte	7,4%	3,9%	3,2%	1,8%	6,1%	2,4%	0,9%	2,7%	2,8%	2,2%	2,1%	1,7%	0,746	4,2%

Tabelle 11: Optische Dichten gemessen mit der vorletzten Mikrotiterplatte dieser Beschichtung (Nr.159). In alle Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (n=96) wurde ein Aliquot derselben Serumprobe pipettiert und im Anti-AChR-AK Elisa gemessen. Der OD-Mittelwert aller Proben (n=96) beträgt 0,746 und der Variationskoeffizient über die gesamte Platte beträgt 4,2% (rechts unten).

MW: Mittelwert; VK: Variationskoeffizient

Werte rot hinterlegt \geq Mittelwert + 1*Standardabweichung

Werte blau hinterlegt \leq Mittelwert - 1*Standardabweichung

Bei einer Probebeschichtung von 160 MT-Platten wurden je eine Platte vom Anfang, der Mitte und vom Ende des Beschichtungs Vorgangs untersucht, die Variationskoeffizienten der optischen Dichten wurden in der genannten Reihenfolge mit 3,2%, 5,1% und 4,2% ermittelt. Die Mittelwerte (n=96) der optischen Dichten (OD) wurden mit 0,693, 0,758 und 0,746 berechnet. In der Tabelle 11 ist die vorletzte Platte (Nr. 159) dieser Produktion gezeigt, die Präzision ist mit einem Variationskoeffizient von 4,2% sehr gut, ein leichter Randeffekt ist zu sehen.

Die Homogenität einer Plattencharge wurde durch den Ansatz einer Standardkurve und der Kontrollen auf jeder 20. Platte der Beschichtung geprüft (siehe Tabelle 12). Alle Werte lagen innerhalb der zuvor ermittelten Sollbereiche.

	Platte 20	Platte 40	Platte 60	Platte 80	Platte 100	Platte 120	Mittelwert	VK%
OD Std 0 nmol/l	0,210	0,207	0,225	0,220	0,231	0,249	0,224	6,9
OD Std 0,25 nmol/l	0,413	0,413	0,425	0,433	0,448	0,464	0,433	4,7
OD Std 0,75 nmol/l	0,61	0,602	0,638	0,652	0,633	0,684	0,637	4,7
OD Std 2,5 nmol/l	1,412	1,354	1,488	1,430	1,423	1,488	1,433	3,5
OD Std 8 nmol/l	3,089	3,05	3,108	3,156	3,142	3,189	3,122	1,6
K1 (nmol/l)	0,311	0,296	0,280	0,261	0,254	0,284	0,281	7,6
K2 (nmol/l)	2,083	2,151	2,029	2,051	2,016	2,132	2,077	2,7
ED20%	1,048	1,080	1,007	1,032	1,065	1,011	1,041	2,8
ED50%	3,170	3,261	2,992	3,189	3,222	3,123	3,160	3,0
ED80%	5,847	5,943	5,660	5,896	5,905	5,830	5,847	1,7

Tabelle 12: Homogenität des Beschichtungsvorgangs. Aus einer Beschichtung wurde je ein Streifen (8 Vertiefungen) von jeder 20. Mikrotiterplatte in einem gemeinsamen Testlauf im Anti-AChR-AK ELISA untersucht. ED20,50,80%: Konzentration bei 20, 50 und 80% der maximalen Optischen Dichte (OD), K1,2 Kontrollseren, VK% Variationskoeffizient in Prozent.

Die statistische Auswertung des Homogenitätstestes ergab für die Standards 0, 0,75 und 2,5 nmol/l sowie für K1, K2 und ED50% p-Werte größer als das Signifikanz-Niveau $\alpha = 0,05$ (5%), damit wurde die Null-Hypothese (Platten sind homogen) bestätigt. Die OD der Standards 0,25 nmol/l und 8 nmol/l erfüllten diese Anforderung nicht, die OD nimmt bei beiden Standards statistisch signifikant mit der Plattennummer (bzw. mit späteren Zeitpunkten der Beschichtung, siehe Abbildung 14) zu. Die geringe Zunahme um ca. 80 milli-OD beim Standard 8 nmol/l hat keine Auswirkung auf die Bestimmung der Kontrollen und des Kurvenparameters ED50%, da alle OD-Werte moderat gestiegen sind.

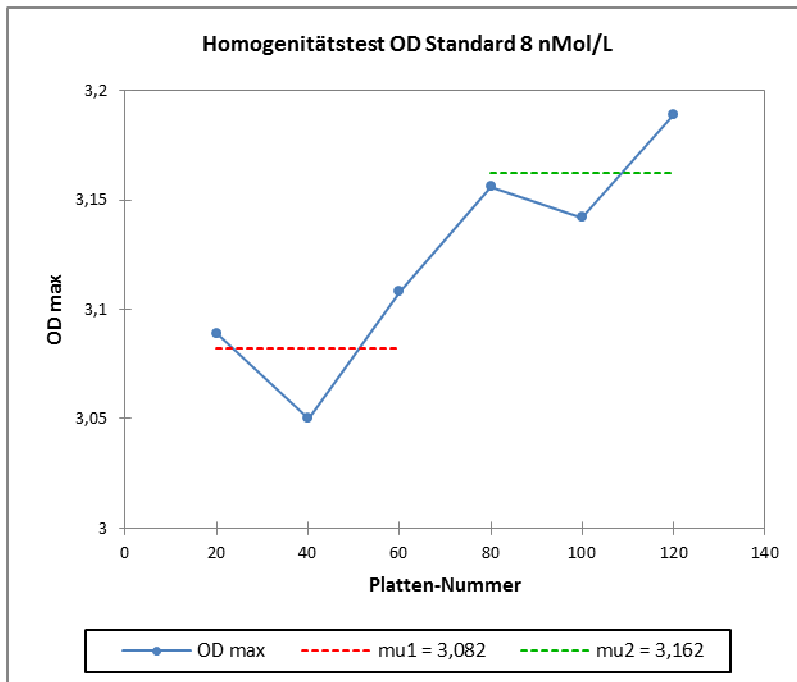


Abbildung 14: Homogenitätstest einer Plattencharge

Mit dem „standard normal homogeneity test“ (SNHT, Softwarepaket XLStat) wurde geprüft, ob die Werte einer Zeitreihe (OD des Standards 8 nmol/l jeder fortlaufenden 20. Platte des Beschichtungsprozesses) als homogen über die Zeit hinweg bezeichnet werden kann oder ob ein Zeitpunkt existiert, an dem eine Verschiebung der Zeitreihe vorliegt. μ_1 : berechnetes Messniveau (OD), das sich vom Messniveau zu einem späteren Zeitpunkt μ_2 unterscheidet, OD_{max}: OD des Standards 8 nmol/l.

3.5 Ergebnisse der Testoptimierung

3.5.1 Konjugat

Zum Nachweis der humanen Ak, die sich an die Rezeptoren auf der Mikrotiterplatte gebunden haben, wurde ein mit einem Enzym konjugiertes, gegen humanes Immunglobulin G gerichtetes Antiserum verwendet. Mit einem üblichen Anti-human-IgG-Peroxidase-Konjugat ließ sich kein ausreichend hohes Signal erreichen. Es wurden die Konjugate unterschiedlicher Hersteller getestet, dabei zeigte sich ein zu geringes Signal des höchsten Standards 8 nmol/l (OD_{max}) und ein zu hoher Hintergrund, d. h. eine zu hohe unspezifische Bindung. Eine Zugabe von Maus-IgG oder Ziege-IgG zum Konjugat-Puffer verringerte die unspezifischen Bindungen nicht, so dass auch keine hohen Konzentrationen der Konjugate eingesetzt werden konnten. Bei einer schwach positiven Probe (Cut-off 0,5 nmol/l) beträgt der Anteil der humanen Ak, die gegen Acetylcholinrezeptoren gerichtet sind, nur ca. 1:100.000 der Gesamt-IgG-

Konzentration. Deshalb war ein Amplifikationssystem zur ausreichenden Generierung des Signals (OD_{max}) notwendig.

Das Konjugat der Firma SDT GmbH, Baesweiler bestehend aus einem monoklonalen Anti-human-IgG, gekoppelt mit einer Polyperoxidase, zeigte gute Ergebnisse. Der gegen das Fc-Fragment des humanen IgG gerichtete monoklonale Antikörper ist mit 200 untereinander vernetzten Peroxidasen konjugiert und lieferte in der 1:10.000-Verdünnung der 1mg/ml-Stocklösung nach 15 Minuten Substratreaktion ein Signal von $OD_{2,0-3,0}$ (OD_{max}). Das Hintergrundsignal des Nullstandards wurde damit bei 150-250 mOD gefunden, so dass sich ein Signal-Rausch-Verhältnis von >10 ergibt. Mit einem speziellen Konjugatpuffer (50mM Mops – Morpholinopropan-Sulfonsäure; pH 7,0 und weiteren Zusätzen) konnte das gebrauchsfertige Konjugat für eine Lagerung bei 4°C über ein Jahr stabilisiert werden.

3.5.2 Probenpuffer

Im ersten Schritt des neu zu entwickelnden ELISA sollen sich die AAK der Standards, Patienten- und Kontrollseren an die auf der MT-Platte immobilisierten Antigene binden. Eine Verdünnung der Probe im Assay war notwendig, da die MT-Platte auch mit geringen Volumina der unverdünnten Probe überladen war und zu hohe unspezifische Bindungen und Matrixeffekte zeigte. Aufgrund der hohen Stärke des Signals mit dem Poly-Peroxidase-Konjugat und der guten Empfindlichkeit des Assays konnte eine Verdünnung der Proben von ca. 1:20 bis 1:30 gewählt werden, hiervon wurden dann 100 μ l in die Vertiefungen pipettiert.

Um zu verhindern, dass sich humane anti-Maus-Ak (HAMA) an die monoklonalen Maus-Ak an der MT-Platte binden, wurde die Zugabe verschiedener Mengen an Mausserum zum Probenverdünner getestet. Daraufhin reagierten die HAMA bereits mit den in der flüssigen Phase vorliegenden Maus-IgG und nur in stark reduziertem Maße mit dem Maus-IgG an der festen Phase. Eine Konzentration von 4% Mausserum (Normalwert IgG im Mausserum ca. 10g/l) im Probenverdünner erwies sich als ausreichend. Gereinigtes Maus-IgG, Verdünnungen eines monoklonalen Antikörpers (gerichtet gegen andere Epitope als reines Maus IgG) oder ein kommerzieller HAMA-Blocker (monoklonales IgG, SDT GmbH, Baesweiler) ergaben demgegenüber keine Verbesserung.

Um unspezifische Reaktionen der Probenmatrix mit den auf der MT-Platte vorhandenen Proteinen weiter zu reduzieren, wurden erhöhte Salz- und Protein-konzentrationen im Probenpuffer untersucht. Eine Erhöhung der Salzkonzentration von 9g/l auf 25g/l im Probenpuffer und die Zugabe von 10% fötalem Kälberserum verbesserte den Hintergrund und das Signal-Rausch-Verhältnis weiter und hatte bessere Ergebnisse bei der Wiederfindung in Spike- und Verdünnungsversuchen zur Folge.

Bei Verdünnungsversuchen positiver Proben (über die Vorverdünnung hinaus) wurde bei einigen Proben ein nichtlinearer Verdünnungsverlauf festgestellt. Vermutet wurde, dass ein großer Teil der positiven Seren durch immunsuppressive Behandlung oder Plasmapherese der Patienten eine geringere Konzentration von Immunglobulinen als Seren von Normalpersonen aufwies. Eine Zugabe von 1 bis 2% eines humanen Normalserums oder Normalplasmas zum Probenpuffer konnte die Matrixunterschiede in Standards und Proben ausgleichen und führte zu einer verbesserten Verdünnungslinearität (siehe Tabelle 13).

Probennummer	Verdünnung 1:X	Gemessene Konzentration [nmol/l]	Berechnete Konzentration [nmol/l]	Wiederfindung %
120305-331	1	4,51	4,51	
	2	1,95	3,89	86,4%
	4	1,08	4,30	95,5%
	8	0,62	4,94	109,6%
120614-304	1	2,65	2,65	
	2	1,18	2,36	89,0%
	4	0,65	2,59	97,5%
120316-229	1	2,41	2,41	
	2	1,29	2,57	106,5%
	4	0,61	2,44	101,1%
120613-298	2	4,81	9,62	
	4	2,35	9,40	97,7%
	8	1,15	9,16	95,2%
	16	0,64	10,22	106,3%

Tabelle 13: Verdünnungsverhalten positiver Proben

Nach einer Vorverdünnung der Standards und Proben von 1:26 wurden diese weiter mit Probenpuffer verdünnt. Die Verdünnungslinearität wurde unter Zusatz von 2% Normal-plasma im Probenpuffer ermittelt. Eine systematische Abweichung der Verdünnungen vom berechneten Sollwert war nicht erkennbar, die Werte der Verdünnungen wurden in einem Intervall $\pm 15\%$ wiedergefunden.

Insbesondere stark positive Proben müssen verdünnt werden, da die Konzentrationen außerhalb der Standardkurve liegen. Für die Verlaufskontrolle der Patienten soll zum Erkennen einer Krise oder nötiger Behandlungsschritte die Autoantikörperkonzentration so genau wie möglich bestimmt werden. Diese Verlaufskontrollen stellen auch einen Großteil des zukünftigen Probenkollektivs dar.

Eine weitere Verringerung unspezifischer Reaktionen von Patientenproben sollte durch die Komplexierung von Rheumafaktoren, vorwiegend Immunglobuline M (IgM), erfolgen. Hierzu wurde Ziege-Anti-human-IgM in verschiedenen Konzentrationen zum Probenpuffer gegeben. Die Proben wurden darin 1:26 verdünnt, 10 Minuten vorinkubiert und anschließend in die Platte pipettiert. Dabei zeigte sich eine Titerabhängige Eintrübung in den Vertiefungen. Das Hintergrundsignal erhöhte sich ebenso konzentrationsabhängig in den Standards und Proben, damit verschlechterte sich das Signal-Rausch-Verhältnis mit zunehmender Anti-IgM-Ak-Konzentration. Die Proben von Blutspendern wurden in ähnlicher Konzentration und Verteilung gemessen wie ohne Zugabe des Anti-human-IgM-Serums. Das im Probenpuffer enthaltene humane IgG (1% Normalplasma im Probenverdünner) und bovines IgG aus dem fötalen Kälberserum sind offenbar ausreichend, um eine Komplexierung von IgM mit dem spezifisch an der Festphase gebundenen humanen IgG zu verhindern.

3.5.3 Kinetik

Zur Optimierung der Inkubationszeiten hinsichtlich Nachweisempfindlichkeit, Signal-Rausch-Verhältnis und Zeitbedarf wurden verschiedene Zeiten der Proben- und Konjugatinkubation kombiniert (siehe Tabelle 14). Nach 90 Minuten Probeninkubation bei 37°C ist das Signal im Standard 8 nmol/l bereits in der Sättigung und steigt auch nach 120 oder 180 Minuten nur noch gering an. Das Signal-Rausch-Verhältnis ist bei einer Probeninkubation von 60 bis 90 Minuten etwas höher als nach längeren Inkubationen. Trotz leichter Zunahme der OD der Standards bei längeren Probeninkubationszeiten ändert sich der Standardkurvenverlauf bezogen auf den höchsten Standard in OD/ODmax% nur geringfügig (siehe Abbildung 15), d. h. mit längeren Probeninkubationszeiten wurde kein hoher Sensitivitätsgewinn erreicht.

Proben-inkubation	180 Minuten			120 Minuten			90 Minuten			60 Minuten		
	1,5h	1h	0,5h	1,5h	1h	0,5h	1,5h	1h	0,5h	1,5h	1h	0,5h
Konjugat-Inkubation												
OD Std 0 nmol/l	0,301	0,233	0,138	0,255	0,205	0,136	0,249	0,188	0,126	0,212	0,214	0,125
OD Std 0,25 nmol/l	0,478	0,345	0,219	0,381	0,305	0,185	0,354	0,273	0,155	0,314	0,279	0,178
OD Std 0,75 nmol/l	0,693	0,513	0,334	0,601	0,444	0,265	0,535	0,387	0,230	0,437	0,406	0,245
OD Std 2,5 nmol/l	1,773	1,323	0,806	1,482	1,128	0,680	1,353	1,018	0,561	1,162	1,055	0,604
OD Std 8 nmol/l	3,370	2,888	1,986	3,267	2,726	1,761	3,119	2,572	1,509	2,759	2,646	1,765
Probenpuffer pur	0,191	0,150	0,102	0,202	0,134	0,091	0,246	0,125	0,079	0,142	0,122	0,081
Diff. zw. Std 0,25 und Std 0 nmol/l	0,178	0,112	0,081	0,127	0,101	0,050	0,105	0,086	0,030	0,102	0,066	0,053
Std 8 nmol/l / Probenpuffer	17,6	19,3	19,5	16,2	20,3	19,4	12,7	20,6	19,1	19,4	21,7	21,8
ED 20%	1,04	1,25	1,36	1,22	1,40	1,58	1,34	1,51	1,68	1,42	1,55	1,77
ED 50%	2,65	3,10	3,56	3,14	3,46	3,67	3,29	3,57	3,83	3,36	3,55	4,11
ED 80%	5,09	5,57	6,08	5,67	5,93	6,06	5,77	5,99	6,19	5,80	5,93	6,43

Tabelle 14: Messwerte (OD) der Standards nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Die fett gedruckten Werte wurden mit den als optimal betrachteten Inkubationszeiten gemessen.
ED20,50,80% :Konzentration bei 20, 50 und 80% der maximalen Optischen Dichte (OD).

Das beste Signal-Rausch-Verhältnis wurde nach einer Konjugatinkubation von einer halben bzw. einer Stunde erhalten, unabhängig von der Dauer der Probeninkubation. Die Signalhöhe des höchsten Standards (8 nmol/l) ist nach 90-minütiger Probeninkubation und einer Stunde Konjugatinkubation ausreichend (> 2,0 OD), die Differenz zwischen OD Standard 0,25 und 0,0 nmol/l ist gegenüber einer Einwirkdauer des Konjugates von 90 Minuten nur noch gering höher (105 gegenüber 86 mOD). Daher wurde die Probeninkubation auf 90 Minuten begrenzt und das Konjugat inkubiert für 60 Minuten.

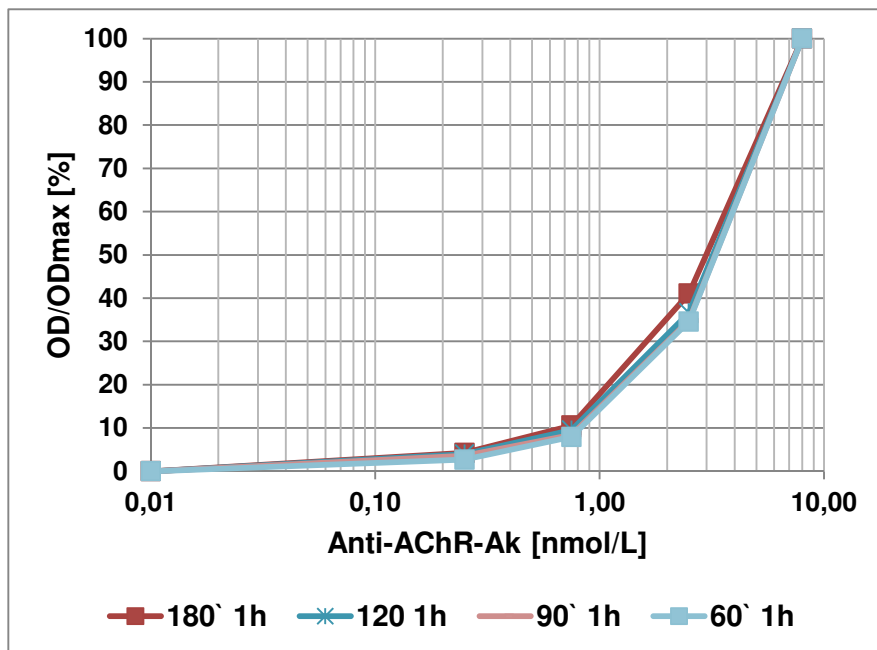
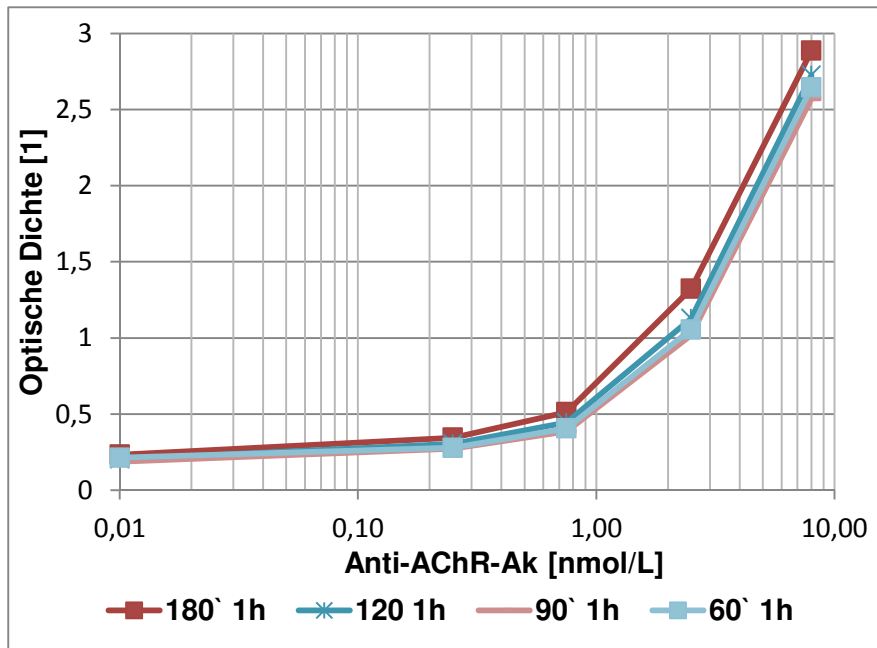


Abbildung 15: Diagramm der Standardkurven bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (180' 1h = 180 Minuten Probeninkubation, 1 Stunde Konjugatinkubation), dargestellt in OD (oben) und OD/ODmax% (unten) gegen die Konzentration der Anti-AChR-AK.

3.6 Validität des neu entwickelten Anti-AChR-Ak ELISA

Zur Überprüfung der Methode und zur Ermittlung technischer Kenndaten wurde das neu entwickelte Testsystem umfangreich getestet. Zur Validierung des Anti-AChR-Ak ELISA wurde das Inkubationsschema gemäß Methodenteil 2.8 befolgt.

Folgende Probenmaterialien können im vorliegenden ELISA eingesetzt werden: menschliches Serum sowie humanes EDTA-, Heparin- und Zitratplasma.

3.6.1 Messbereich und Standardkurve

Zur Ermittlung der analytischen Sensitivität wurden in einem Testansatz aus der Mehrfachbestimmung des Nullstandards der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Messung:	OD Nullstandard	Messung:	OD Nullstandard
1	0,261	11	0,270
2	0,255	12	0,261
3	0,261	13	0,265
4	0,265	14	0,257
5	0,264	15	0,265
6	0,254	16	0,281
7	0,262	17	0,316
8	0,277	18	0,317
9	0,293	19	0,304
10	0,308	20	0,270
Mittelwert (x):			0,275
Standardabweichung (SD):			0,021
X +3*SD:			0,338
Konzentration der unteren Nachweisgrenze aus der Standardkurve			0,088 nmol/l

Tabelle 15: Bestimmung der Nachweisgrenze. Die Optische Dichte des Nullstandards (0 nmol/l) wurde 20-fach im Anti-AChR-AK ELISA bestimmt und der Mittelwert und die Standardabweichung wurden berechnet. Die Summe aus Mittelwert-OD plus 3 Standardabweichungen wurde berechnet und mit der Standardkurve ausgewertet.

Aus der Summe aus Mittelwert-OD plus dreifacher Standardabweichung wurde mit dem Ablesen der entsprechenden Konzentration aus der Standardkurve der geringste eindeutig erfassbare Antikörpertiter ermittelt.

Die untere Nachweisgrenze ist definiert als die erste von Null unterscheidbare Konzentration einer Probe. Die gefundene Konzentration von 0,088 nmol/l ist ausreichend, um bei einem Grenzwert von 0,5 nmol/l zuverlässig zu messen. Dies wurde im Folgenden durch die funktionelle Sensitivität bestätigt.

Mit der funktionellen Sensitivität („limit of quantitation“) wird die geringste Konzentration angegeben, ab der mit einer gewählten Präzision Proben quantifiziert werden können. Die funktionelle Sensitivität wurde mit der Inter-Assay-Variabilität (n=10) niedrig konzentrierter Proben ermittelt (Präzisionsprofil). Die Variationskoeffizienten wurden gegen die Konzentration aufgetragen und mit der Funktion höchster Regression (Potenzfunktion, $R = 0,966$) ausgewertet (siehe Abbildung 16). Aus der Regressionskurve wird die Konzentration mit einem Variationskoeffizient von 20% ermittelt. Die Vorgehensweise entsprach der Richtlinie vom Clinical and Laboratory Standards Institute (Protocol for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A, 2004). Die geringste Konzentration, die mit einem Variationskoeffizienten kleiner als 20% bestimmt werden kann, ist 0,182 nmol/l.

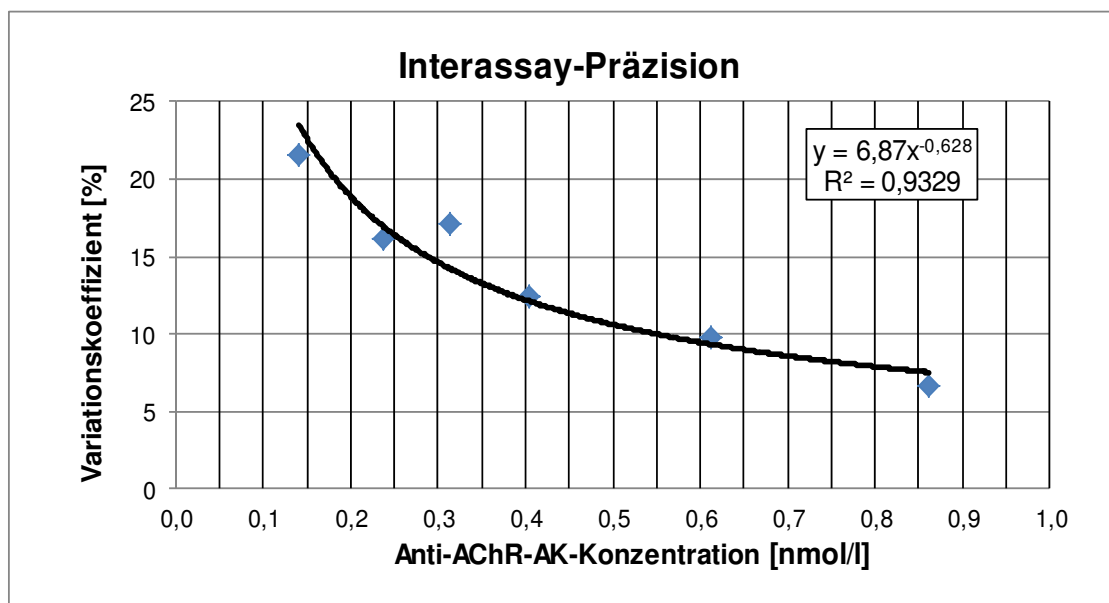


Abbildung 16: Funktionelle Sensitivität. Aus 10 Testläufen wird die Präzision der Anti-AChR-AK-Konzentrationsbestimmung niedriger Serumproben berechnet und gegen die Konzentration aufgetragen (Präzisionsprofil). Der Konzentrationswert bei einem Variationskoeffizient von 20% kann aus der Funktionsgleichung der Regressionskurve berechnet werden.

Eine Standardkurve mit 5 Standards wurde durch unterschiedlich starkes Spiken einer hochkonzentrierten Anti-AChR-Ak-Probe zu einem Nullserum erstellt. Der Messbereich wurde auf 0-8 nmol/l eingestellt (Tabelle 16). Das Ablesen unverdünnter Proben anhand der Standardkurve ist im Bereich 0,182 nmol/l (funktionelle Sensitivität) bis 8 nmol/l sinnvoll. Für verdünnte Proben wird ein Bereich von 0,25 bis 6,0 nmol/l vorgeschlagen.

Nach dem Auftragen der gemessenen Extinktionen der 5 Standards in einem Koordinatensystem (siehe Abbildung 17: X-Achse logarithmisch / Y-Achse linear) kann eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die Anti-Acetylcholinrezeptor-AK-Konzentrationen der unbekanntenen Proben ermittelt wurden. Zur computergesteuerten Berechnung der sigmoiden Standardkurve wurde das Auswerteverfahren 4-Parameter-Logistik gewählt (siehe 2.9).

Probe	OD1	OD2	OD Mittelwert	B/Bmax (%)	Konzentration nmol/l
Standard 1	0,148	0,168	0,158	0,0	0,00
Standard 2	0,212	0,222	0,217	2,6	0,25
Standard 3	0,375	0,390	0,383	9,9	0,75
Standard 4	0,973	0,996	0,985	36,3	2,50
Standard 5	2,377	2,492	2,435	100,0	8,00

Tabelle 16: Typische Werte einer Standardkurve.

Angegeben sind die Werte einer Doppelbestimmung (OD1, OD2) in dem Anti-AChR-Ak ELISA. B/Bmax: Von allen ODs werden die OD des Nullstandards subtrahiert und durch den um die OD des Nullstandards verringerten Wert des Standards 8 nmol/l geteilt und in Prozent angegeben.

Für die Berechnung der Äquivalentdosen bei 20%, 50% und 80% Bindung ist eine Berechnung der Extinktionen bezogen auf den höchsten Standard (B/Bmax%) notwendig. Hierbei wurden zuvor von allen Extinktionen die Extinktionen des Nullstandards abgezogen. Der ED50% ist der x-Wert für den Kurvenpunkt, der auf halbem Weg zwischen dem maximalen und minimalen Signal liegt und der eine Abschätzung über die Steilheit der Kurve zulässt.

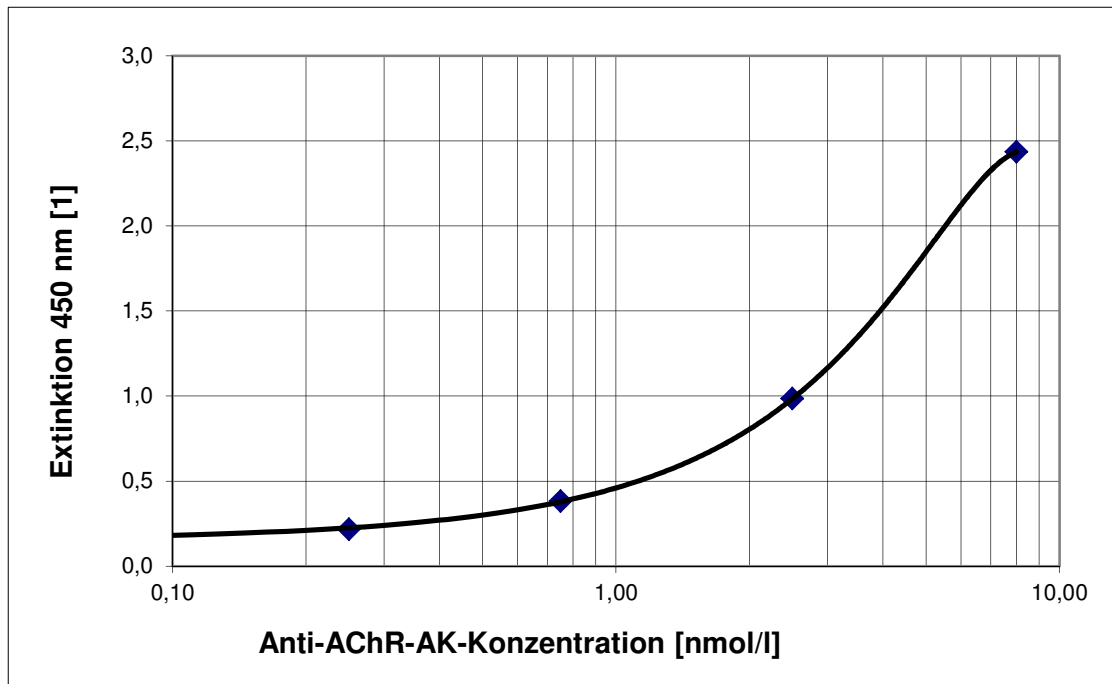


Abbildung 17: Typisches Beispiel der sigmoiden Standardkurve des Anti-AChR-Ak ELISA. Aufgetragen ist die Extinktion (optische Dichte) der Standards bei 450nm gegen die Konzentration der Standards.

3.6.2 Reproduzierbarkeit

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten, d. h. die Präzision einer Mehrfachbestimmung in einem Ansatz oder in mehreren Ansätzen, mit 4 über den Messbereich verteilten Seren ermittelt. Den Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten liegen jeweils 15 Bestimmungen zugrunde.

Intra-Assay-Variation, n = 1*15			Inter-Assay-Variation, n = 15*1		
Serum	Mittelwert (nmol/l)	VK (%)	Serum	Mittelwert (nmol/l)	VK (%)
1	0,254	13,2	1	0,311	13,6
2	0,843	7,1	2	0,914	8,9
3	2,176	6,6	3	2,329	10,9
4	5,349	6,1	4	5,562	6,8

Tabelle 17: Präzision des Anti-AChR-Ak ELISA

Intra-Assay-Variation: Bestimmung in einem Test in 15-fach-Bestimmung

Inter-Assay-Variation: 15 Testläufe mit Einfachbestimmungen

VK: Variationskoeffizient (Standardabweichung / Mittelwert in %).

Siehe auch Datenblatt A_1435_D_DE_A02 der EUROIMMUN AG.

3.6.3 Verdünnungslinearität

Zur Prüfung der Linearität wurden 5 Proben, nach der 1:26-Vorverdünnung, weiter mit Probenpuffer verdünnt. Eine quantitative Bestimmung der Anti-AChR-Ak-Konzentration ist im gut ablesbaren Bereich der Standardkurve von 0,25 bis ca. 6,0 nmol/l sinnvoll. In diesem Bereich beträgt die Wiederfindung 75-125%.

Probe	Verdünnung 1 : X	Gemessene Konzentration [nmol/l]	Berechnete Konzentration [nmol/l]	Wiederfindung [%]
120614-304	1	1,65	1,65	
	2	0,86	1,72	104,3%
	4	0,43	1,72	104,3%
	8	0,23	1,82	110,4%
120613-298	1	5,55	5,55	
	2	2,79	5,58	100,4%
	4	1,42	5,68	102,4%
	8	0,77	6,12	110,2%
	16	0,40	6,38	115,0%
120305-331	1	4,52	4,52	
	2	2,22	4,45	98,5%
	4	1,11	4,43	98,0%
	8	0,59	4,74	105,0%
	16	0,28	4,51	99,9%
120316-229	1	2,53	2,53	
	2	1,24	2,47	98,0%
	4	0,66	2,62	103,9%
	8	0,29	2,34	92,5%
	16	0,12	1,94	76,7%
120202-255	1	5,54	5,54	
	2	2,21	4,43	79,9%
	4	1,09	4,35	78,4%
	8	0,56	4,46	80,5%
	16	0,27	4,27	77,1%
		Mittelwert		98,1%

Tabelle 18: Verdünnung Anti-AChR-Ak-positiver Proben

3.6.4 Interferenzen

Der Einfluss der Präanalytik auf das Messergebnis im ELISA, insbesondere die fehlerhafte Gewinnung von hämolytischen, lipämischen und ikterischen Proben, wurde untersucht. Dazu wurden einigen Proben, deren Anti-AChR-Ak-Konzentrationen über den Messbereich des ELISA verteilt waren, Hämoglobin, Triglyzeride oder Bilirubin zugesetzt. Bis zu einem Zusatz von 2 mg/ml Hämoglobin, von 20 mg/ml Triglyceriden oder von 0,4 mg/ml Bilirubin wurden keine stark abweichenden (>15%) Werte gegenüber den ursprünglichen Konzentrationen festgestellt. Die Normalwerte für Hämoglobin in Serum oder Plasma sind <50mg/l, für Tri-Glyzeride <200 mg/dl und für Bilirubin < 11µg/ml (L. Thomas et al., 1992).

3.6.5 Klinische Sensitivität und Spezifität

Zur Bestimmung des Referenzbereiches der gesunden Personen wurde das Zitratplasma von 151 Blutspendern gemessen. Die als gesund angenommenen Blutspender zeigten Anti-AChR-Antikörperkonzentrationen bis 0,86 nmol/l, der Mittelwert betrug 0,18 nmol/l mit einer Standardabweichung von 0,18 nmol/l. Der Median war 0,14 nmol/l und die 95. Perzentile wurde mit 0,49 nmol/l festgestellt (siehe Tabelle 19 und Abbildung 18).

Mittelwert (MW): 0,18 [nmol/l]	90. Perzentil: 0,42 [nmol/l]
Standardabweichung (Stdabw.): 0,18 [nmol/l]	91. Perzentil: 0,43 [nmol/l]
MW + 1 Stdabw.: 0,35 [nmol/l]	92. Perzentil: 0,44 [nmol/l]
MW + 2 Stdabw.: 0,53 [nmol/l]	93. Perzentil: 0,47 [nmol/l]
MW + 3 Stdabw.: 0,70 [nmol/l]	94. Perzentil: 0,47 [nmol/l]
MW + 5 Stdabw.: 1,06 [nmol/l]	95. Perzentil: 0,49 [nmol/l]
Median: 0,14 [nmol/l]	96. Perzentil: 0,52 [nmol/l]
Prävalenz bei Cut-off von 0,50 [nmol/l]: 4,64%	97. Perzentil: 0,62 [nmol/l]
	98. Perzentil: 0,65 [nmol/l]
	99. Perzentil: 0,84 [nmol/l]
	100. Perzentil: 0,86 [nmol/l]

Tabelle 19: Prävalenz-Analyse des Anti-AChR-Ak ELISA. Aus den Antikörperkonzentrationen von 151 Blutspendern wurde der Mittelwert (MW) von 0,18 nmol/l ermittelt sowie die Standardabweichung (Stdabw.). Der Median unterschied sich vom Mittelwert, was einen Hinweis auf nicht normalverteilte Werte gibt. In der Tabelle rechts sind die Konzentrationen gegeben, die 90-100% des Kollektivs unterschreiten. Als Obergrenze für den Normalbereich wird häufig das 95. Perzentil gewählt.

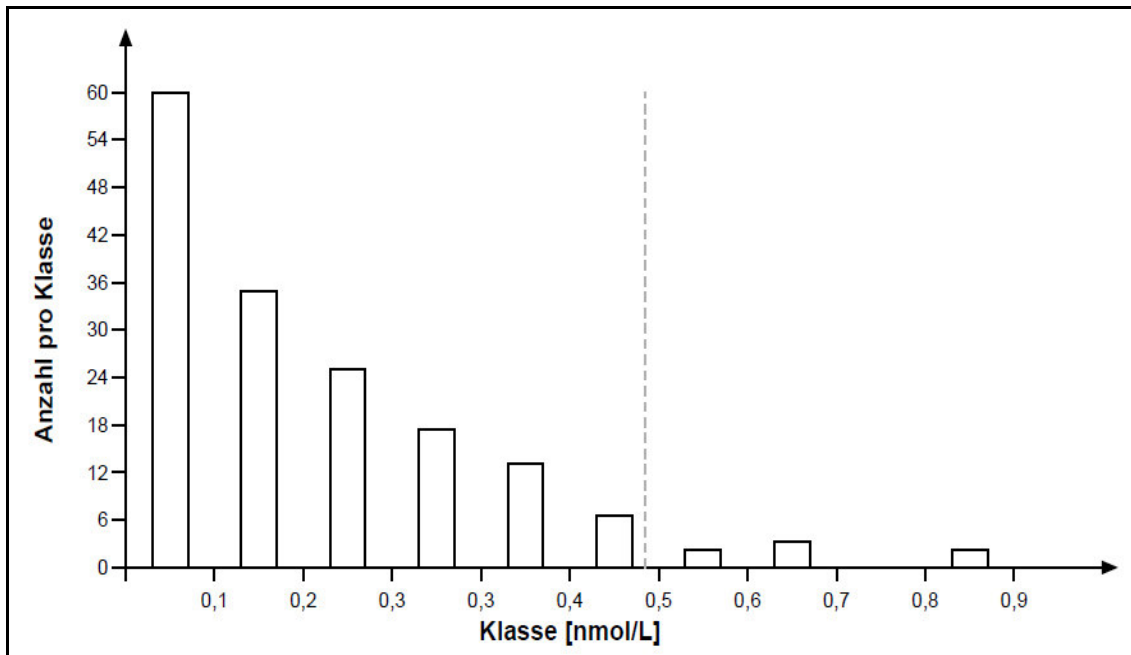


Abbildung 18: Prävalenz-Analyse mit dem Anti-AChR-Ak ELISA bei 151 gesunden Blutspendern. In der Häufigkeitsverteilung wird die Anzahl der in der jeweiligen Klasse (Klassenbreite 0,1 nmol/l) gefundenen Proben gegen die Konzentration aufgetragen. Die Verteilung ist nicht symmetrisch.

Die Spezifität bezogen auf Proben gesunder Blutspender betrug bei einem Cut-Off von 0,5 nmol/l 95,36%. Folgende Befundinterpretation wird vorgeschlagen:

<0,40 nmol/l: negativ

≥0,40 bis <0,50 nmol/l: grenzwertig

≥0,50 nmol/l: positiv

In einem Vergleich mit einem Referenztest (RIA) waren von den untersuchten 90 Seren 48 Seren in beiden Tests positiv und 34 Seren in beiden Tests negativ. 1 Serum war im ELISA positiv und im RIA negativ, 2 Seren waren im RIA positiv und im ELISA negativ. Die restlichen 5 Seren wurden im grenzwertigen Bereich eines Tests gemessen. Beide Tests sind sehr gut vergleichbar. Die Sensitivität des ELISA in Bezug zum verwendeten RIA beträgt 96,0%, bei einer Spezifität von 97,1% und ohne Berücksichtigung grenzwertiger Proben. Werden die Grenzbereiche negativ gewertet, ergibt sich eine Sensitivität von 94,1% bei einer Spezifität von 94,9%. Bei einer positiven Wertung der Grenzbereiche ergibt sich eine Sensitivität von 92,6% bei einer Spezifität von 94,4%.

n = 90		Euroimmun RIA Cut-off1: 0.4 nmol/l Cut-off2: 0.5 nmol/l		
		pos.	grenzw.	neg.
Anti-Acetylcholinrezeptor- ELISA Cut-off1: 0.4 nmol/l Cut-off2: 0.5 nmol/l	pos.	48	1	1
	grenzw.	1	0	1
	neg.	2	2	34

	grenzw. = pos.	grenzw. = neg.	ohne grenzw.
Sensitivität	92,6%	94,1%	96,0%
Spezifität	94,4%	94,9%	97,1%
Positiver prädiktiver Wert	96,2%	96,0%	98,0%
Negativer prädiktiver Wert	89,5%	92,5%	94,4%
Diagnostische Effizienz	93,3%	94,4%	91,1%
n	90	90	85

Tabelle 20: Vergleich des neu entwickelten Anti-Acetylcholinrezeptor-Ak ELISA versus RIA Euroimmun.

In der Kreuztabelle oben werden die Anzahl der klassifizierten Proben eingetragen, 90 Proben wurden in beiden Tests gemessen. In der Tabelle unten sind die Angaben über die Sensitivität und Spezifität, prädiktive Werte (richtige Vorhersagewerte in %), der diagnostischen Effizienz (Summe aus richtig positiv und richtig negativ gemessenen Proben dividiert durch Gesamtzahl der gemessenen Proben in %) und der Anzahl n der berücksichtigten Werte. Für die Berechnungen wurden grenzwertige Proben positiv, negativ oder nicht gewertet.

Siehe auch Datenblatt A_1435_D_DE_A02 der EUROIMMUN AG.

Die Ergebnisse von 81 Anti-Acetylcholinrezeptor-Ak-RIA-positiven Seren und 128 Blutspendern wurden in einer Receiver-Operating-Characteristic-(ROC) Kurve ausgewertet (Abbildung 19).

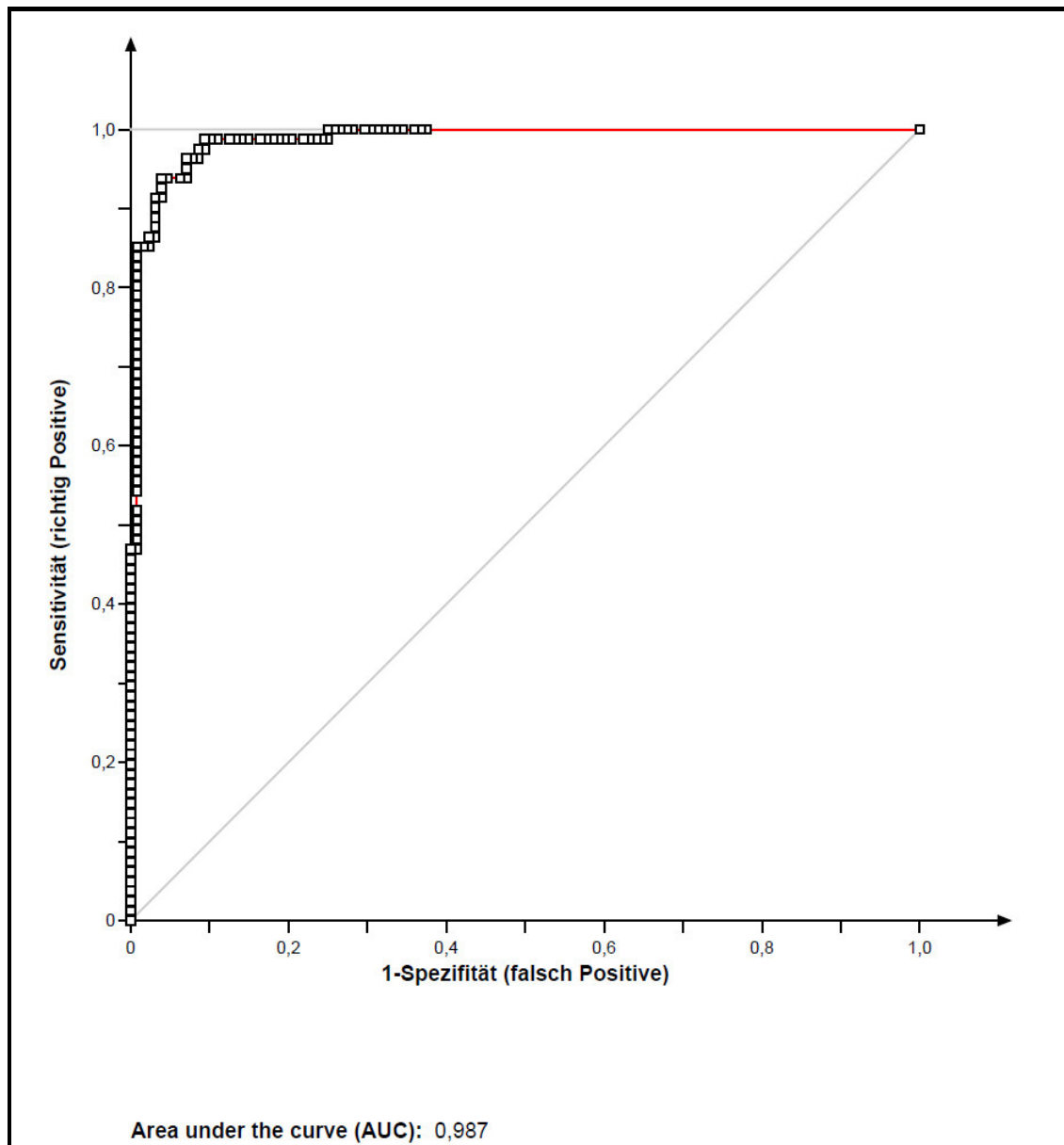


Abbildung 19: Darstellung der Receiver-Operating-Characteristic-Kurve zur Überprüfung des Grenzwertes zwischen normalen und pathologischen Anti-AChR-Autoantikörperkonzentrationen. Es wurde der Anteil richtig positiver Resultate (Sensitivität) gegen den Anteil falsch positiver Ergebnisse (1 - Spezifität) aufgetragen. Jeder Punkt auf der ROC-Kurve stellt ein Sensitivitäts-/Spezifitäts-Paar dar, an einer entsprechenden Entscheidungsschwelle. Area under the curve (AUC): Fläche, die von der Kurve eingeschlossen wird, maximal 1 (100%)

Je mehr sich die ROC-Kurve der oberen linken Ecke nähert (100% Sensitivität, 100% Spezifität), desto höher ist die Gesamtgenauigkeit des Tests (Zweig et al., 1993). In der Tabelle 21 sind die bei dem Grenzwert (Cut-off) von 0,51 nmol/l berechnete Sensitivität von 93,83% und Spezifität von 96,09% angegeben. Die Summe der Sensitivität und der Spezifität ist an diesem Punkt am höchsten, d. h. der gewählte Grenzwert von 0,5 nmol/l liegt im Bereich mit der höchsten diagnostischen Effizienz.

Cutoff [nmol/L]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]	Cutoff [nmol/L]	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
0,00	100,00	0,00	0,84	79,01	99,22
0,00	100,00	0,00	0,92	77,78	99,22
0,00	100,00	62,50	0,97	76,54	99,22
0,01	100,00	63,28	0,99	75,31	99,22
0,01	100,00	64,06	1,11	74,07	99,22
0,03	100,00	65,63	1,12	72,84	99,22
0,03	100,00	66,41	1,13	71,60	99,22
0,05	100,00	67,19	1,16	70,37	99,22
0,06	100,00	67,97	1,20	69,14	99,22
0,07	100,00	68,75	1,30	67,90	99,22
0,07	100,00	69,53	1,41	66,67	99,22
0,08	100,00	70,31	1,44	65,43	99,22
0,10	100,00	71,88	1,46	64,20	99,22
0,11	100,00	72,66	1,49	62,96	99,22
0,12	100,00	73,44	1,50	61,73	99,22
0,12	100,00	74,22	1,53	60,49	99,22
0,13	100,00	75,00	1,57	59,26	99,22
0,13	98,77	75,00	1,67	58,02	99,22
0,13	98,77	75,78	1,69	56,79	99,22
0,13	98,77	76,56	1,69	55,56	99,22
0,16	98,77	77,34	1,75	54,32	99,22
0,16	98,77	78,13	1,82	51,85	99,22
0,17	98,77	79,69	1,90	50,62	99,22
0,18	98,77	80,47	1,93	49,38	99,22
0,19	98,77	81,25	1,95	48,15	99,22
0,19	98,77	82,03	2,04	46,91	99,22
0,21	98,77	82,81	2,06	46,91	100,00
0,21	98,77	83,59	2,07	45,68	100,00
0,23	98,77	85,16	2,08	44,44	100,00
0,23	98,77	85,94	2,16	43,21	100,00
0,24	98,77	86,72	2,19	41,98	100,00
0,25	98,77	87,50	2,30	40,74	100,00
0,29	98,77	89,06	2,38	39,51	100,00
0,33	98,77	89,84	2,71	38,27	100,00
0,34	98,77	90,63	2,78	37,04	100,00
0,36	97,53	90,63	3,03	35,80	100,00
0,36	97,53	91,41	3,55	34,57	100,00
0,37	96,30	91,41	3,59	33,33	100,00
0,39	96,30	92,19	3,67	32,10	100,00
0,40	96,30	92,97	3,76	30,86	100,00
0,42	95,06	92,97	4,28	29,63	100,00
0,43	93,83	92,97	4,28	28,40	100,00
0,43	93,83	93,75	4,54	27,16	100,00
0,46	93,83	95,31	4,65	25,93	100,00
0,51	93,83	96,09	4,73	24,69	100,00
0,55	92,59	96,09	5,05	23,46	100,00
0,57	91,36	96,09	5,33	22,22	100,00
0,57	91,36	96,88	5,41	20,99	100,00
0,58	90,12	96,88	5,43	19,75	100,00
0,59	88,89	96,88	5,68	18,52	100,00
0,59	87,65	96,88	5,80	17,28	100,00
0,61	86,42	96,88	5,97	16,05	100,00
0,62	86,42	97,66	6,23	14,81	100,00
0,68	85,19	97,66	6,37	13,58	100,00
0,69	85,19	98,44	6,41	12,35	100,00
0,71	85,19	99,22	7,09	11,11	100,00
0,73	83,95	99,22	8,03	9,88	100,00
0,75	82,72	99,22	10,29	8,64	100,00
0,77	81,48	99,22	10,60	7,41	100,00
0,77	80,25	99,22	11,94	6,17	100,00

Tabelle 21: ROC Tabelle. Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit vom Cut-off (dem Grenzwert zwischen positiver und negativer Klassifizierung). Mit einem gepunkteten Rechteck sind die Werte für 0,51 nmol/l markiert, der am nächsten gelegene Wert zum gewählten Cut-off von 0,50 nmol/l. Sensitivität: Anteil der richtig positiv bestimmten Patientenproben in %, Spezifität: Anteil der richtig negativ bestimmten Patientenproben in %.

In einem 2013 durchgeführten Methodenvergleich mit der auf rekombinanten Zellen basierenden indirekten Immunfluoreszenztechnik (Euroimmun) wurden 67 RIA-positive Proben untersucht. 59 der 67 Proben wurden in allen Methoden positiv bestimmt, die IFT erkennt 60 der 67 RIA-positiven Proben (90%), der neu entwickelte ELISA bestätigt 63 der 67 RIA-positiven Proben (94%). Von den 60 IFT-positiven Proben wurden 59 (98%) mit dem ELISA bestätigt. 3 Proben wurden nur im RIA als positiv bestimmt (siehe Abbildung 20).

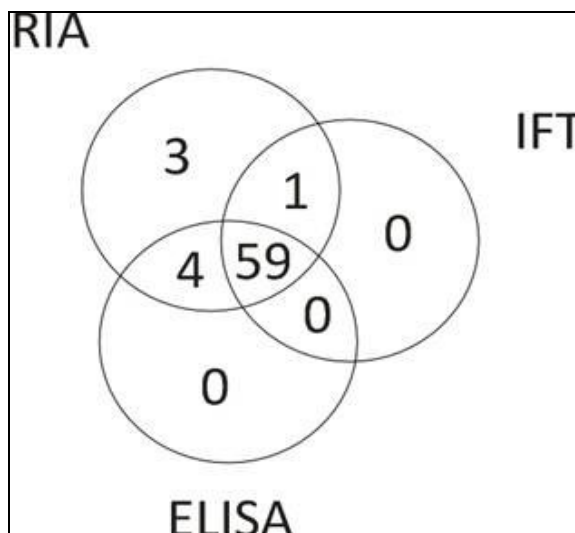
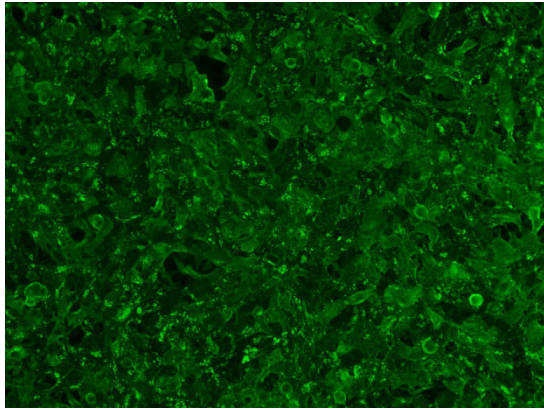
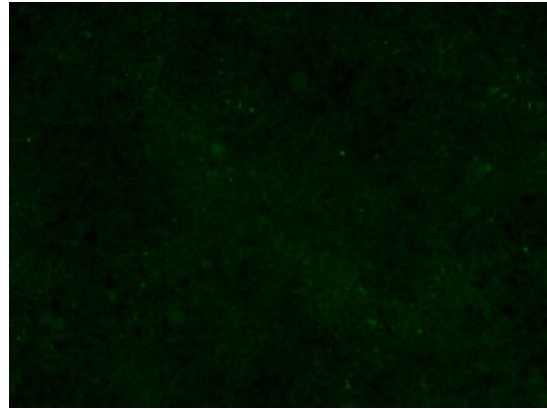


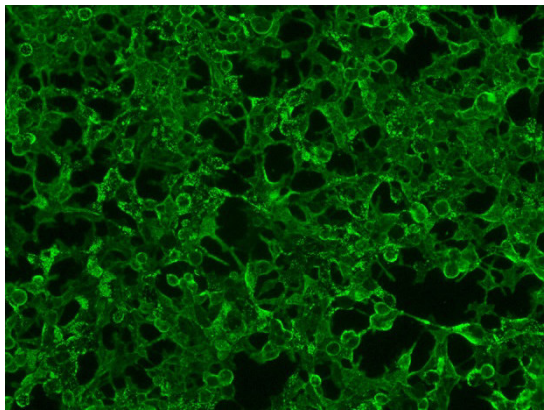
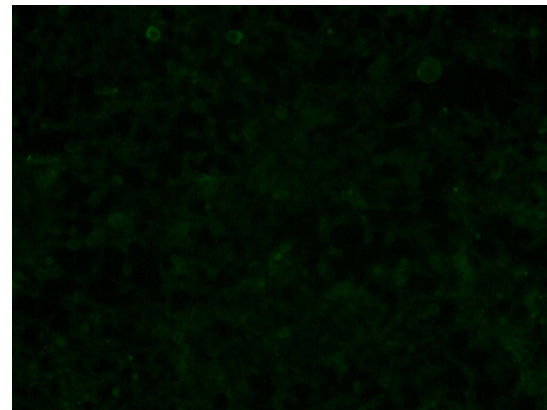
Abbildung 20: Diagramm der in den drei verschiedenen Methoden gefundenen Überschneidungen positiver Proben. Verwendet wurden 67 RIA-positive Proben.

Für die Anti-AChR-IFT war zur Steigerung der Empfindlichkeit die Verwendung des hochempfindlichen Anti-human-IgG-Biotin/Extravidin-Fluorescein-Detektionssystems notwendig. Durch den höheren Markierungsgrad (FITC-Moleküle pro Anti-human-IgG) und den zusätzlichen Waschschrift, im Gegensatz zum direkt FITC-markierten Anti-human-IgG, wurden deutlich bessere Ergebnisse erzielt. In den Abbildungen 21 und 22 sind typische Ergebnisse der hochsensitiven IFT dargestellt. Im Beispiel war die spezifische Fluoreszenz der 1:10-verdünnten Proben gut zu erkennen, die Fluoreszenz-Intensitäten lagen demnach jeweils bei 3.

AChR ($\alpha_{1_2}\beta_{1\delta}\gamma$) RAPSyn induziert

nicht induziert

Abbildung 21: Immunfluoreszenz eines positiven Serums gegen **fötale** AChR auf induzierten und nicht induzierten rekombinanten HEK-293-Zellen.

AChR ($\alpha_{1_2}\beta_{1\delta\epsilon}$) RAPSyn induziert

nicht induziert

Abbildung 22: Immunfluoreszenz eines positiven Serums gegen **adulte** AChR auf induzierten und nicht induzierten rekombinanten HEK-293-Zellen.

Bei einer externen Validierung in dem Labor von Dr. Peter Hobson (Sullivan Nicolaides Pathology, Brisbane, Australien) wurden 175 Proben von Patienten mit Verdacht auf Myasthenia gravis untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 22 ersichtlich. Ohne Berücksichtigung grenzwertiger Proben wurde eine Sensitivität von 98% bei einer Spezifität von 96% im Vergleich zum Radioimmunoassay der Firma RSR Ltd. (Cardiff, Wales, UK) berechnet.

n = 175		Anti-AChR-Ak RIA (RSR ltd)		
		positive	grenzwertig	negative
Anti-Acetylcholin-rezeptor ELISA	positive	45	0	5
	grenzwertig	1	0	4
	negative	1	0	119

Tabelle 22: Ergebnisse der externen Validierung in Brisbane, Australien

In der Kreuztabelle wurden die Anzahl der klassifizierten Proben eingetragen, 175 Proben wurden im RSR RIA im Vergleich zum neu entwickelten ELISA gemessen.

In einer Studie mit 44 klinisch klassifizierten MG-Patienten an der Medizinischen Universität St. Petersburg, Russland, wurden die Patienten nach dem Schweregrad der Erkrankung mit dem Bewertungssystem der Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA 2000) eingeteilt. Das Patientenkollektiv bestand vorwiegend (42 von 51) aus Patienten mit generalisierter MG (Score IIA-V), 6 Patienten hatten die rein okuläre Form der MG (Score I), ein Patient eine latente MG-Form (Score I) und zwei Patienten waren subklinisch (Score 0). Vorläufige Ergebnisse ergaben im ELISA bei 37 der 51 Patienten (72,5%) ein Anti-AChR-Ak-positives Ergebnis, im Anti-AChR-RIA der Firma Euroimmun wurden ebenfalls 37 Patienten als positiv bestätigt. Beide Tests haben 3 der 6 (50%) Patienten mit okulärer MG Anti-AChR-Ak positiv gefunden und 34 der 42 Patienten (81%) mit der generalisierten Form der MG. Die Ergebnisse sollen demnächst präsentiert werden.

4. Diskussion

An der Schnittstelle zwischen den Nervenendigungen und den Muskelfasern wird durch einen elektrischen Reiz Acetylcholin in der Präsynapse freigesetzt. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren wandeln das chemische Signal in eine elektrische Spannungsänderung der Postsynapse um, die eine Muskelkontraktion auslöst (Thanvi et al., 2004).

Bei der Myasthenia gravis liegen AAK vor, die diesen Vorgang stören. Es wurden verschiedene Antigene erkannt, gegen die Autoantikörper gebildet werden können, weitere bislang unbekannte Antigene sind denkbar und werden gesucht. Die am häufigsten auftretenden, MG-verursachenden AAK sind gegen die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren gerichtet (Thanvi et al., 2004). AAK gegen verschiedene Regionen des AChR sind bekannt, das Hauptantigen ist die „main immunogenic region“ auf der α 1-Untereinheit. Daneben werden blockierende AAK gegen die ACh-Bindungsstelle auf der α 1-Untereinheit häufig bestimmt. AAK gegen die ϵ -Untereinheit im adulten AChR und gegen die γ -Untereinheit der fötalen Form wurden gefunden (Baets et al., 2002).

Andere, seltener vorkommende AAK sind gegen MuSK, VGCC (im Krankheitsbild des Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndroms, LEMS), LRP4 und Cortactin gerichtet. AAK gegen MuSK und VGCC sind, wie AAK gegen AChR, als immunpathogen erkannt worden. Bei Autoantikörpern gegen LRP4 und Cortactin wird die potentielle Pathogenität noch untersucht (Drachmann et al. 2014).

Weitere AAK, die oft parallel zu den vorgenannten AAK bestimmt werden und mit einem Thymom assoziiert auftreten, sind gegen die quergestreifte Muskulatur gerichtet. Zielantigene sind intrazelluläre Muskelproteine wie Titin, Myosin, Aktin und Ryanodin-Rezeptoren oder myofibrilläre Proteine (Myosin, Actin, Tropomyosin und Troponin). AAK gegen Zytokine (Interferon-alpha, Interferon-omega und Interleukin 12), spannungsgesteuerte Kaliumkanäle Kv1.4 (VGKC) und das intrazelluläre Endplattenprotein RAPSyn werden ebenso bei MG-Patienten gefunden (Leite et al., 2010, Meriggioli et al., 2012).

Der Nachweis der Autoantikörper gegen nikotinische Acetylcholinrezeptoren hat für die Diagnostik der Myasthenia gravis eine zentrale Bedeutung.

4.1 Einsatz rekombinanter oder nativer AChR zur Antikörpertestung

Als Grundlage der Bestimmung von Autoantikörpern werden Antigene benötigt, die in ihrer Proteinsequenz, ihrer Faltung und Struktur dem nativen Vorbild entsprechen. Es sollten die beiden Formen des nAChR, fötal und adult, verwendet werden, um alle AAK zu erfassen.

In den etablierten Radioimmunassays werden als Antigenquelle humanes Muskelgewebe, kultivierte Rhabdomyosarkomzellen (TE671, Leite et al. 2010) oder transfizierte HEK-293-Zellen verwendet.

Die Verwendung nativen humanen **Muskelgewebes** zur Gewinnung von AChR ist mit großem Aufwand verbunden. Es ist durchaus möglich und ethisch vertretbar, Beinamputate von z. B. Diabetikern aufzuarbeiten und daraus AChR zu extrahieren. Diese Operationen werden üblicherweise zu einer bestimmten Zeit geplant und durchgeführt, sofern keine eiligen Notoperationen vorgezogen werden. Da die Rezeptoren sehr empfindlich sind und Einfrier-/Auftauvorgänge die Konzentration intakter Rezeptoren deutlich vermindern, muss das Gewebe frisch aufbereitet werden.

Die Aufarbeitung des amputierten Muskels ist aufwendig. Das Gewebe muss mit einer physiologischen Kochsalz-Eismischung schnell heruntergekühlt werden. Sehnen, Blutgefäße und Fettgewebe werden dann heraus präpariert und das Amputat muss in kleine Stücke geschnitten werden. Alle diese Vorgänge sind wenig reproduzierbar und die Qualität der Präparationen ist sehr heterogen. Um zu einer guten Extraktionsausbeute zu gelangen, muss das Gewebe im Kühllabor zu extrem kleinen Zellverbänden mechanisch zerkleinert werden. Die anschließende Extraktion des kruden Gewebestreifens bedarf einer höheren Tensid- und Proteinaseinhibitor-Konzentration und bedingt mehrfache Ultrazentrifugations- und Waschschriffe gegenüber der Extraktion aus transfizierten HEK-293-Zellen. Wie mir aus eigener Erfahrung bekannt war, ist der Aufwand hoch und die Konzentration an AChR ist deutlich geringer als in transfizierten HEK-293-Zellen.

Durchblutungsstörungen und Nervenschädigung im Fußbereich (Neuropathie) der Diabetiker führen über eine längere Zeit zu einer Mangelversorgung der Muskelzellen und sind der Grund der Amputation. Eine Schädigung der Rezeptoren ist unter diesen Bedingungen nicht auszuschließen.

Die Rhabdomyosarkomzellen **TE671** wachsen adhärent als Monolayer. Die Verwendung von Zellkultursystemen wie die Cell Factory von Nunc mit einer Fläche von ca. 6.000 cm² oder die Systeme CellSTACK (6360 cm²) und Hyperflask (1720 cm²) von Corning sind hierfür geeignet.

Weitere Zellkulturversuche wurden mit einem Bioreaktor (Labfors 3, Infors GmbH, Einsbach, Deutschland) unter Verwendung von Microcarriern durchgeführt. Mit dem Zusatz der langsam sedimentierenden, porösen Partikel (Cytodex Microcarrier, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland), mit einem Durchmesser von 150 bis 250 µm, wurde die Oberfläche im Bioreaktor für die Zellen vergrößert. Die Ausbeute an AChR war jedoch zu gering.

Aus der Zellkultur der TE671-Zelllinie können nur fötale Acetylcholinrezeptoren gewonnen werden, die auch in dem zu Vergleichszwecken eingesetzten RIA verwendet werden. Die adulten Rezeptoren mit ϵ -Untereinheit müssen aus einer anderen Quelle ergänzt werden.

In den letzten Jahren haben die molekularbiologischen Erfahrungen und Erkenntnisse zur Gewinnung **rekombinanter Proteine** stark zugenommen, auch komplexere und zusammengesetzte Strukturen können erzeugt werden. Die Expression der Zielproteine kann in sehr hoher Konzentration erfolgen (Ooi et al., 2016). Durch die im Verhältnis geringere Menge anderer mit extrahierter Membranproteine wird die Reinheit der Extrakte stark erhöht.

Aus vorgenannten Gründen wurden Zelllinien entwickelt, die den AChR in der fötalen und adulten Form in hoher Konzentration exprimieren. Für die Synthese rekombinanter Proteinkomplexe, für die eine korrekte Faltung, eine Modifizierung von Aminosäuren und ein Zusammenbau verschiedener Untereinheiten vorgesehen sind, musste ein höherer, eukaryotischer Expressionswirt verwendet werden. Die Konstrukte der AChR-Untereinheiten ($\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ und ϵ) wurden in Säugerzellen (HEK-293) exprimiert, wodurch Sekundär- und Tertiärstrukturen ausgebildet und konformationelle Epitope dargestellt werden können. Posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und Disulfidbrücken werden in diesem Expressionssystem gewährleistet (Ooi et al., 2016). Die Stöchiometrie der Untergruppen, zwei $\alpha 1$ -Untereinheiten für jeden adulten oder fötalen Rezeptor, wurde berücksichtigt.

Die Zusammenlagerung der Untereinheiten sollte analog zum Muskel im endoplasmatischen Retikulum (ER) der HEK-293-Zellen erfolgen (Smith et al., 1987). Vor dem Zusammenbau des Rezeptors sind für die normale Reifung der α -Untereinheit die Ausbildung einer Disulfidbrücke und die Glykolisierung eines Asparagins erforderlich (Blount et al., 1990). Die Sequenzen auf den N-terminalen Domänen der $\alpha 1$ -, δ - und γ -Untereinheit (bzw. ϵ -Untereinheit für den adulten Rezeptor) sind bestimmend für die Assoziation zum Gesamtproteinkomplex mit der zirkulären Reihenfolge α - γ - α - β - δ im Uhrzeigersinn (Verrall et al., 1992). Zuerst bilden sich aus den in die Zellmembran des ER eingelagerten Untereinheiten Heterodimere aus der α -Untereinheit mit der γ - (oder ϵ -) Untereinheit und der α -Untereinheit mit der δ -Untereinheit, die sich dann mit der β -Untereinheit zum kompletten Rezeptor zusammenschließen (Saedi et al., 1991). Einzelne Untereinheiten sind einem raschen Abbau ausgesetzt. Eine Sequenz von 17 Aminosäuren in der langen zytoplasmatischen Schleife der α -Untereinheit spielt eine wichtige Rolle in dem finalen Zusammenbau des Rezeptors, Mutationen in diesem Bereich verhindern diesen Vorgang (Yu et al., 1994). Die kreisförmige Anordnung in einem Pentamer ist eine Anforderung für den Export des Rezeptors in den Golgi-Apparat und dann an die Zelloberfläche (Gu et al., 1991, Keller et al., 1999).

Aus den zu Beginn verwendeten transient transfizierten Zellen wurden Rezeptoruntereinheiten unterschiedlich kombiniert. Es ließ sich zeigen, dass sich das Jod¹²⁵-markierte Neurotoxin α -Bungarotoxin an die Konstrukte bindet. Die höchste Bindung ($B_{max}/T\%$) besaßen die fötalen nAChR ($\alpha 1_2\beta 1\delta\gamma$) der transient transfizierten Zellen, sie übertrafen die fötalen Rezeptoren aus der TE671-Zelllinie.

Die im intakten Rezeptor zweimal enthaltene $\alpha 1$ -Untereinheit bildet mit den benachbarten Untereinheiten (im Uhrzeigersinn rechts) Bindungsstellen für ACh aus, an die auch das Neurotoxin bindet. Diese molekulare Interaktion erfolgt an der Grenzfläche, die von den verschiedenen Untereinheiten gebildet wird. Die hochaffine (ACh) Bindungsstelle des Muskel-AChR-Typs ist an der Schnittstelle der α - und δ -Untereinheit, während die niederaffine ACh-Bindungsstelle sich zwischen der α - und γ -Untereinheiten befindet. Der kompetitive Antagonist α -Bungarotoxin zeigt ein gleichsinniges Bindungsverhalten wie ACh zu den Bindungsregionen des AChR, im Gegensatz zu einigen cholinergen Arzneimitteln, die mit entgegengesetzter Spezifität binden (Samson et al., 2008, Arias 2000). Der fötale Rezeptor enthält in seiner Anordnung α - γ - α - β - δ beide Bindungsstellen und zeigte dementsprechend die höchste Bindung.

Das mit dem Einsatz der transient transfizierten Zellen festgestellte radioaktive Signal war vergleichbar zum fötalen Rezeptor aus der Zelllinie TE671 und konnte nur dadurch erreicht werden, dass die Bindungsregion des AChR richtig ausgebildet ist. Wenn die Untereinheiten richtig gefaltet und angeordnet sind, werden die entsprechenden Bindungsregionen geformt, die Bindungskonstante für die α -Untereinheit allein ist um Größenordnungen geringer (Tzartos et al., 1983). Durch die starke Bindung des gereinigten und radioaktiv markierten α -Bungarotoxins an die rekombinanten Proteinkomplexe wurde also ersichtlich, dass die beiden Bindungsregionen, auf insgesamt 4 Untereinheiten des Rezeptors, in richtiger Konformität ausgebildet waren. AAK, auch in geringer Konzentration, haben sich an die Rezeptoren gebunden, vornehmlich an die „main immunogenic region“ (MIR), die demnach die richtige Struktur aufgewiesen haben muss. Die bestimmten Konzentrationen der mitgeführten Seren waren mit den Werten des TE671-RIA hoch korreliert ($r = 0,994$). Mit den stabilen HEK-293-Zelllinien wurden deutlich höhere Expressionsraten an AChR erzielt als mit den transienten Ansätzen. Die Rezeptoren konnten in hohem Maß mit I^{125} - α -Bungarotoxin markiert werden und zeigten im Vergleich zum RIA eine übereinstimmende Reaktivität zu Anti-AChR-Ak-positiven Seren. In späteren Messungen wurden gegen die ε -Untereinheit und gegen andere Untereinheiten gerichtete AAK nachgewiesen. Damit erwiesen sich die fötalen und adulten Rezeptoren aus den HEK-293-Zelllinien als sehr gut geeignet für die weitere Entwicklung des ELISA.

4.2 Einfluss der Kopplungstechnik von AChR an die feste Phase auf die Antigenreaktivität

Die Instabilität des Rezeptors in Lösung war der Grund dafür, die Rezeptoren an der MT-Platte zu immobilisieren und zu trocknen. In dieser getrockneten Form liegen die Rezeptoren über längere Zeit stabil vor. Daher wurde dieses Test-Design für den ELISA gewählt, bei dem die AAK der Standards und Proben an den an der festen Phase immobilisierten AChR binden und mit einem Peroxidase-markierten Ak, der gegen humanes IgG gerichtet ist, detektiert werden.

Als feste Phase im ELISA werden fast ausschließlich MT-Platten aus Polystyrol verwendet. Denkbar sind auch beschichtete Polystyrolkugeln oder Magnetpartikel, die in unbeschichteten MT-Platten verwendet werden, die aber außer ihrer größeren Oberfläche keine signifikanten Vorteile gegenüber der MT-Platte bieten. Die in dieser

Arbeit verwendeten, mit Gamma-Strahlung behandelten Polystyrolplatten hatten eine Proteinbindungskapazität von ca. 400 ng pro Vertiefung. Die vom Hersteller verwendete energiereiche Gamma-Bestrahlung, zur Herstellung von MT-Platten mit erhöhter Bindungskapazität (Maxisorp), führt zu Kettenspaltungen des Polymers und Oxidation reaktiver Gruppen mit Luftsauerstoff zu Phenyl- oder Alkyl-Ketonen (Ogawa et al., 1986), was die Hydrophobizität der Oberfläche verringert. Eine Zunahme der Bindungskapazität von Polystyrol-MT-Platten konnte bereits mit der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht erreicht werden (Boudet et al., 1991).

Prinzipiell sind mehrere Immobilisierungsverfahren zur Kopplung von AChR an eine Mikrotiterplatte anwendbar:

- direkte adsorptive Beschichtung an die Polystyrol-Oberfläche der Mikrotiterplatte
- Nutzung der starken Bindung zwischen Avidin und Biotin, Biotinylierung des Rezeptors und Inkubation in mit Streptavidin beschichteten MT-Platten
- Verwendung anderer Liganden (z. B. Oligo-Histidin-Tag) gekoppelt an AChR und Verwendung einer MT-Platte, die mit einer Liganden-Bindungssubstanz (z. B. Anti-Oligo-Histidin-Tag-Ak) beschichtet ist
- Avidin-Biotin-System mit biotinyliertem α -Bungarotoxin, gebunden an AChR in Kombination mit Streptavidin-beschichteten MT-Platten
- Beschichtung mit Antikörpern, die gegen AChR gerichtet sind

Für die **direkte Beschichtung** der MT-Platten muss ein Überschuss von Proteinen verwendet werden, um eine ausreichende Adsorption zu erreichen, d. h. im Überstand verbleibt eine nicht unerhebliche Menge des wertvollen Proteins, das dann ausgewaschen wird. Grenzflächenaktive Proteine, wie z. B. Albumin oder auch die zur Extraktion verwendeten Detergenzien, werden besser an die Oberfläche adsorbiert als der Rezeptor, es muss also mit möglichst reinem Extrakt beschichtet werden. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass bestimmte Regionen des Rezeptors (z. B. die hydrophoben Transmembran-Domänen) vermehrt adsorptiv an die Oberfläche gebunden werden und daher nicht mehr frei zugänglich sind.

Zur direkten Beschichtung wurden die Detergenzextrakte der transfizierten Zellen verwendet. Da die Extrakte zu viel Fremdprotein und Detergenz enthielten, konnten nur wenige Rezeptoren adsorptiv binden, das gemessene Signal war zu gering und das unspezifische Hintergrundsignal zu hoch. Auf Grund der geringen thermischen und chemischen Stabilität der Rezeptoren erwies sich eine Reinigung der Extrakte als

schwierig. Die harschen Elutionsbedingungen während einer affinitätschromatographischen Reinigung führten zu starken Verlusten an intakten Rezeptoren. Die im Extrakt enthaltenen Detergenzien waren bei der Größenausschluss-Chromatographie hinderlich.

Avidin-Biotin-System: Die Untereinheiten des Rezeptors hätten gentechnisch mit einem Biotinrest versehen werden können (Aviditag). Dies hätte aber die native Form verändert, ebenso wie andere denkbare Markierungen, z. B. ein Oligo-Histidin-Tag. Störungen mit einem Oligo-Histidin-Tag markierten AChR waren bereits in einer Arbeitsgruppe in Oxford aufgetreten, die an der Immunfluoreszenztechnik mit rekombinanten Zellen arbeitete. Der Oligo-Histidin-Tag behinderte in der Zellkultur die Zusammenlagerung der AChR-Untereinheiten zum pentameren Rezeptor und die Ausbeute an intaktem Rezeptor war deutlich vermindert gegenüber einer Expression der Untereinheiten ohne Tag (Angela Vincent, Universität Oxford, persönliche Mitteilung).

Eine **α -Bungarotoxin**-Präparation hoher Reinheit wurde mit einem Biotinyl-6-Aminohexansäure-N-hydroxysuccinimid-Ester biotinyliert. Das Kopplungsreagenz enthält einen 6C-Atome langen Abstandshalter („Spacer“, Amino-hexansäure) zwischen dem Biotin und der reaktiven N-Hydroxysuccinimid (NHS)- Abgangsgruppe, um eine bessere Reaktivität des über den Spacer an Bungarotoxin gekoppelten Biotins mit dem Avidin zu ermöglichen. Im Gegensatz zum radioaktiv markierten α -Bungarotoxin hat das biotinylierte α -Bungarotoxin nur schlecht an die Rezeptoren gebunden, was durch gleichartig mit Bungarotoxin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe mit der Immunfluoreszenztechnik bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Das α -Bungarotoxin enthält 6 Lysinreste mit jeweils einer freien Aminogruppe, die mit dem NHS-Ester reagieren können. Auch bei einem geringen Einsatz des Kopplungsreagenz, d. h. einem geringem molaren Verhältnis von Kopplungsreagenz zu α -Bungarotoxin, wurde anscheinend eine für die Bindung an den Rezeptor bedeutsame Stelle modifiziert. Die radioaktive Markierung von α -Bungarotoxin erfolgt im Gegensatz hierzu an nur einem der beiden Tyrosinreste (Tyr54). In jedem Fall wäre aber bei der Immobilisierung des Rezeptors über Bungarotoxin die ACh-Bindungsstelle verdeckt gewesen und blockierende Ak wären dann nicht messbar gewesen.

Beschichtung mit Antikörpern, die gegen AChR gerichtet sind: Der Anti-AChR-Ak ELISA der Firma RSR (AChRAb, RSR Ltd., Cardiff, Großbritannien) verwendet einen auf der MT-Platte immobilisierten Anti-AChR-Fänger-(catching)-Ak. Das Prinzip dieses Assays ist kompetitiv. Rekonstituierte Lyophilisate des fötalen und adulten

Rezeptors werden in Röhren vorgelegt und inkubieren dann mit den AAK der zugegebenen Standards, Kontrollen oder Patientenserum über Nacht (16-20h). Anschließend werden die Lösungen in die beschichtete MT-Platte transferiert und inkubieren für eine Stunde. AAK, die gegen dasselbe Epitop gerichtet sind wie der Fangantikörper, verringern in Abhängigkeit ihrer Konzentration und Bindungsstärken die Menge des an die MT-Platte gebundenen AChR. Anschließend wird die MT-Platte dreimal gewaschen und eine Lösung von zwei biotinylierten monoklonalen Ak wird dazu pipettiert. In der einstündigen Inkubation können die biotinylierten Ak an andere Epitope des AChR binden, sofern sie nicht von den AAK der Standards oder Proben kompetitiv verdrängt werden. Nach Waschen der Platte wird eine Streptavidin-Peroxidase zugefügt, die für eine halbe Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird dann ein Peroxidase-Substrat zugefügt. Die nach Stoppen der Reaktion mit einer Säure resultierende optische Dichte ist proportional zur Menge der an der MT-Platte gebundenen biotinylierten Ak bzw. umgekehrt proportional zur AAK-Konzentration (RSR ltd., 2017, <http://www.rsrltd.com/pdf%20ifu/AChR%20Ab%20ELISA.pdf>).

Mit diesem Testaufbau können daher nur AAK nachgewiesen werden, die gegen eines oder mehrere der drei Epitope gerichtet sind, die von den im Kit verwendeten Ak erkannt werden. Von den AChR-bindenden AAK sind allerdings mehr als drei Epitope bekannt. Da die AAK die Kit-Ak verdrängen müssen, um nachgewiesen zu werden, spielt die Bindungsstärke der im Test verwendeten Ak, insbesondere bei niedrig aviden AAK, eine wichtige Rolle.

Bei der Beschichtung von **gegen AChR gerichteten Ak** konnte auf ein bewährtes Verfahren der MT-Platten-Beschichtung zurückgegriffen werden. Ak wurden auf der Platte adsorptiv gebunden und unspezifische Bindungsstellen wurden mit BSA blockiert. Mit Antikörpern hoher Bindungsstärke und Spezifität wurden die Rezeptoren selektiv immobilisiert, anschließend wurden Fremdproteine durch Waschen abgetrennt. Für diese Capture-Technik mit der Verwendung von zwei Antikörpern auf der MT-Platte, einem monoklonalen Maus-Ak, der gegen die β -Untereinheit gerichtet ist, und einem polyklonalen Ziege-Ak, der an die δ -Untereinheit bindet, wurde sichergestellt, dass alle Untereinheiten räumlich zugänglich sind. Die Beschichtung der Ak auf der MT-Platte und das anschließende Binden der adulten und fötalen Rezeptoren ließen sich präzise und homogen reproduzieren. Die MT-Platten konnten durch die Verwendung einer Stabilisierungslösung (Stabilcoat) ohne Aktivitätsverluste getrocknet werden. Die späteren Untersuchungen zur Echtzeitstabilität bei 4°C- Lagerung bestätigten die

Ergebnisse der beschleunigten Stabilitätsuntersuchung bei 37 °C und damit die wenigstens einjährige Haltbarkeit der MT-Platte bei 4°C.

Nach mehreren Optimierungsschritten, sowohl bezüglich der Extraktion von Membranproteinen als auch des Beschichtungsvorgangs selbst, konnten MT-Platten mit gleichmäßiger und hoher Konzentration der AChR hergestellt werden, die das gesamte Spektrum der AChR-Epitope den nachzuweisenden Autoantikörpern darlegen. Auch die ACh-Bindungsstellen, die bei der RIA-Methode durch radioaktiv markiertes Bungarotoxin besetzt sind, liegen frei vor.

4.3 Validität des neu entwickelten ELISA im Vergleich zu etablierten Testmethoden

Nachdem alle Reagenzien optimiert waren und auch die Stabilitätsprüfung (Lagertests bei 37°C) der Einzelkomponenten gute Ergebnisse zeigte, wurde der Assay umfangreich validiert. Die notwendige analytische und funktionelle Sensitivität, um auch gering konzentrierte Anti-AChR-Ak sicher nachzuweisen, wurde erreicht. Die AChR-Konzentrationen der Patienten konnten im gesamten Bereich der Standardkurve reproduzierbar bestimmt werden. Interferenzen durch Serumbestandteile in hämolytischen, lipämischen und ikterischen Proben wurden auch in hoher Konzentration nicht festgestellt. Eine gewisse Robustheit gegenüber Einflüssen der Probenmatrix zeigte sich auch in den Verdünnungen von Proben hoher Anti-AChR-Ak-Konzentration, die sich über einen weiten Konzentrationsbereich von 0,25 bis ca. 6,0 nmol/l parallel zur Standardkurve verdünnten.

In der Testanleitung für den RIA von RSR (RSR ltd. 2017, <http://www.rsrltd.com/pdf%20ifu/AChR%20Ab%20RIA.pdf>) wird darauf hingewiesen, dass einige Proben keine lineare Verdünnung zeigen. In der Anleitung des RIA der Firma IBL/Tecan mit AChR aus Muskelextrakten wird festgestellt, dass Patientenserum ein individuelles Verdünnungsverhalten zeigen. Es wird empfohlen, die Probe zuerst unverdünnt zu messen und nur bis 1,5 nmol auszuwerten, der Messbereich des IBL-RIA beträgt 0,07-8 nmol/l. Proben höherer Konzentration müssen weiter verdünnt und erneut gemessen werden, um in den linearen Bereich des Assay zu gelangen (0,25-1,5 nmol/l). Bei der Verlaufskontrolle wird geraten, stets die gleiche Verdünnungsstufe für jede Probe desselben Patienten zu verwenden. Auch im Protokoll für den Euroimmun-RIA wird auf eine Auswertung unverdünnter Proben nur im linearen Bereich von 0,25 bis 3,0 nmol/l hingewiesen.

Die Praktikabilität des neu entwickelten ELISA ist daher im Vergleich zu den etablierten RIA deutlich erhöht.

Klinische Sensitivität und Spezifität: Zur Ermittlung des Normalbereichs wurden 151 Blutspender untersucht. 95,4% der Personen hatten eine Anti-AChR-Ak- Konzentration unter 0,5 nmol/l, dem gewählten Grenzwert zu positiven Proben (Cut-off). Der Grenzwert wurde anhand einer Untersuchung von 81 im Anti-AChR-Ak RIA von Euroimmun positiven Seren und 128 Blutspendern mit einer „Receiver Operating Characteristic“ (ROC) Kurve überprüft. Die Klassifizierung mit dem Cut-off von 0,5 nmol/l ergab die höchste diagnostische Effizienz und eine Sensitivität von 94% bei einer Spezifität von 96%.

In einem weiteren Testvergleich des Euroimmun-RIA mit dem Anti-AChR-Ak ELISA wurden 90 Seren (im Anti-AChR-Ak RIA 50 Proben positiv, 38 negativ, 2 grenzwertig) untersucht. Ohne Berücksichtigung grenzwertiger Proben wurden eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 97% berechnet.

Die guten Ergebnisse des ELISA im Vergleich mit dem Euroimmun-RIA wurden auch in einer externen Validierung von 175 Proben im Vergleich mit dem Radioimmunassay der Firma RSR bestätigt. Bei diesen Messungen wurden eine Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 96% in Relation zu dem RSR-RIA festgestellt.

Im Vergleich zur indirekten Immunfluoreszenztechnik (IFT), die auf rekombinanten Zellen basiert (Euroimmun), wurden mit dem ELISA 59 von 60 Anti-AChR-positiven Proben bestätigt. Die daraus resultierende Sensitivität ist 98%. In diesem Methodenvergleich wurden insgesamt 67 im Euroimmun-RIA Anti-AChR-Ak- positive Proben untersucht, mit dem Anti-AChR-Ak ELISA wurden hiervon 63 (94%) ebenfalls als positiv bestimmt.

Die aus den Testvergleichen berechneten Sensitivitäten betragen für den ELISA 94-98%. In den Testanleitungen der Radioimmunassays wurden die aus einem Methodenvergleich berechneten Sensitivitäten mit 95-100% (IBL) und 98-100% (Euroimmun) angegeben. Die in den Studien festgestellte Spezifität des neu entwickelten ELISA beträgt 96-97%. Die Sensitivität der RIA wurde mit 98% (RSR), 94-100% (IBL) und 100% (Euroimmun) angegeben. Damit ist die diagnostische

Leistungsfähigkeit des in dieser Arbeit entwickelten ELISA gegenüber den etablierten Radioimmunassays gleichwertig.

Die zurzeit vorwiegend zur Bestimmung von Anti-AChR-Ak eingesetzten Radioimmunassays enthalten I^{125} - α -Bungarotoxin im Rezeptor. Mit dem Einfügen dieses Proteins in das Antigen besteht die Gefahr der Bindung von Ak, die gegen Bungarotoxin gerichtet sind. In einer Studie an der Mayo-Klinik (Rochester, USA) wurden von 34.095 Proben mit Verdacht auf MG 4018 Seren als Anti-AChR-Ak-positiv bestimmt. 2 dieser Proben ergaben ein falsch positives Resultat, wenn sie nur mit I^{125} - α -Bungarotoxin inkubiert wurden. Dieser Anteil falsch positiver von 0,05% ist allerdings gering. Im Falle des ebenfalls untersuchten RIA zum Nachweis von Ak gegen VGKC wurde wegen der AAK, die gegen den verwendeten radioaktiven Liganden I^{125} - α -Dendrotoxin gerichtet sind, 1,5% falsch positive Ergebnisse festgestellt (Apiwattanakul et al., 2009).

Eine andere Störung des RIA kann bei Patienten mit **blockierenden Ak** auftreten. Diese Ak binden wie das α -Bungarotoxin an die ACh-Bindungsstellen des AChR. Bei der Messung solcher Patientenserum im RIA wird die zur radioaktiven Markierung verwendete I^{125} - α -Bungarotoxin konzentrationsabhängig durch den AAK von der Bindungsstelle am AChR verdrängt und freigesetzt, die Radioaktivität ist dann nach der Präzipitation im Pellet verringert. Damit wird die Konzentration an Anti-AChR-Antikörpern im Standard-RIA für bindende Ak zu gering gemessen. Durch die Bestimmung der Patientenserum in verschiedenen Verdünnungsstufen und mit einer nur partiellen Sättigung der Rezeptoren mit Bungarotoxin wird die Messung falsch negativer Proben durch blockierende Ak im RIA vermindert. (Vincent et al., 1985).

Auf Grund der Methodik werden die in einem Vergleichstest (RIA) gemessenen Anti-AChR-Ak-negativen Proben, die im ELISA als positiv erkannt werden, als falsch positiv gewertet. Das verringert den Wert der Spezifität für den ELISA. Die endgültige Beurteilung der Sensitivität und Spezifität mit klinisch charakterisierten Proben steht noch aus.

In einer zusammen mit der Medizinischen Universität St. Petersburg (Russland) durchgeführten Studie wurden 51 klinisch klassifizierte MG-Patienten mit einem Anti-AChR-Ak RIA und dem neu entwickelten ELISA untersucht. Nach den vorläufigen Ergebnissen wurden übereinstimmend in beiden Tests 81% der Patienten mit

generalisierter MG und 50% der Patienten mit der rein okulären Form als Anti-AChR-Ak-positiv erkannt. Die Ergebnisse sollen demnächst präsentiert werden.

Alles in allem entspricht der neu entwickelte ELISA den hohen Ansprüchen an ein neues Diagnostikum. Der während dieser Doktorarbeit entstandene Anti-AChR-ELISA soll demnächst in der von mir entwickelten Version von Euroimmun vertrieben werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Afifi, A. K. (2005): Myasthenia gravis from Thomas Willis to the present. In: *Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)* 10 (1), S. 3–13.
2. Agius, M. A.; Richman, D. P.; Vincent, A. (2009): Autoantibody Testing in the Diagnosis and Management of Autoimmune Disorders of Neuromuscular Transmission and Related Diseases. In: Henry J. Kaminski (Hg.): *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 143–156.
3. Apiwattanakul, M.; McKeon, A.; Pittock, S. J.; Kryzer, T. J.; Lennon, V. A. (2010): Eliminating false-positive results in serum tests for neuromuscular autoimmunity. In: *Muscle & nerve* 41 (5), S. 702–704.
4. Arias, H. R. (2000): Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. In: *Neurochemistry international* 36 (7), S. 595–645.
5. Askmark, H.; Haggård, L.; Nygren, I.; Punga, A. R. (2012): Vitamin D deficiency in patients with myasthenia gravis and improvement of fatigue after supplementation of vitamin D3: a pilot study. In: *European journal of neurology* 19 (12), S. 1554–1560.
6. Baets, M. de; Stassen, M. H. W. (2002): The role of antibodies in myasthenia gravis. In: *Journal of the neurological sciences* 202 (1-2), S. 5–11.
7. Barkas, T.; Gabriel, J. M.; Mauron, A.; Hughes, G. J.; Roth, B.; Alliod, C. et al. (1988): Monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the nicotinic acetylcholine receptor bind to residues 61-76 of the alpha subunit. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (12), S. 5916–5920.
8. Beck, M. E.; Gutbrod, O.; Matthiesen, S. (2015): Insight into the Binding Mode of Agonists of the Nicotinic Acetylcholine Receptor from Calculated Electron Densities. In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*.
9. Beeson, D.; Jeremiah, S.; West, L. F.; Povey, S.; Newsom-Davis, J. (1990): Assignment of the human nicotinic acetylcholine receptor genes: the alpha and delta subunit genes to chromosome 2 and the beta subunit gene to chromosome 17. In: *Annals of human genetics* 54 (Pt 3), S. 199–208.
10. Beeson, D. (2009): Congenital Myasthenic Syndromes. In: H. J. Kaminski (Hg.): *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 239–253.
11. Beroukhi, R.; Unwin, N. (1995): Three-dimensional location of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. In: *Neuron* 15 (2), S. 323–331.
12. Berrih-Aknin, S. (2014 II): Cortactin: a new target in autoimmune myositis and Myasthenia Gravis. In: *Autoimmunity reviews* 13 (10), S. 1001–1002.
13. Berrih-Aknin, S.; Frenkian-Cuvelier, M.; Eymard, B. (2014): Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis. In: *Journal of autoimmunity* 48-49, S. 143–148.
14. Blount, P.; Merlie, J. P. (1990): Mutational analysis of muscle nicotinic acetylcholine receptor subunit assembly. In: *The Journal of cell biology* 111 (6 Pt 1), S. 2613–2622.
15. Boudet, F.; Thèze, J.; Zouali, M. (1991): UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. In: *Journal of Immunological Methods* 142 (1), S. 73–82.
16. Buettner U.W. (2003): Myasthenia gravis und myasthene Syndrome. Pathophysiologie – Klinik – Diagnostik. In: *Schweizerisches Medizin Forum* (Nr. 36), S. 838–842.
17. Burden, S. J.; Yumoto, N.; Zhang, W. (2013): The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (5), S. a009167.

18. Calimet, N.; Simoes, M.; Changeux, J.-P.; Karplus, M.; Taly, A.; Cecchini, M. (2013): A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (42), S. E3987-96.
19. Carr, A. S.; Cardwell, C. R.; McCarron, P. O.; McConville, J. (2010): A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. In: *BioMed Central neurology* 10, S. 46.
20. Celie, P. H.N.; van Rossum-Fikkert, S. E.; van Dijk, W. J.; Brejc, K.; Smit, A. B.; Sixma, T. K. (2004): Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures. In: *Neuron* 41 (6), S. 907–914.
21. Changeux, J.-P.; Taly, A. (2008): Nicotinic receptors, allosteric proteins and medicine. In: *Trends in molecular medicine* 14 (3), S. 93–102.
22. Connolly, C. N.; Wafford, K. A. (2004): The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. In: *Biochemical Society transactions* 32 (Pt3), S. 529–534.
23. Conti-Fine, B. M.; Milani, M.; Kaminski, H. J. (2006): Myasthenia gravis: past, present, and future. In: *The Journal of clinical investigation* 116 (11), S. 2843–2854.
24. Cossins, J.; Belaya, K.; Zoltowska, K.; Koneczny, I.; Maxwell, S.; Jacobson, L.; Leite M.I., Waters P., Vincent A., Beeson D. (2012): The search for new antigenic targets in myasthenia gravis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1275, S. 123–128.
25. Cuatrecasas, P. (1971): Affinity chromatography. In: *Annual review of biochemistry* 40, S. 259–278.
26. Dale, H. H.; Feldberg, W.; Vogt, M. (1936): Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. In: *The Journal of physiology* 86 (4), S. 353–380.
27. Daroff, Robert B.; Benatar, Michael (2009): Ocular Myasthenia. In: Henry J. Kaminski (Hg.): *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 95–104.
28. Dennis, M.; Giraudat, J.; Kotzyba-Hibert, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Chang, J. Y. et al. (1988): Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. In: *Biochemistry* 27 (7), S. 2346–2357.
29. Diener, H.-C.; Ackermann, H. (Hg.) (2012): *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 5., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
30. Dixon, F. J. (Hg.) (1988): *Advances in immunology*. San Diego: Academic Press (Advances in Immunology, v. 42).
31. Drachman, Daniel B.; Kaminski, Henry J. (2014): Neuromuscular junction as Achilles' heel: yet another autoantibody? In: *Neurology* 82 (22), S. 1942–1943.
32. Engel, A. G. (1991): Review of evidence for loss of motor nerve terminal calcium channels in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 635, S. 246–258.
33. Engel, A. G.; Lambert, E. H.; Howard, F. M. (1977): Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. In: *Mayo Clinic proceedings* 52 (5), S. 267–280.
34. Erickson, J. D.; Varoqui, H.; Schafer, M. K.; Modi, W.; Diebler, M. F.; Weihe, E. et al. (1994): Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (35), S. 21929–21932.
35. Fambrough, D. M.; Drachman, D. B.; Satyamurti, S. (1973): Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors. In: *Science (New York, N.Y.)* 182 (4109), S. 293–295.
36. Farrugia, M. E.; Vincent, A. (2010): Autoimmune mediated neuromuscular junction defects. In: *Current opinion in neurology* 23 (5), S. 489–495.
37. Ferguson, S. M.; Savchenko, V.; Apparsundaram, S.; Zwick, M.; Wright, J.; Heilman, C. J. et al. (2003): Vesicular localization and activity-dependent trafficking of presynaptic choline transporters. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (30), S. 9697–9709.

38. Findlay, J. W. A.; Dillard, R. F. (2007): Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. In: *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) J* 9 (2), S. E260-E267.
39. Gallardo, E.; Martínez-Hernández, E.; Titulaer, M. J.; Huijbers, M. G.; Martínez, M. A.; Ramos, A. et al. (2014): Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis. In: *Autoimmunity reviews* 13 (10), S. 1003–1007.
40. Gronseth, G. S.; Barohn, R. J. (2000): Practice parameter: thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. In: *Neurology* 55 (1), S. 7–15.
41. Grutter, T.; Changeux, J. P. (2001): Nicotinic receptors in wonderland. In: *Trends in biochemical sciences* 26 (8), S. 459–463.
42. Gu, Y.; Camacho, P.; Gardner, P.; Hall, Z. W. (1991): Identification of two amino acid residues in the epsilon subunit that promote mammalian muscle acetylcholine receptor assembly in COS cells. In: *Neuron* 6 (6), S. 879–887.
43. Hansen, S. B.; Sulzenbacher, G.; Huxford, T.; Marchot, P.; Taylor, P.; Bourne, Y. (2005): Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. In: *The European Molecular Biology Organization (EMBO) journal* 24 (20), S. 3635–3646.
44. Harper, C. M.; Lennon, V. A. (2009): Lambert-Eaton Syndrome. In: H. J. Kaminski (Hg.): *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 209–225.
45. Helgeland, G.; Petzold, A.; Hoff, J. M.; Gilhus, N. E.; Plant, G. T.; Romi, F. R. (2010): Anti-Heat Shock Protein 70 antibody levels are increased in myasthenia gravis and Guillain-Barré syndrome. In: *Journal of neuroimmunology* 225 (1-2), S. 180–183.
46. Higuchi, O.; Hamuro, J.; Motomura, M.; Yamanashi, Y. (2011): Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. In: *Annals of neurology* 69 (2), S. 418–422.
47. Howard, F. M.; Lennon, V. A.; Finley, J.; Matsumoto, J.; Elveback, L. R. (1987): Clinical correlations of antibodies that bind, block, or modulate human acetylcholine receptors in myasthenia gravis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 505, S. 526–538.
48. Huang, F.-P. (Hg.) (2011): *Autoimmune Disorders - Current Concepts and Advances from Bedside to Mechanistic Insights*: InTech.
49. Hunter, W. M.; Greenwood, F. C. (1962): Preparation of Iodine-131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity. In: *Nature* 194 (4827), S. 495–496.
50. Jahn, R.; Südhof, T. C. (1994): Synaptic vesicles and exocytosis. In: *Annual review of neuroscience* 17, S. 219–246.
51. Jayam T., A.; Dabi, A.; Solieman, N.; Kurukumbi, M.; Kalyanam, J. (2012): Myasthenia gravis: a review. In: *Autoimmune diseases* 2012, S. 874680.
52. Jolly F. (1895): Über Myasthenia gravis pseudoparalytica. In: *Berliner Klinische Wochenschrift* (32), S. 1–7.
53. Kaminski, H. J. (Hg.) (2009): *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Totowa, N.J.: Humana Press.
54. Karlin, A.; Akabas, M. H. (1995): Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. In: *Neuron* 15 (6), S. 1231–1244.
55. Keller, S. H.; Taylor, P. (1999): Determinants responsible for assembly of the nicotinic acetylcholine receptor. In: *The Journal of general physiology* 113 (2), S. 171–176.
56. Kim, H.-G.; Lee, C.-K.; Cho, S.-M.; Whang, K.; Cha, B.-H.; Shin, J.-H. et al. (2013): Neuregulin 1 up-regulates the expression of nicotinic acetylcholine receptors through the ErbB2/ErbB3-PI3K-MAPK signaling cascade in adult autonomic ganglion neurons. In: *Journal of neurochemistry* 124 (4), S. 502–513.

57. Kontou, M.; Leonidas, D. D.; Vatzaki, E. H.; Tsantili, P.; Mamalaki, A.; Oikonomakos, N. G. et al. (2000): The crystal structure of the Fab fragment of a rat monoclonal antibody against the main immunogenic region of the human muscle acetylcholine receptor. In: *European Journal of Biochemistry* 267 (8), S. 2389–2397.
58. Kummer, W.; Lips, K. S.; Pfeil, U. (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. In: *Histochemistry and cell biology* 130 (2), S. 219–234.
59. Labrador-Horrillo, M.; Martínez, M. A.; Selva-O'Callaghan, A.; Trallero-Araguás, E.; Grau-Junyent, J. M.; Vilardell-Tarrés, M.; Juarez, C. (2014): Identification of a novel myositis-associated antibody directed against cortactin. In: *Autoimmunity reviews* 13 (10), S. 1008–1012.
60. Land, B. R.; Harris, W. V.; Salpeter, E. E.; Salpeter, M. M. (1984): Diffusion and binding constants for acetylcholine derived from the falling phase of miniature endplate currents. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (5), S. 1594–1598.
61. Leite, M. I.; Waters, P.; Vincent, A. (2010): Diagnostic use of autoantibodies in myasthenia gravis. In: *Autoimmunity* 43 (5-6), S. 371–379.
62. Leite, M. I.; Jacob, S.; Viegas, S.; Cossins, J.; Clover, L.; Morgan, B. P. et al. (2008): IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. In: *Brain : a journal of neurology* 131 (Pt 7), S. 1940–1952.
63. Lindstrom, J. M.; Anand, R.; Peng, X.; Gerzanich, V.; Wang, F.; Li, Y. (1995): Neuronal Nicotinic Receptor Subtypes. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 757 (1), S. 100–116.
64. Lindstrom, J. M.; Seybold, M. E.; Lennon, V. A.; Whittingham, S.; Duane, D. D. (1976): Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. In: *Neurology* 26 (11), S. 1054–1059.
65. Lindstrom, J. M. (2009): Acetylcholine Receptor Structure. In: H. J. Kaminski (Hg.): *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 15–52.
66. Lindstrom, J.; Shelton, D.; Fujii, Y. (1988): Myasthenia Gravis. In: Frank J. Dixon (Hg.): *Advances in immunology* 42, S. 233–284.
67. Lobos, E. A. (1993): Five Subunit Genes of the Human Muscle Nicotinic Acetylcholine Receptor Are Mapped to Two Linkage Groups on Chromosomes 2 and 17. In: *Genomics* 17 (3), S. 642–650.
68. Lyons, B. W.; Wu, L. L.; Astill, M. E.; Wu, J. T. (1998): Development of an assay for modulating anti-acetylcholine receptor autoantibodies using human rhabdomyosarcoma cell line. In: *Journal of clinical laboratory analysis* 12 (5), S. 315–319.
69. Madhavan, R.; Gong, Z. L.; Ma, J. J.; Chan, A. W. S.; Peng, H. B. (2009): The function of cortactin in the clustering of acetylcholine receptors at the vertebrate neuromuscular junction. In: *Public Library of Science (PloS) one* 4 (12), S. e8478.
70. Meager, A.; Wadhwa, M.; Dilger, P.; Bird, C.; Thorpe, R.; Newsom-Davis, J.; Willcox, N. (2003): Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis. In: *Clinical and experimental immunology* 132 (1), S. 128–136.
71. Meriggioli, M. N.; Sanders, D. B. (2012): Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis? In: *Expert review of clinical immunology* 8 (5), S. 427–438.
72. Mishina, M.; Takai, T.; Imoto, K.; Noda, M.; Takahashi, T.; Numa, S. et al. (1986): Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. In: *Nature* 321 (6068), S. 406–411.
73. Nurullin, L. F.; Mukhitov, A. R.; Tsentsevitsky, A. N.; Petrova, N. V.; Samigullin, D. V.; Malomouzh, A. I. et al. (2011): Voltage-dependent P/Q-type calcium channels at the frog neuromuscular junction. In: *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 60 (5), S. 815–823.

74. Ogawa, T.; Nishimoto, S.; Kagiya, T.; Hagiwara, M. (1986): Changes in the mechanical properties and chemical structure of polystyrene by γ -irradiation. In: *Polymer Degradation and Stability* 15 (4), S. 291–303.
75. Oh, S. J.; Kim, D. E.; Kuruoglu, R.; Bradley, R. J.; Dwyer, D. (1992): Diagnostic sensitivity of the laboratory tests in myasthenia gravis. In: *Muscle & nerve* 15 (6), S. 720–724.
76. Ooi, A.; Wong, A.; Esau, L.; Lemtiri-Chlieh, F.; Gehring, C. (2016): A Guide to Transient Expression of Membrane Proteins in HEK-293 Cells for Functional Characterization. In: *Frontiers in physiology* 7, S. 300
77. Osserman, K. E.; Genkins, G. (1971): Studies in myasthenia gravis: review of a twenty-year experience in over 1200 patients. In: *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 38 (6), S. 497–537.
78. Otto, Herwart F. (2013): Pathologie des Thymus. 2., Aufl. 1998. Berlin: Springer Berlin.
79. Patrick, J.; Lindstrom, J. (1973): Autoimmune response to acetylcholine receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 180 (4088), S. 871–872.
80. Pevzner, A.; Schoser, B.; Peters, K.; Cosma, N.-C.; Karakatsani, A.; Schalke, B. et al. (2012): Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. In: *Journal of neurology* 259 (3), S. 427–435.
81. Phillips, L. H.; Torner, J. C. (1996): Epidemiologic evidence for a changing natural history of myasthenia gravis. In: *Neurology* 47 (5), S. 1233–1238.
82. Poulas, K.; Eliopoulos, E.; Vatzaki, E.; Navaza, J.; Kontou, M.; Oikonomakos, N. et al. (2001): Crystal structure of Fab198, an efficient protector of the acetylcholine receptor against myasthenogenic antibodies. In: *European Journal of Biochemistry* 268 (13), S. 3685–3693.
83. Pumplin, D. W.; Reese, T. S.; Llinas, R. (1981): Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (11), S. 7210–7213.
84. Rand, J. B. (2007): Acetylcholine. In: *WormBook : the online review of C. elegans biology*, S. 1–21.
85. Ribeiro, F. M.; Black, S. A. G.; Prado, V. F.; Rylett, R. J.; Ferguson, S. S. G.; Prado, M. A. M. (2006): The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. In: *Journal of neurochemistry* 97 (1), S. 1–12.
86. Ringler, P.; Kessler, P.; Ménez, A.; Brisson, A. (1997): Purification of the nicotinic acetylcholine receptor protein by affinity chromatography using a regioselectively modified and reversibly immobilized alpha-toxin from *Naja nigricollis*. In: *Biochimica et biophysica acta* 1324 (1), S. 37–46.
87. Rostedt, A. (2011): Myasthenia Gravis: New Insights into the Effect of MuSK Antibodies and Acetylcholinesterase Inhibitors. In: Fang-Ping Huang (Hg.): *Autoimmune Disorders - Current Concepts and Advances from Bedside to Mechanistic Insights*: InTech.
88. Rudolf, R.; Khan, M. M.; Labeit, S.; Deschenes, M. R. (2014): Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy. In: *Frontiers in aging neuroscience* 6, S. 99.
89. Ruff, R. L. (2009): Neuromuscular Junction Physiology and Pathophysiology. In: Henry J. Kaminski (Hg.): *Myasthenia Gravis and Related Disorders*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 1–13.
90. Saedi, M. S.; Conroy, W. G.; Lindstrom, J. (1991): Assembly of Torpedo acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. In: *The Journal of cell biology* 112 (5), S. 1007–1015.
91. Saedi, M. S.; Anand, R.; Conroy, W. G.; Lindstrom, J. (1990): Determination of amino acids critical to the main immunogenic region of intact acetylcholine receptors by in vitro mutagenesis. In: *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* 267 (1), S. 55–59.
92. Samson, A. O.; Levitt, M. (2008): Inhibition Mechanism of the Acetylcholine Receptor by α -Neurotoxins as Revealed by Normal-Mode Dynamics. In: *Biochemistry* 47 (13), S. 4065–4070.

93. Schwarz, H.; Giese, G.; Müller, H.; Koenen, M.; Witzemann, V. (2000): Different functions of fetal and adult AChR subtypes for the formation and maintenance of neuromuscular synapses revealed in ϵ -subunit-deficient mice. In: *European Journal of Neuroscience* 12 (9), S. 3107–3116.
94. Serra, A.; Ruff, R. L.; Leigh, R. J. (2012): Neuromuscular transmission failure in myasthenia gravis: decrement of safety factor and susceptibility of extraocular muscles. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1275, S. 129–135.
95. Sher, E.; Clementi, F. (1987): Mechanism of Antibody-Induced Internalization of the Nicotinic Receptor. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 505 (1 Myasthenia Gr), S. 722–724.
96. Si, J.; Mei, L. (1999): ERK MAP kinase activation is required for acetylcholine receptor inducing activity-induced increase in all five acetylcholine receptor subunit mRNAs as well as synapse-specific expression of acetylcholine receptor epsilon-transgene. In: *Brain research. Molecular brain research* 67 (1), S. 18–27.
97. Simpson, J. A. (1960): Myasthenia Gravis: A New Hypothesis. In: *Scott Med J* 5 (10), S. 419–436.
98. Sine, S. M. (2012): End-Plate Acetylcholine Receptor: Structure, Mechanism, Pharmacology, and Disease. In: *Physiological Reviews* 92 (3), S. 1189–1234.
99. Sine, S. M.; Engel, A. G. (2006): Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. In: *Nature* 440 (7083), S. 448–455.
100. Smith, M. M.; Lindstrom, J.; Merlie, J. P. (1987): Formation of the alpha-bungarotoxin binding site and assembly of the nicotinic acetylcholine receptor subunits occur in the endoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* 262 (9), S. 4367–4376.
101. Stöcker W. in Gressner, Axel M.; Arndt, Torsten (2013): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
102. Stöcker, W.; Saschenbrecker, S.; Rentzsch, K.; Komorowski, L.; Probst, C. (2013 II): Autoantikörperdiagnostik in der Neurologie mittels nativer und rekombinanter Antigensubstrate. In: *Nervenarzt* 84 (4), S. 471–476.
103. Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. (1991): Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 253 (5022), S. 872–879.
104. Thanvi, B. R.; Lo, T. C. N. (2004): Update on myasthenia gravis. In: *Postgraduate medical journal* 80 (950), S. 690–700.
105. Thomas, L.; Abdelhamid, S. (Hg.) (1992): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 4., überarb. und erw. Aufl. Marburg: Med. Verl.-Ges.
106. Titulaer, M. J.; Klooster, R.; Potman, M.; Sabater, L.; Graus, F.; Hegeman, I. M. et al. (2009): SOX antibodies in small-cell lung cancer and Lambert-Eaton myasthenic syndrome: frequency and relation with survival. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (26), S. 4260–4267.
107. Toll, L.; Howard, B. D. (1980): Evidence that an ATPase and a protonmotive force function in the transport of acetylcholine into storage vesicles. In: *The Journal of Biological Chemistry* 255 (5), S. 1787–1789.
108. Tsentsevitsky, A.; Kovyazina, I.; Nikolsky, E.; Bukharaeva, E.; Giniatullin, R. (2013): Redox-sensitive synchronizing action of adenosine on transmitter release at the neuromuscular junction. In: *Neuroscience* 248, S. 699–707.
109. Tukaj, S.; Tiburzy, B.; Manz, R.; Castro M., Andreia d.; Orosz, A.; Ludwig, R. J. et al. (2014): Immunomodulatory effects of heat shock protein 90 inhibition on humoral immune responses. In: *Experimental dermatology* 23 (8), S. 585–590.

110. Tzartos, S. J.; Changeux, J. P. (1983): High affinity binding of alpha-bungarotoxin to the purified alpha-subunit and to its 27,000-dalton proteolytic peptide from *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. Requirement for sodium dodecyl sulfate. In: *The European Molecular Biology Organization (EMBO) journal* 2 (3), S. 381–387.
111. Unwin, N. (2005): Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. In: *Journal of molecular biology* 346 (4), S. 967–989.
112. Vernino, S.; Lennon, V. A. (2004): Autoantibody profiles and neurological correlations of thymoma. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (21), S. 7270–7275.
113. Verrall, S.; Hall, Z. W. (1992): The N-terminal domains of acetylcholine receptor subunits contain recognition signals for the initial steps of receptor assembly. In: *Cell* 68 (1), S. 23–31.
114. Villarroel, A.; Sakmann, B. (1996): Calcium permeability increase of endplate channels in rat muscle during postnatal development. In: *The Journal of physiology* 496 (Pt 2), S. 331–338.
115. Vincent, A.; Newsom-Davis, J. (1985): Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 48 (12), S. 1246–1252.
116. Vincent, A. (2002): Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. In: *Nature reviews. Immunology* 2 (10), S. 797–804.
117. Vrolix, K.; Fraussen, J.; Molenaar, P. C.; Losen, M.; Somers, V.; Stinissen, P. et al. (2010): The auto-antigen repertoire in myasthenia gravis. In: *Autoimmunity* 43 (5-6), S. 380–400.
118. Walker, M. B.: Treatment of myasthenia gravis with physostigmine. In: *Lancet* 1934 (1), S. 1200–1201.
119. Wang, G. K.; Schmidt, J. (1980): Primary structure and binding properties of iodinated derivatives of alpha-bungarotoxin. In: *The Journal of biological chemistry* 255 (23), S. 11156–11162.
120. Westermann J, Denczyk E, Probst C, Komorowski L, Schlumberger W (2014). Nonradioactive detection of autoantibodies against acetylcholine receptors by presenting the complete epitope spectrum. 9. International Congress on Autoimmunity, Nizza, Frankreich.
121. Westermann J, Schütt A, Probst C, Schlumberger W, Stöcker W (2012). Autoantibodies against acetylcholine receptors in myasthenia gravis: RIA based on a new source for the epsilon containing receptor. 8. International Congress on Autoimmunity, Granada, Spanien.
122. Willis T. (1672): *De Anima Brutorum* S. 404-407. Oxford (UK): Oxonii Theatro Sheldoniano.
123. Wirtz, P. W.; Sotodeh, M.; Nijhuis, M.; van Doorn, P. A.; Van Engelen, B G M; Hintzen, R. Q. et al. (2002): Difference in distribution of muscle weakness between myasthenia gravis and the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 73 (6), S. 766–768.
124. Yu, X. M.; Hall, Z. W. (1994): A sequence in the main cytoplasmic loop of the alpha subunit is required for assembly of mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor. In: *Neuron* 13 (1), S. 247–255.
125. Zhang, B.; Tzartos, J. S.; Belimezi, M.; Ragheb, S.; Bealmear, B.; Lewis, R. A. et al. (2012): Autoantibodies to lipoprotein related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. In: *Archives of neurology* 69 (4), S. 445–451.
126. Zhong, W.; Gallivan, J. P.; Zhang, Y.; Li, L.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. (1998): From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology. A cation-binding site in the nicotinic receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (21), S. 12088–12093.
127. Zisimopoulou, P.; Evangelakou, P.; Tzartos, J.; Lazaridis, K.; Zouvelou, V.; Mantegazza, R. et al. (2014): A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. In: *Journal of autoimmunity* 52, S. 139–145.
128. Zweig, M. H.; Campbell, G. (1993): Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. In: *Clinical chemistry* 39 (4), S. 561–577.

6. Eigene Veröffentlichungen

Westermann J, Schütt A, Probst C, Schlumberger W, Stöcker W (2012). Autoantibodies against acetylcholine receptors in myasthenia gravis: RIA based on a new source for the epsilon containing receptor. 8. International Congress on Autoimmunity, Granada, Spanien.

Westermann J, Denczyk E, Probst C, Komorowski L, Schlumberger W (2013). Nonradioactive determination of autoantibodies against acetylcholine receptors in myasthenia gravis: A new enzyme-linked immunoassay for manual and automated processing. 11th Dresden Symposium on Autoantibodies, Dresden, Deutschland.

Westermann J, Denczyk E, Probst C, Komorowski L, Schlumberger W (2014). Nonradioactive detection of autoantibodies against acetylcholine receptors by presenting the complete epitope spectrum. 9. International Congress on Autoimmunity, Nizza, Frankreich.

7. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström, $1\text{Å} = 0,1\text{ nm} = 10^{-10}\text{ m}$
AAk	Autoantikörper
aa	Aminosäure
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholinrezeptor
AChR-Ak	Acetylcholinrezeptor-Antikörper
A. dest.	Aqua destillata
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Becquerel, radioaktive Zerfälle pro Sekunde
BSA	Rinderserum Albumin
°C	Grad Celsius
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
CMAP	compound muscle action potential, Muskel-Aktionspotential
dl	deziliter; $1/10\text{ l} = 100\text{ ml}$
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ED20/50/80%	Äquivalentdosis in nmol/l, Konzentration bei 20%, 50% und 80% der maximalen optischen Dichte
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FKS	fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81\text{ m/s}^2$
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney (humanes embryonales Nierenepithel)
IgG/IgM	Immunglobulin G/M
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
ml	Milliliter
mM	millimolar
ms	Millisekunde
min.	Minute
MG	Myasthenia gravis
MIR	main immunogenic region
MuSK	muscle-specific kinase
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
nm	Nanometer
NMJ	Neuromuscular junction, Neuromuskuläre Synapse
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid, ein Proteinaseinhibitor
PBS	phosphate buffered saline
POD	Peroxydase
ROC	Receiver Operating Characteristic
rpm	rounds per minute (Umdrehungsfrequenz)
RT	Raumtemperatur

s	Sekunden
U	Unit
v/v	volume/volume
VAcHT	vesikulärer Acetylcholintransporter
VGCC	Voltage gated Calcium channel, Spannungsgesteuerter Calciumkanal
VK	Variationskoeffizient (Standardabweichung / Mittelwert in %)
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight

Danksagung

Für die Überlassung des Themas, die Betreuung und für die konstruktive Kritik danke ich Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz.

Prof. Dr. rer. nat. Norbert Tautz, Prof. Dr. med. Jürgen Westermann und Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Kai-Uwe Kalies danke ich für die Bewertung meiner Arbeit als Prüfungsvorsitzender bzw. Berichterstatter.

Prof. Dr. med. Winfried Stöcker danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit bei der EUROIMMUN AG durchführen zu dürfen und für die Beratung bei der Konzeption und der Strukturierung der Arbeit.

Aus der Abteilung Molekularbiologie der Euroimmun AG danke ich dem Kollegen Dr. rer. nat. Christian Probst für die Hilfe bei den molekularbiologischen Fragestellungen und für viele wertvolle und richtungsweisende Ratschläge sowie Dr. rer. nat. Lars Komorowski (Abteilung Immunbiochemische Forschung) für ideenreiche Anregungen.

Ich danke allen Kollegen meiner Abteilung für die gute Zusammenarbeit in freundlicher Atmosphäre und die unermüdliche Hilfsbereitschaft – namentlich Elisa Denczyk, Anneke Schütt, Christina Prehm und Christina Strasser.

Dank an Dr. rer. nat. Ulrike Krummrei (Abteilung Forschungsförderung) für die Hilfe bei der Textkorrektur und an meine Familie, die mich in allen Phasen dieses großen Projektes unterstützt hat.