

Patricia Franke

**Bedeutung des Proteasoms bei der
Pathogenese neuroimmunologischer
und neurodegenerativer Erkrankungen**

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Bedeutung des Proteasoms bei der Pathogenese
neuroimmunologischer und neurodegenerativer
Erkrankungen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Patricia Franke
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. L. Harms
2. Prof. Dr. H. Kettenmann
3. Prof. Dr. med. U. Zettl

Datum der Promotion: 05.06.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Proteasom	2
1.1.1	Die Struktur des 20S-Proteasoms	2
1.1.2	Das Ubiquitin-Proteasom-System	4
1.1.3	Das Immunproteasom	7
1.1.4	Die Aufgaben des Proteasoms	8
1.2.	Die Apoptose	9
1.2.1	Was ist Apoptose?	9
1.2.2	Morphologie und Regulation der Apoptose	9
1.2.3	Bedeutung der Apoptose für die Multiple Sklerose	10
2	Neurodegenerative und -immunologische Erkrankungen	13
2.1	Multiple Sklerose	13
2.2	Amyotrophe Lateralsklerose	19
2.3	Guillain-Barré-Syndrom	22
2.4	Alzheimer Demenz	26
3	Ziel- und Fragestellung	29

4	Material und Methodik	31
4.1	Patienten und untersuchte Medien	31
4.2	Methodik	31
4.2.1	Bestimmung des zirkulierenden Proteasoms	31
4.2.2	Bestimmung der Antikörper gegen das 20S-Proteasom	32
4.2.3	Statistisch angewendete Tests und Auswertung	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Auswertung der ermittelten Konzentrationen an cProteasom im Serum und Liquor der untersuchten Gruppen	33
5.1.1	Deskriptive Statistik	33
5.1.2	Boxplots – Graphische Darstellung der cProteasomenkonzentrationen	34
5.1.3	Korrelation und Streudiagramme	36
5.1.4	Mann-Whitney-U-Test	40
5.1.5	ROC-Kurven	41
5.2	Ergebnisse der Analyse der Antiproteasom-Antikörper im Liquor und im Serum der untersuchten MS-Patienten	42
5.2.1	Deskriptive Datenanalyse	43
5.2.2	Boxplots – Graphische Darstellung der Antikörperniveaus	45
5.2.3	Mann-Whitney-U-Test	46
5.2.4	Korrelationsanalysen	46

6	Diskussion	51
6.1	Diskussion MS-Ergebnisse	51
6.2	Diskussion Guillain-Barré-Syndrom	60
6.3	Diskussion Alzheimer Demenz	62
6.4	Diskussion Amyotrophe Lateralsklerose	64
7	Zusammenfassung	67
8	Anhang	70
A	Literaturverzeichnis	70
B	Abbildungsverzeichnis	83
C	Tabellenverzeichnis	86
D	Abkürzungsverzeichnis	87
E	Danksagung	93
F	Lebenslauf	94
G	Eidesstattliche Erklärung	96

1 Einleitung

Das Proteasom als multikatalytische Einheit mit nukleärer als auch zytosolischer Lokalisierung übernimmt eine Vielzahl von Funktionen wie vor allem den Abbau abnorm gefalteter oder altersschwacher Proteine. Durch seine Involvierung in der Antigenprozessierung und Regulation der Apoptose beansprucht es einen hohen Stellenwert in der Bedeutung für die Immunantwort.

Grundlage für die Anfertigung folgender Arbeit sind Untersuchungen von Egerer et al. 2002 (1), in welchen die Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie Lupus Erythematoses, primärem Sjögren Syndrom, Polymyositis/Dermatomyositis und Rheumatoider Arthritis hinsichtlich der Konzentration an zirkulierendem Proteasom analysiert wurden und eine signifikante Erhöhung der Proteasomenkonzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ersichtlich wurde. In einer weiteren wegweisenden Arbeit von Mayo et al. 2002 (2) wurde eine Untersuchung hinsichtlich einer Ausprägung antiproteasomaler Antikörper bei primärem Sjögren Syndrom, Vaskulitis, Sarkoidose, Morbus Behcet und Multipler Sklerose durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, daß alle o.g. systemischen Autoimmunerkrankungen eine Seropositivität gegenüber dem Proteasom bzw. proteasomalen Untereinheiten aufwiesen.

Diese Arbeit beschäftigt sich grundlegend mit der Frage, ob das Proteasom bzw. antiproteasomale Antikörper im Serum als auch im Liquor neuroimmunologischer und neurodegenerativer Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose, dem Guillain-Barré-Syndrom, der Amyotrophen Lateralsklerose und der Alzheimerschen Demenz primär zu detektieren, ob im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe statistisch relevante Differenzen nachweisbar sind und welche Bedeutung die gewonnenen Ergebnisse in der Pathogenese dieser Erkrankungen erhalten können.

1.1 Das Proteasom

1.1.1 Die Struktur des 20S-Proteasoms

Das 20S-Proteasom ist ein sich im Zytosol bzw. auch im Kern eukaryoter Zellen befindlicher hochmolekularer Proteasekomplex mit einem Durchmesser von 12 nm und einer Länge von

17 nm (3). Es handelt sich um ein ATP-abhängiges proteolytisches System, das im Gegensatz zum membranumschlossenen Lysosom frei vorliegt. Es besitzt einen tonnenartigen Aufbau (Abb. 1) aus vier Ringen, wobei zwei Alpha- und zwei Beta-Ringe existieren, die wiederum aus sieben verschiedenen Untereinheiten aufgebaut sind, so daß sich ein heterodimerer Komplex des Typs $\alpha_7 \beta_7 \beta_7 \alpha_7$ bildet (4).

Die zwei angrenzenden Beta-Ringe umschließen die sogenannte Zentrale Kammer (CC), die 5 nm im Durchmesser mißt und das aktive Zentrum beinhaltet.

Über enge Verbindungen ist diese Zentrale Kammer verbunden mit einer weiter außen gelegenen Vorkammer (AC), welche gemeinsam durch eine Alpha- und Beta-Untereinheit geformt wird (Abb. 2). Die an beiden Enden des tonnenförmigen Proteasoms befindlichen Kanalöffnungen haben einen Durchmesser von 1,2 nm, wodurch somit nur entfaltete Proteine passieren können (5).

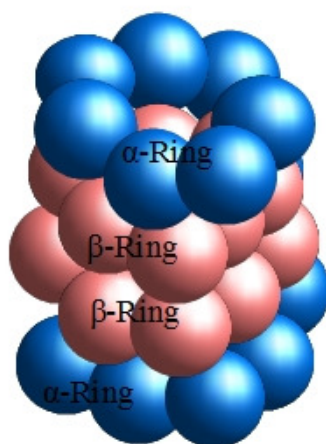


Abb. 1: Struktur des 20S-Proteasoms 1

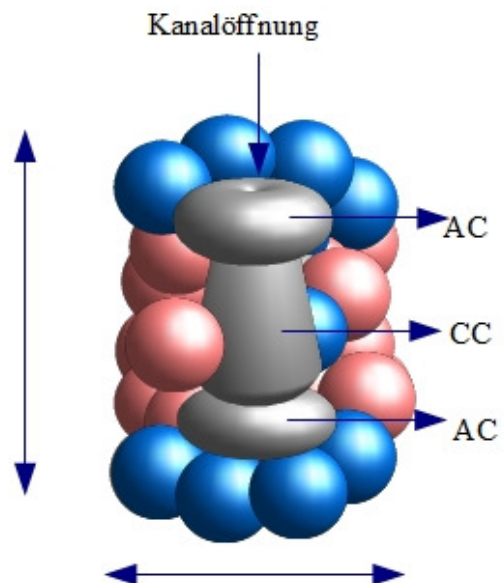


Abb. 2: Struktur des 20S-Proteasoms 2

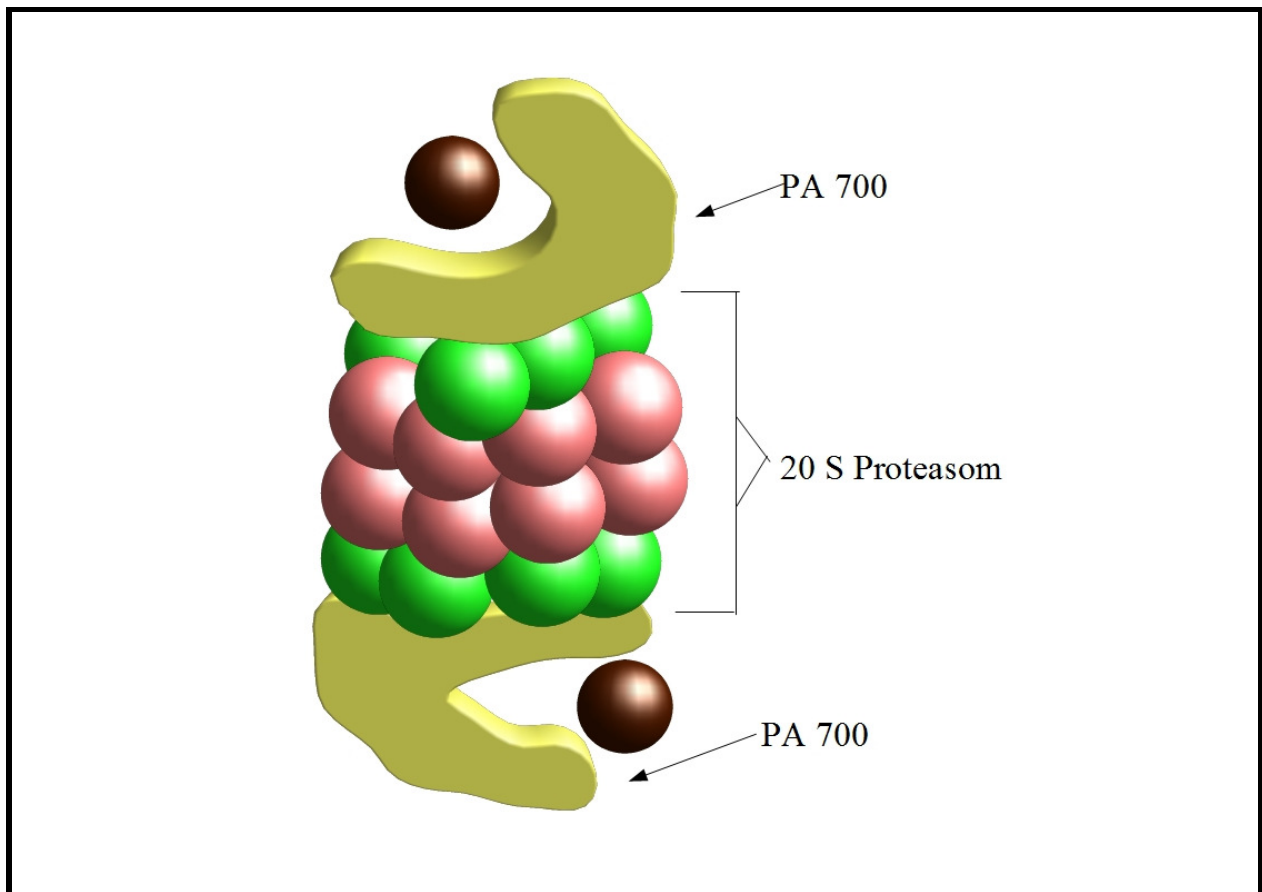


Abb. 3: Aufbau des 26S-Proteasoms

An das 20S-Proteasom können sogenannte Proteinaktivatoren (PA 700, PA 28) gebunden sein, welche für das Erkennen und für die Schleusung der Proteine durch den 20S-Zylinder verantwortlich sind – dadurch entsteht das 26S-Proteasom (Abb.3). Ein regulatorischer Partikel, wie das PA700, besteht wiederum selbst aus zwei Untereinheiten – dem „Lid“ (Deckel) und der „Base“ (Basis) (6). Die Kombination des 20S-Proteasoms mit den Proteinaktivatoren erscheint zudem nicht immer homolog – es existieren dabei Varianten dieser Kombinationen, wie Tabelle 1 veranschaulicht. Die sechs homologe ATPasen beinhaltende Basis realisiert die Entfaltung der Proteine in Vorbereitung auf ihren Eintritt in die zentrale Kammer (7). Im Gegenzug besteht die Aufgabe des „Deckels“, Polyubiquitinketten und die für den Abbau bestimmten Proteine als solche zu erkennen und vom Substrat abzuspalten (8). Nach Einschleusung der Eiweiße in die zentrale Kammer des 20S-Proteasoms erfolgt dort die katalytische Spaltung: die mit δ , MB-1 und Z bezeichneten drei Beta-Untereinheiten verfügen über chymotrypsinähnliche (schneidet nach hydrophoben Resten), trypsinähnliche (nach basischen) und peptidylglutamatpeptidsplattende Aktivität (nach sauren Residuen schneidend) (9).

Komplex	Anteil [%]
20S-Proteasom	31±4
PA700	10±1
PA28	15±10
PA28 – 20S – PA28	15±7
PA700 – 20S – PA28	18±7
PA700 – 20S – PA700 (26S-Proteasom)	11±2

Tab. 1: Verteilung der verschiedenen Proteasomkompositionen im Zytosol von HeLa-Zellen nach Tanahashi et al. 2000 (135)

1.1.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, müssen vor ihrer Einschleusung in das Proteasom markiert werden. Dieses wird durch die Anheftung eines relativ kleinen, aus 76 Aminosäuren bestehenden Proteins, des Ubiquitins (Abb. 4 und 5), realisiert. Dieser Prozeß zur Vorbereitung auf die endgültige Proteinspaltung verläuft in mehreren Stufen unter ATP-Verbrauch (siehe Abb. 6), wobei sich Ubiquitin kovalent an die ϵ -Aminogruppen mehrerer Lysinreste der zur Spaltung vorgesehenen Eiweiße bindet.

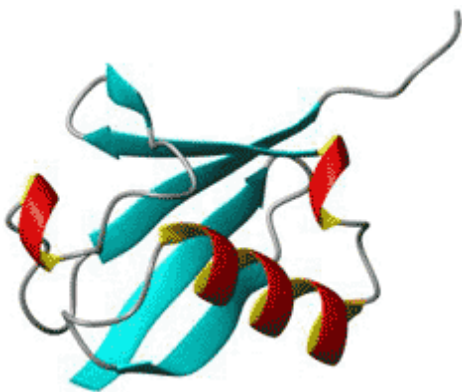


Abb. 4: Struktur des Ubiquitins 1

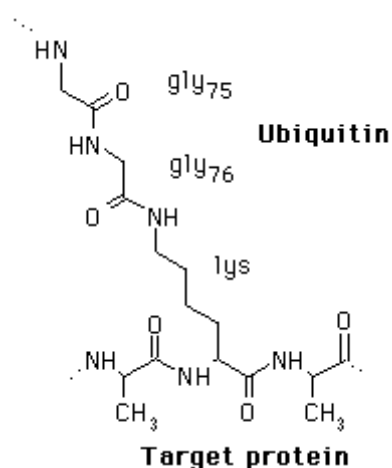


Abb. 5: Struktur des Ubiquitins 2

Zunächst entsteht das Acyl-AMP-Ubiquitin durch Aktivierung des carboxyterminalen Ubiquitinrestes mittels ATP. Im weiteren Verlauf dienen drei Enzyme der kaskadenartigen Anheftung des Ubiquitins an jedes Protein: ein ubiquitinaktivierendes Enzym oder E1, ein ubiquitinkonjugierendes Enzym oder E2 und eine Ubiquitin-Protein-Ligase oder E3. Ubiquitin wird auf eine Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes von E1 unter Energieverbrauch übertragen, so daß ein über einen Thioester verknüpftes kovalentes Zwischenprodukt entsteht. Als nächstes wird von diesem Zwischenprodukt aus das aktivierte Ubiquitin auf die Sulfhydrylgruppe des E2 transferiert. Schließlich katalysiert die Protein-Ligase (E3) die Übertragung des Ubiquitins auf eine ϵ -Aminogruppe des Zielproteins. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Verknüpfung von zwei oder mehreren Ubiquitinmolekülen, so daß regelrechte Ubiquitinketten entstehen, in denen die Moleküle untereinander in Wechselwirkung treten. So wird das Signal für den Abbau verstärkt und geht bei Abspaltung eines Ubiquitinmoleküls nicht verloren (10).

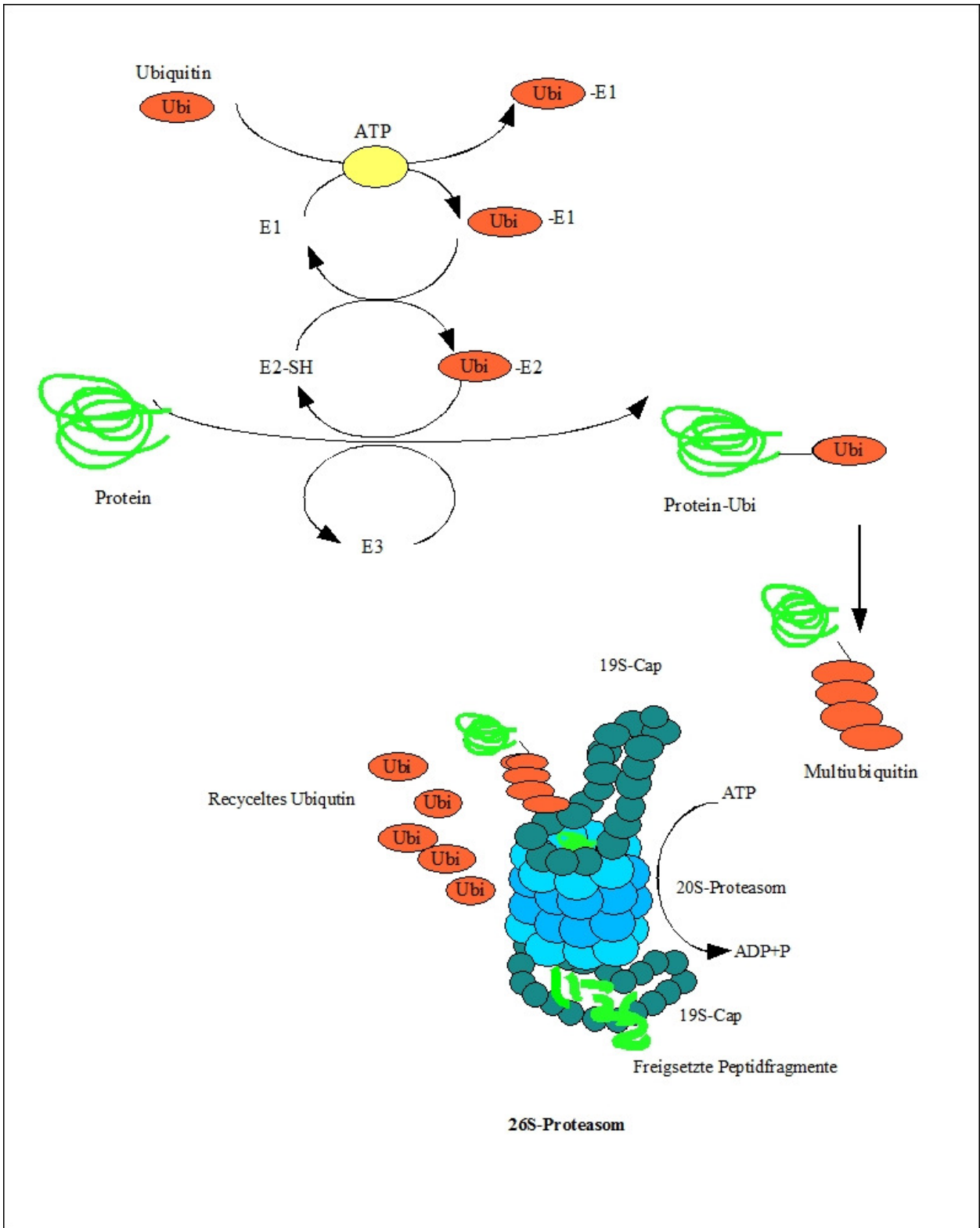


Abb. 6: Ablauf der Ubiquitinkonjugation

1.1.3 Das Immunproteasom

Im Rahmen der Immunantwort kommt es zur Produktion verschiedener immunmodulatorischer Zytokine, wie z.B. IFN- γ , welches durch T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen als auch durch Natürliche Killerzellen sezerniert wird.

Durch Bindung der 11S-Regulatoreinheit (auch Proteasomaktivator 28, PA 28, genannt) an das 20S-Proteasom kommt es zu einer Vervielfachung und Beschleunigung des Proteinabbaus und damit zu einer höheren Generierung von Substraten für die MHC-I-Präsentation. Ein Hinweis auf die Bedeutung der PA 28-Komplexe bei der Antigen-Prozessierung stellt die Beobachtung dar, daß sie vor allem in immunkompetenten Zellen auftreten. Mit Influenza infizierte Fibroblasten zeigten eine Überexpression von PA 28, was zu einer erleichterten Erkennung durch zytotoxischen T-Zellen führte (11). Desweiteren können durch IFN- γ einige Elemente des Proteasoms hochreguliert werden. Es werden drei Beta-ähnliche Untereinheiten produziert, welche die herkömmlichen Beta-Untereinheiten innerhalb der zentralen, proteolytisch aktiven Kammer ersetzen. Es handelt sich dabei um das latente Membranprotein 2 und 7 (LMP2, LMP7) sowie um den multikatalytischen Endopeptidasekomplex-1 (MECL-1) (siehe Abb. 7). Durch dieses Ersetzen wird mehr Spezifität zu den abzubauenen Substraten erreicht (12).

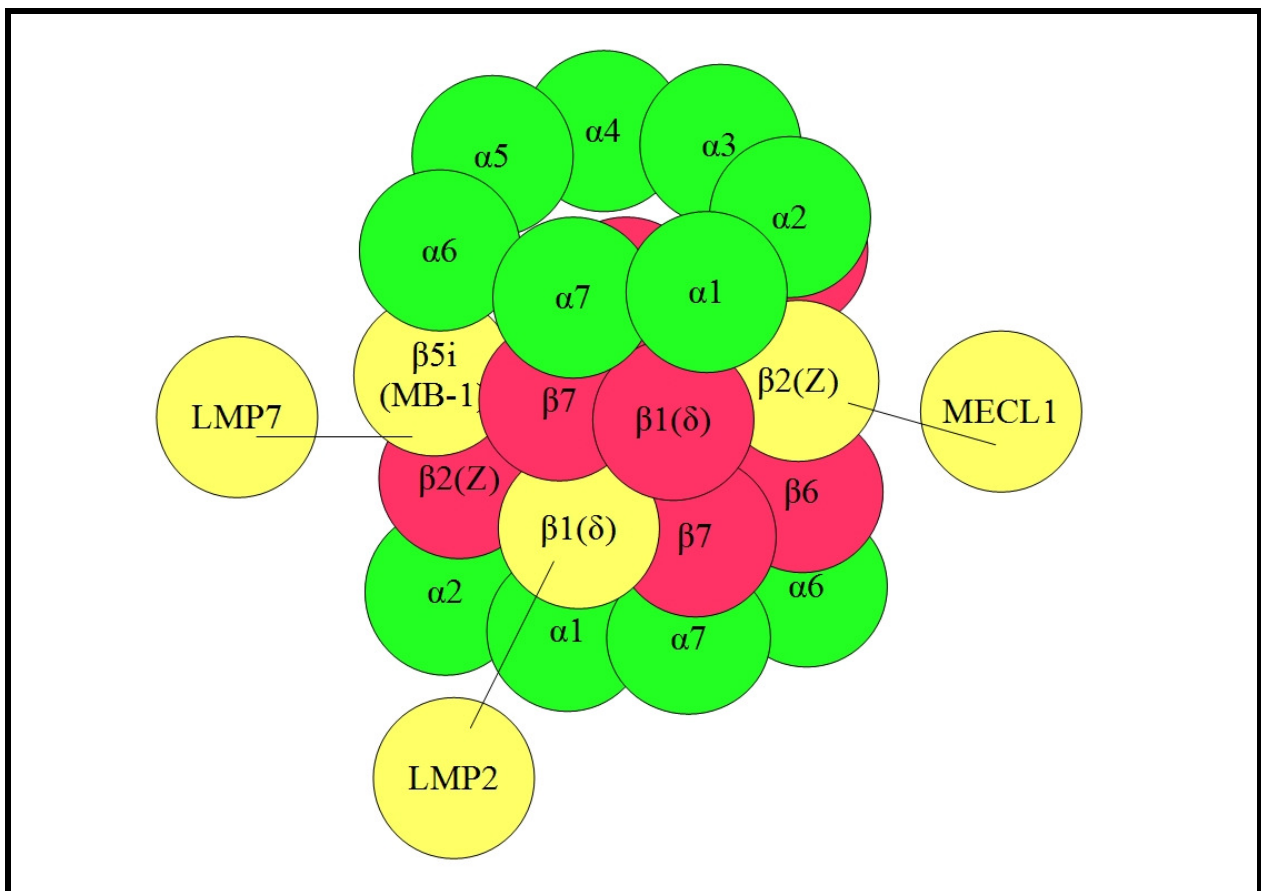


Abb. 7: Das Immunproteasom

1.1.4 Die Aufgaben des Proteasoms

Das Proteasom repräsentiert als multikatalytische Einheit in Zusammenhang mit der Ubiquitinkaskade ein physiologisch katabolisches System für den Abbau von abnorm gefalteten, alterschwachen, aber auch kurzlebigen und vielen langlebigen Proteinen (13), das in allen Zellen strukturell und funktionell etabliert ist. Ein wichtiges Substrat, das durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg reguliert wird, ist der Transskriptionsfaktor NF- κ B, der an sein Inhibitorprotein I κ B gebunden vorliegt. Beim Vorhandensein proinflammatorischer Stimuli (TNF- α) erfolgt die Phosphorylierung und Ubiquitinylierung dieses Inhibitors und schließlich dessen Abbau durch das Proteasom (14). NF- κ B kann nun in seiner aktivierten Form im Zellkern auf die Expression von Genen wirken, welche für verschiedene Zytokine, Chemokine, Immunrezeptoren, Akute-Phase-Proteine, Wachstumsfaktoren und Oberflächenrezeptoren kodieren (15). In der Immunantwort, Entzündungsreaktion als auch in der Transkription von antiapoptotischen Genen kommt NF- κ B über seine Induktion von IL-1 und TNF- α eine hohe Bedeutung zu. Zu weiteren wichtigen Substraten des Proteasoms zählen Regulatoren der Zellzyklusprogression (cyclin dependent kinase wie p21 bzw. p27), der Genexpression (c-jun, β -catenin, E2F1, I κ B), der Onkogenese (p53, p27Kip1) (136) und des Stoffwechsels. Auch im Rahmen der Immunantwort spielt das Proteasom eine zentrale Rolle durch die Beteiligung an der Antigen-Prozessierung. Durch die Aufbereitung von körpereigenen als auch zellfremden Proteinen entstehen Peptidfragmente mit passenden Längen, die via MHC-I/-II-Pathway immunkompetenten Zellen präsentiert werden können. Weiterhin konnten Egerer et al. 2002 (1) zeigen, daß das zirkulierende Proteasom (freigesetztes 20S-Proteasom) assoziiert ist mit Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematodes, Poly-/Dermatomyositis und Rheumatoider Arthritis. Das zirkulierende Proteasom selbst fungiert dabei als Antigen und wird zum Ziel der körpereigenen Immunabwehr. Schließlich ist das Ubiquitin-Proteasom-System selbst in der Lage, auf verschiedenen Wegen auf den Programmierten Zelltod (Apoptose) regulativ Einfluß zu nehmen, was im folgenden noch genauer beleuchtet werden soll.

1.2 Die Apoptose

1.2.1 Was ist Apoptose?

Der programmierte Zelltod (Apoptose) dient als genetisch gesteuerter, hochkonservierter, aktiver Prozess dem Überleben des Individuums durch die Gewährleistung einer normalen artspezifischen embryonalen Entwicklung und sorgt durch regelmäßige Deletion von kranken, infizierten oder überflüssigen Zellen für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes der Gewebe und Organe auch im adulten Organismus.

Im Gegensatz zur Nekrose findet man in der Umgebung apoptotischer Zellen keine Entzündungsreaktion, sondern kann vielmehr typische morphologische Veränderungen wie die Schrumpfung der betreffenden Zellen, das Ausbilden von Bläschen und Ausstülpungen an der Zellmembran (membrane blebbing oder Zeiose) und eine Verdichtung des Chromatins feststellen. Der Kern wird aufgebrochen und setzt die durch DNAsen fragmentierte genomische DNA frei, die zusammen mit anderen Fragmenten und Partikeln membranumschlossene Vesikel – sogenannte „apoptotic bodies“ bildet (16).

1.2.2 Morphologie und Regulation der Apoptose

Im Zentrum des durch verschiedene extrinsische und intrinsische Mechanismen modulierbaren Systems steht die Aktivierung eines kaskadenartig nacheinandergeschalteten Systems von Kaspasen (cysteine-aspartate-specific proteases), die als Proteasen Proteine nach Aspartat in der Position P1 spalten können (17).

Es sind bisher drei verschiedene Wege bekannt (siehe Abb. 8), wie dieses realisiert wird. Beim extrinsischen Typ kommt es durch ein Andocken der Todesrezeptorliganden (TNF-alpha, FasL, Apo) an ihren zuständigen Rezeptor an der Membranoberfläche der bestimmten Zelle zu einer Aktivierung der Initiator-kaspasen (Kaspase-2, -8, -9, -10), die nun ihrerseits die exekutierenden Effektor-kaspasen (Kaspase-3, -6 und -7) „anschalten“ (18).

Durch den proteolytischen Abbau von zelleigenen für DNA-Synthese und -reparatur verantwortlichen Funktionsproteinen wird der irreversible Untergang der Zelle determiniert. Im zweiten, mitochondrial regulierten Weg wird Cytochrom C aus der mitochondrialen Matrix ins Zytoplasma freigesetzt, um sich dort an APAF-1 (Apoptotic protease activating factor-1) zu binden. In Gegenwart von ATP bzw. dATP kann APAF-1 seine CARD-Domäne (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) exprimieren (20), über die die zytosolischen Pro-Caspasen 9 binden.

Dieser Komplex aus Cytochrom C, APAF-1 und Pro-Caspase 9 wird auch als „Apoptosom“ bezeichnet, wobei sich mehrere Pro-Caspasen 9 autokatalytisch zum biologisch aktiven Caspase-9-Heterotetramer spalten, welches dann im nachgeschalteten Kaskadensystem die Effektorcaspasen -3, -6 und -7 initiieren kann (19).

Neben der cytochromabhängigen Realisation der Apoptose kann durch verschiedene andere mitochondrial freigesetzte Stoffe ebenfalls, zum Teil auch kaspasenunabhängig, die Apoptose eingeleitet und/oder verstärkt werden, wie es z.B. für “smac” (second mitochondria-derived activator of caspase) untersucht wurde (20). Diese Partikel binden Inhibierende-Apoptose-Proteine (IAPs) und stellen damit den Ablauf der Kaskade sicher. Zum anderen veranlassen Apoptose-Induzierende-Faktoren (AIFs) eine von Kaspasen autarke hochmolekulare Fragmentation der genomischen DNA (21). Die Rolle der Mitochondrien im Regulationsprozeß der Apoptose wird kontrolliert durch die Proteine der Bcl-2 Genfamilie, wobei funktionell zwei Gruppen, nämlich die der Apoptose-Antagonisten (bcl-2, bcl-xl, ccl-w, CED-9) und der proapoptotischen Proteine (bax, bak, bok, bad, bcl-xs) unterschieden werden, die durch Einbau von Poren in die Mitochondrienmembran das dortige Membranpotential ändern und somit auch ihre Aktivität und Einflußnahme auf die Apoptose (22).

P53 als Vertreter der Tumorsuppressorgene codiert für verschiedene der mitochondrialen proapoptotischen Proteine (z.B. bax, NOXA, PUMA) und auch für verschiedene der Todes-Rezeptor-Proteine, wie z.B. Fas (23).

Eine weiterer Weg der Initiierung der Apoptose, ebenfalls unabhängig vom Todes-Rezeptor-Signalweg und der mitochondrialen Steuerung, kommt dem endoplasmatischen Retikulum zu, wo im Rahmen einer Streßantwort (verminderter oder gehemmter Proteinexport) und durch Dysregulationen im empfindlichen Calciumhaushalt die Caspase-12 aktiviert wird und damit Apoptosesignale ausgelöst werden.

1.2.3 Bedeutung der Apoptose für die Multiple Sklerose

Apoptose als Mechanismus des Organismus, Gewebe oder Zellen zu eliminieren, die einen gestörten oder krankhaften Entwicklungsverlauf nehmen, konnte durch verschiedene Experimente in der Vergangenheit demonstriert werden. So konnte bei der EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis), einer im Tierexperiment ausgelösten, der MS sehr ähnlichen Erkrankung, nachgewiesen werden, daß die Inflammation im ZNS durch den programmierten Zelltod autoreaktiver T-Lymphozyten terminiert wird, wie auch Untersuchungen an Patienten mit akuter disseminierter Enzephalomyelitis (ADEM) bestätigen: hier konnte man ein Drittel der im ZNS etablierten T-Lymphozyten als apoptotisch identifizieren (24).

Der Apoptose scheint also nach wissenschaftlichen Ermittlungen über die Pathogenese der MS eine sehr bedeutende, wenngleich auch sehr differenzierte Rolle zuzukommen. Schon Pender et al. 1998 (25) äußerten den Verdacht, daß verschiedene Mechanismen einer gestörten Apoptose maßgeblich zur Entstehung einer Multiplen Sklerose beitragen können, wobei man aber hierbei verschiedene Wege diskutieren muß. Nach Lucchinetti et al. 1996 (26) wurde eine Klassifizierung der MS nach histopathologischen Kriterien vorgenommen. So beobachtet man bei Typ I und Typ II eine antikörpervermittelte, T-Zell-medierte Entmarkung, während bei Typ III und Typ IV eine Apoptose der Oligodendrozyten und der Verlust von Myelin-assoziiertem Glykoprotein im Vordergrund steht, dieses also weniger die autoimmune Genese der Erkrankung beschreibt, sondern vielmehr an eine virus- oder toxininduzierte Dystrophie denken läßt.

Eine Ursache für die vermehrte Apoptose der Subtypen III und IV geht nach neueren Untersuchungen auf eine Überexpression des p53 Gens zurück (27), welches durch einen Defekt in seiner Transkription und Regulation zu einer vermehrten Produktion von proapoptotischen Proteinen der bcl-Genfamilie führt. Bei den Typen I und II geht man von einer Störung der Apoptose der T-Lymphozyten aus, was heißt, dass hier eine fehlerhafte Regulation der Apoptose zu einer Persistenz autoreaktiver T-Lymphozyten führt (28). Durch dieses Überleben kann eine weitere Zytokinsekretion und Immunzellrekrutierung ablaufen, welche das entzündliche Geschehen am Laufen hält. Auch die Antigenreaktivität zu Bestandteilen der Myelinscheiden wird dadurch aufrechterhalten und mündet final in einer Zerstörung der Oligodendrozyten.

Ursachen einer gestörten T-Zell-Apoptose sieht man in einer erniedrigten Expression von Liganden der Todesrezeptorfamilie (z.B. Fas) oder aber auch in einer abnormen Dimerisierung des Todesrezeptors auf den T-Lymphozyten.

Auch durch eine vermehrte Expression antiapoptotischer und eine verringerte Synthese/Aktivierung proapoptotischer Proteine, vor allem der bcl-2-Genfamilie, kann dieses Szenario möglich sein. So konnte gezeigt werden, daß eine experimentelle Inhibition der ligandenmedierten Apoptose via Komplement-Komplex C5b-9 zu einer Hemmung der Effektor-kaspase-3 führte und die TNF-alpha bedingte Apoptose verhindert werden konnte (29). Soweit können die Apoptose modulierenden Mechanismen der Elemente des Kaspadensystems beurteilt werden.

Es sind jedoch auch noch weitere immunologische Komponenten an der Erkrankungsentstehung mit in Betracht zu ziehen. Inwieweit dem Proteasom eine Rolle als Modulator der Immunpathogenese zugeschrieben werden kann, soll im folgenden Übersichtskapitel erläutert werden.

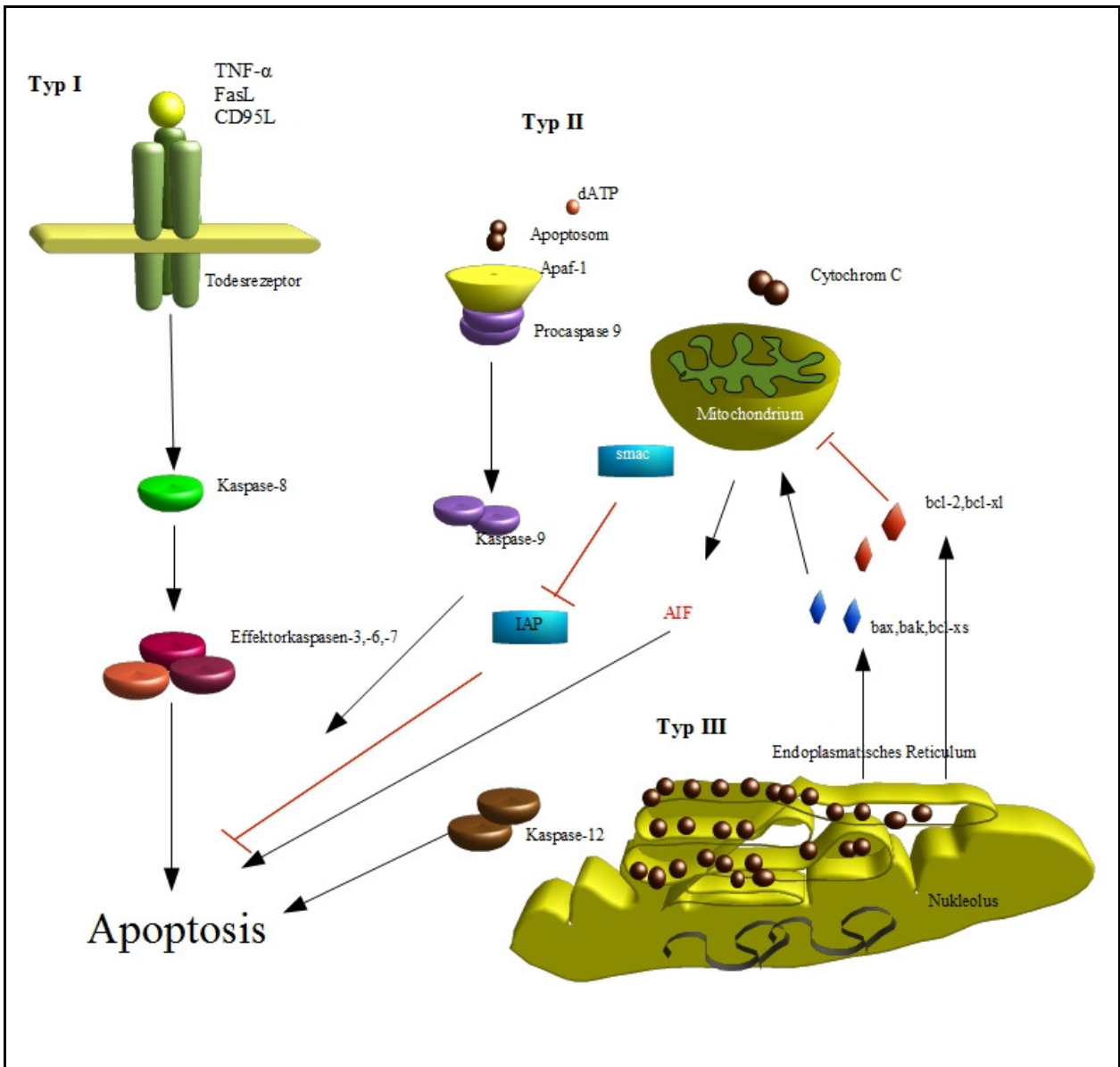


Abb. 8: Ablauf der Apoptose

2 Neurodegenerative und -immunologische Erkrankungen

2.1 Multiple Sklerose

Einleitung

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems mit unterschiedlichen Verlaufsformen, die zu einer Demyelinisierung der weißen Substanz und zum axonalen Untergang führt, wobei vor allem junge Erwachsene (Frauen häufiger als Männer), im Median 28 Jahre, betroffen sind (30).

Makroskopisch findet man periventrikuläre Entmarkungsherde sowie Läsionen im Bereich des Rückenmarks, der Nervi optici und auch der Kleinhirnstiele.

Im Zentrum des Geschehens steht der entmarkte Plaque, innerhalb dessen die Zerstörung des Myelins bzw. der die Markscheiden bildenden Zellen, der Oligodendrozyten, stattfindet mit konsekutivem Verlust an Axonen und reaktiver Gliose.

Klinisches Krankheitsbild und Prognose

Die sich vor allem zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr manifestierende Erkrankung ist durch einen sehr variablen Verlauf gekennzeichnet, bei dessen Beschreibung sich die klinische Einteilung nach Lublin und Reingold etabliert hat (31) (Abb. 9).

Ca. 85% der Patienten zeigen zu Beginn der Erkrankung einen schubförmig-remittierenden Verlauf (RR-MS) (32), wobei die neurologischen Ausfälle mindestens 24 Stunden anhalten und sich meist im Verlaufe weniger Wochen wieder komplett zurückbilden.

Der erste Krankheitsschub stellt sich vor allem bei den jüngeren Patienten oft als eine Neuritis nervi optici bzw. als Parästhesien dar, die am Anfang nahezu vollständig rückläufig sind. Bei 50% der Patienten, die zu Beginn eine isolierte Optikusneuritis zeigten, kann im Verlauf der folgenden Jahre eine klinisch sichere MS-Diagnose gestellt werden (33).

Mit neurologisch schwerwiegenderen Dysfunktionen wie Paresen, sensiblen und autonomen Ausfällen beginnt die Erkrankung häufig bei älteren Patienten.

Ist der spätere Verlauf der Erkrankung durch eine Progression unter kontinuierlicher Zunahme der neurologischen Ausfälle über mindestens sechs Monate ohne komplette Remission gekennzeichnet, spricht man von einem Übergang der schubförmigen in eine sekundär progrediente (SP-MS) Verlaufsform.

Bei der primär progredienten Form der Multiplen Sklerose (PP-MS) verschlechtert sich das Krankheitsbild von Beginn an kontinuierlich mit oder ohne zusätzliche Schübe, jedoch ohne Phasen der Remission - diese Patienten zeigen die schlechteste Prognose im Verlauf.

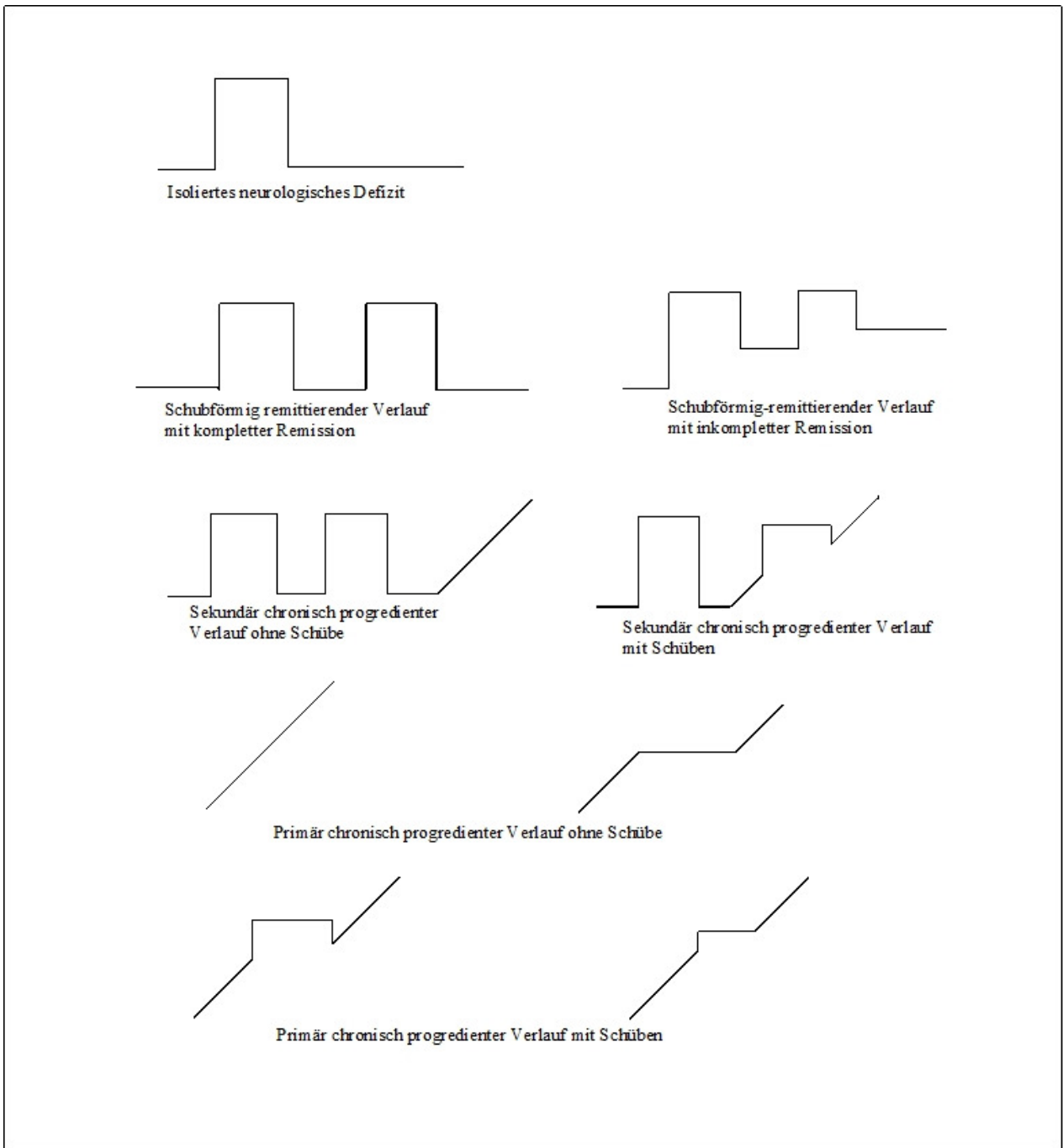


Abb. 9: Verlaufsformen der MS nach Lublin und Reingold 1996 (31)

Immunpathologie und Pathogenese

Bei der Erforschung der Pathogenese der Multiplen Sklerose konnten verschiedene immunologische Mechanismen ermittelt werden, die zum Verlust der Markscheiden und zu einem unterschiedlichen Betroffensein von Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen führen.

Der Versuch, hieraus folgende Typisierung der Erkrankung abzuleiten, bleibt allerdings nicht unwidersprochen.

Typ I	Makrophagen- und T-Zell-vermittelter Myelinabbau
Typ II	Immunglobulin- und Komplement-medierte Entmarkung
Typ III	Apoptose der Oligodendrozyten und Verlust von Myelin assoziiertem Glykoprotein
Typ IV	expansive Oligodendrozytenschädigung mit nukleärer Fragmentation in der periläsionalen weißen Substanz

Nach Lucchinetti et al. 1996 (26)

Die Erkrankung verläuft meist zweigipflig:

Initial kommt es durch eine hohe inflammatorische Aktivität und v.a. durch periaxonale Ödembildung und Demyelinisierung zu einem Funktionsverlust und dadurch bedingtem Herabsetzen der Nervenleitgeschwindigkeit, wobei sich jedoch nach geraumer Zeit durch das Abklingen des Ödems und durch eine partielle Remyelinisierung eine Rückbildung des Funktionsverlustes einstellt (PP-MS).

Im weiteren Verlauf zeichnet sich die Erkrankung aus durch eine zunehmend verminderte Regenerationskapazität, und es folgt das Stadium der sekundären Progression (SP-MS); hierbei führen wiederholte Schübe zum Oligodendrozytenverlust und zur irreversiblen Destruktion des axonalen Gewebes mit konsekutiver Ausbildung von Narbengewebe. Offensichtlich vollzieht sich eine gewisse axonale Degeneration aber auch schon in der frühen Erkrankungsphase.

Zur Klärung der Frage, wie sich derartig aggressive entzündliche Läsionen im ZNS etablieren können, dienen verschieden Entstehungsmodelle, die die Existenz von aktivierten T-Lymphozyten voraussetzen, die in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren (34).

Man geht davon aus, daß T-Lymphozyten im peripheren Immunsystem, beispielsweise im Rahmen einer Infektion, aktiviert werden und durch ihre Freisetzung von Zytokinen, wie TNF- α und γ -IFN, die Blut-Hirn-Schranke aufgelockert wird.

Weiterhin sezernieren sie Adhäsionsmoleküle für das Anhaften am Endothel und verschiedenen Enzyme, z.B. Metalloproteinasen, die die Migration ins Zielgewebe erleichtern. Entlang des aufgebauten Chemokingradienten folgen ihnen Makrophagen und Monozyten ins ZNS.

Diese T-Lymphozyten agieren als Entzündungsauslöser, wenn sie dort auf ihr spezifisches Antigen treffen und lokale HLA-Moleküle entsprechend exprimiert sind, welche man z.B. in verschiedenen Gliazellpopulationen und perivaskulären Monozyten und in Astrozyten finden kann (35) und die durch verschiedene unspezifische Reize und traumatischen Stress hochreguliert werden können (36).

Als potentielle Autoantigene, die als primäres Ziel der T-Zell vermittelten Immunreaktion dienen, wurden verschiedene Bestandteile der Myelinscheiden diskutiert, wie das Proteolipidprotein (PLP), das sich maßgeblich für die Integrität der Myelinscheiden verantwortlich zeichnet, als auch das Basische Myelinprotein (MBP), welches die „major dense line“ des Myelins bildet und für dessen Kompaktierung sorgt.

Andere bedeutsame, wenn auch weitaus seltener vorkommende Myelinproteine, wie das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) und das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) können bei MS-Patienten zu einer dominanten T-Zell-Antwort führen (37).

Als weitere potentielle Antigene wurden auch das Protein S-100 (38) sowie die Zyklonukleotidphosphodiesterase (CNPase) und andere identifiziert (Tabelle 2) (39).

Die Spezifität der T-Lymphozyten beschränkt sich jedoch nicht auf ein Antigen, sondern kann sich innerhalb eines Krankheitsverlaufes auf verschiedene Antigene ausdehnen, ein Phänomen, das als „epitope spreading“ beschrieben ist. Es ist nicht selten, daß T-Lymphozyten auf mehrere Epitope gleichzeitig reagieren oder nach einem Infekt eine Kreuzreaktivität mit ZNS-Gewebeanteilen auftritt. Die Bedeutung der humoralen Beteiligung am komplexen Geschehen zeigt sich am Nachweis oligoklonaler Banden als Folge klonaler Expansion der Immunglobulin sezernierenden B-Zellen, die man nach Ansicht der gegenwärtigen Forschung vor allem in aktiven MS-Herden vorfindet.

Die Th1 bedingte Zytokinproduktion führt zur Bildung reifer Plasmazellen und damit zur Sekretion von Immunglobulinen, deren Antigenpezifität noch nicht ausreichend geklärt ist. Forschungen zeigen, daß die Antikörper gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und das Basische Myelinprotein (MBP) als auch gegen Oligodendrozytenvorläuferzellen gerichtet sind. Immunglobulinablagerungen locken weitere Entzündungszellen wie Makrophagen an den Ort der Entzündung (40).

Aktivierte T-Lymphozyten können also bei Kontakt mit dem geeigneten Antigen und entsprechender lokaler HLA-Expimierung eine Entzündungsreaktion auslösen, wobei durch die Produktion und Interaktion von Zytokinen wie IL-2, γ -Interferon und TNF- α eine Rekrutierung

und Aktivierung von weiteren Entzündungszellen wie Makrophagen, Mikroglia und B-Lymphozyten stattfindet und damit das Fortschreiten der Entzündung aufrechterhalten wird. Durch eine weitere Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Zytokinen sowie einer Myelin-Antikörper-Komplementaktivierung folgt schließlich die Demyelinisierung und axonale Schädigung (41) - ein Prozess, der vom Organismus u.a. durch Apoptose der aggressiven T-Lymphozyten schließlich zum Stillstand gebracht wird.

Zum weiteren Verständnis der Pathogenese und der Immunologie der Multiplen Sklerose dienen verschiedenen Tiermodelle, wie die EAE- Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis:

Nach Immunisierung von Nagetier- als auch Affenstämmen mit Myelinantigenen wie MBP, PLP oder MOG kann man MS-ähnliche Veränderungen im ZNS nachweisen. Bereits wenige Tage nach der Vakzinierung fand man eine Proliferation der CD4+ Th1-Lymphozytenpopulationen, die proinflammatorische Zytokine (γ -IFN, TNF- α) produzieren, was auch im akuten Schub der MS zu diagnostizieren ist, während in Phasen der Remission eine Th2-dominierte Immunantwort mit Sekretion antiinflammatorischer Zytokine (IL-4, TGF-beta) vorherrscht.

Doch leider spiegeln diese Experimente immer nur bestimmte Spektren der Immunogenese wieder, denn so reichen die Manifestationen von einem monophasischen Verlauf mit starker inflammatorischer Komponente ohne wesentliche Demyelinisierungsaspekte bei der Lewis-Ratte über chronisch rezidivierende bis hin zu stark demyelinisierenden Verläufen mit Befall der Sehnerven.

Wohl ist der Verlauf auch abhängig von der Wahl des Antigens. So ließen sich bei EAE-resistenten Stämmen nach Einbringen eines anderen Antigens durchaus MS-ähnliche Veränderungen induzieren. Es ist vorstellbar, daß man für die Untersuchung der interindividuell sehr unterschiedlichen Facetten der Immunpathogenese der MS diese EAE-Modelle gezielt einsetzt.

Warum es beim MS-Patienten zu einer pathologischen Aktivierung bzw. zur Persistenz autoreaktiver T-Zellen kommt, ist gegenwärtig noch nicht vollends verstanden. Die weitere Untersuchung regulatorischer Mechanismen der T-Zelle (Apoptose-Induktion, T-Zell-Tolerierung, Entwicklung der T-Helfer-Zellsubpopulationen und T-Zell-Rezeptorantigenspezifität) (42) als auch die Klärung der Bedeutung der verschiedenen Antigene (MBP) (43) können in Zukunft mehr zum Verständnis dieses komplexen Geschehens beitragen. Zunehmend wird auch wieder eine infektiöse Genese der Multiplen Sklerose diskutiert. So konnten verschiedene Viren bei MS-Patienten isoliert werden (Tabelle 2). Allerdings kann nach den bisher vorliegenden Daten eine direkte Auslösung einer MS durch Virusinfektionen nicht belegt werden; jedoch scheint eine virale Infektion bei einer genetischen Disposition und dem Zusammenwirken von anderen Umweltfaktoren die Erkrankungssuszeptibilität zu steigern bzw.

einen Schub zu triggern (44). Insbesondere dem Epstein-Barr-Virus scheint eine ätiopathogenetische Rolle zuzukommen, wie verschiedene Studien in den vergangenen Jahren belegen konnten. Epitopähnlichkeiten zwischen Myelin- und viralen Bestandteilen („Molekulare Mimikry“) begünstigen die Sensibilisierung der autoreaktiven T-Lymphozyten und damit letztlich die Entstehung einer überschießenden Entzündungsreaktion im ZNS (45).

<p><u>Myelinspezifische potentielle Antigene</u></p> <p>Basisches Myelinprotein (MBP)</p> <p>Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)</p> <p>Proteolipidprotein (PLP)</p> <p>Myelin assoziiertes Glykoprotein (MAG)</p> <p>Myelin Oligodendrogliales Basisches Protein (MOBP)</p> <p>Oligodendrozyten-spezifisches Protein (OSP)</p> <p><u>Nicht myelinspezifische potentielle Antigene</u></p> <p>Zyklonukleotidphosphodiesterase (CNPase)</p> <p>Protein S-100</p> <p>α/β-Crystallin</p> <p>Transaldolase</p> <p>Hitzeschockproteine</p>	<p><u>Isolierte Viren bei MS-Patienten</u></p> <p>Humanes T-Zell-Lymphotropes Virus I (HTLV-I)</p> <p>Humanes Herpesvirus -6A (HHV-6A)</p> <p>Epstein-Barr-Virus (EBV)</p> <p>Multiple-Sklerose-assoziiertes Retrovirus (MSRV)</p>
--	---

Tab. 2: Mit einer MS-Erkrankung in Zusammenhang stehende potentielle Antigene und Viren

2.2 Amyotrophe Lateralsklerose

Definition

Die erstmals vor über 125 Jahren von Charcot beschriebene Erkrankung bezeichnet einen degenerativen Befall motorischer Nerven in Gehirn, Hirnstamm und Rückenmark ohne klar ersichtliche Ätiologie bzw. Risikofaktoren, die im Median nach drei Jahren zum Tode führt (46). Durch Ganglienzellschwund der spinalen bulbären und/oder kortikalen Motoneurone kommt es zu atrophischen Paresen, Faszikulationen und Muskelkrämpfen bzw. zu spastischen Lähmungen sowie bulbären Symptomen, wobei Sensibilität, Okulomotorik als auch Sphinkterfunktionen und intellektuelle Fähigkeiten weitestgehend erhalten bleiben. Bei ca. 3-5% der Patienten tritt eine fronto-temporal betonte Demenz auf.

Untergruppen

Man unterscheidet die progressive spinale Muskelatrophie (PMA), bei welcher zunächst nur das untere (spinale) Motoneuron betroffen ist und demnach vorwiegend atrophische Schwächen der Muskulatur im Vordergrund stehen, und die primäre Lateralsklerose (PLS), bei welcher vorwiegend das erste (kortikale) Neuron betroffen ist, was sich in einem spastisch erhöhten Muskeltonus, Paresen als auch pathologischen Reflexen nach Babinski, Gordon, Oppenheim und Trömmner manifestiert.

Bei einem primären Ausfall der motorischen Hirnnervenkerne im Bereich der Medulla oblongata, gekennzeichnet durch das Betroffensein der Kau-, Sprech- und Schluckmuskulatur (Dysphagie, Zungenatrophie, Heiserkeit, verwaschene Sprache), mit anfänglichen Aussparung der Arm- und Beinmuskulatur, spricht man von einer primären Bulbärparalyse.

Etwa 60% der Patienten bieten eine klassische ALS, bei welcher zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Degenerationen des oberen als auch unteren Motoneurons auftreten – nur ca. 17% werden durch eine rein spinale Muskelatrophie, ohne spastische Zeichen, und ca. 16% durch eine bulbäre Symptomatik auffällig (47).

Pathogenese und Immunologie, Erklärungsmodelle (siehe Abb. 10)

In 90 bis 95% der Fälle handelt es sich um die sporadische Form der Erkrankung ohne faßbare genetische Komponenten. Die verbleibenden 5-10% treten familiär mit einem zumeist dominanten Erbgang auf und unterscheiden sich von den sporadischen Fällen weder klinisch noch neuropathologisch. Es findet sich hier in 15-20% der Fälle eine Mutation im Gen, das für die Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1) kodiert (48).

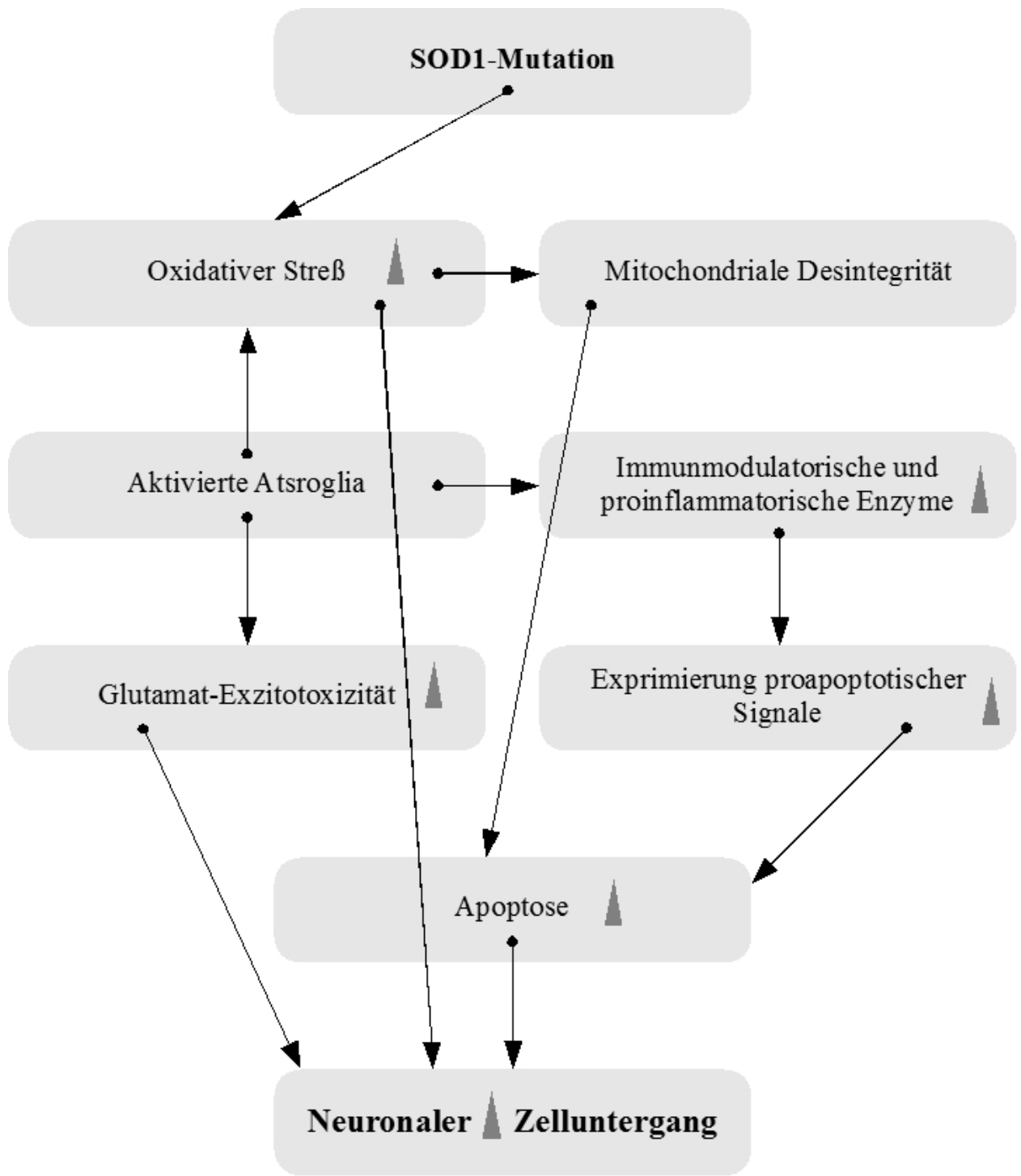
SOD1 als ubiquitäres zytoplasmatisches Enzym katalysiert die Konversion freier Sauerstoffradikale zu Wasser und dient somit wesentlich als Radikalfänger (49).

Durch Experimente mit transgenen mSOD1-Mausstämmen konnte geklärt werden, daß Mutationen dieses Gens es mit neuen toxischen Eigenschaften ausstatten und damit den Untergang motorischer Neurone hervorrufen (50). Am Ende der Kaskade von Ereignissen, die zum SOD1-mediierten Zelltod führen, steht die Apoptose. Bestätigung dieser „Apoptose-Theorie“ finden Untersuchungen hinsichtlich Verteilungsmuster antiapoptotischer Signalgeber wie bcl-2 (51) und Überexpression von proapoptotischen Kaspasen-1 und -3 (52) im Rückenmark von mSOD1-Mäusen. In weiteren Untersuchungen wurde die Rolle des oxidativen Stresses auf die verstärkte Apoptose von Motoneuronen beleuchtet. Man geht von einem Verlust mitochondrialer Integrität durch oxidative Schädigung aus, was schließlich die Apoptose-Theorie stützt. Mitochondrien reagieren sehr vulnerabel auf oxidative Vorgänge, z.B. mit Aufblähung, Vakuolenbildung oder mit Ruptur ihrer äußeren Membran, was zu einer Freisetzung von Cytochrom C führt, welches wiederum die Aktivierung apoptoseinitiiierender Kaspasen bedingt (53).

Dieses Szenario konnte in neuropathologischen Studien an einigen transgenen FALS (familial ALS) – Mäusen (54) – nicht aber nach weiteren abschließenden Untersuchungen für alle ALS-assoziierten SOD1-Mutationen beobachtet werden. Ein weiterer Mechanismus, der seit Jahren schon in der Diskussion um die Pathogenese der ALS steht, ist der Einfluß des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat.

Störungen im Glutamat-Haushalt, bedingt durch intrazelluläre Transmitterfreisetzung bei Zelluntergang oder durch eine selektive Reduktion des Glutamat-Transporter-Proteins EAAT2, (55) dienen als mögliches Erklärungsmodell für neuronalen Zelltod – als allein verantwortlicher Primärmechanismus kommt jedoch auch die Glutamat-Exzitotoxizität nicht in Frage. In das Zentrum des Forschungsinteresses ist auch zunehmend die Frage nach der Bedeutung der Gliareaktion bei der Genese der ALS gerückt. Man vermutet eine aktive Teilnahme von Astroglia und Mikroglia an der Neurodegeneration durch Freisetzung von immunmodulatorischen Zytokinen.

So konnte bei aktivierten Gliazellen im Rückenmark von mSOD1-Mäusen vermehrt das Enzym iNOS (inducible nitric oxid synthase) gemessen werden, wodurch ein NO-mediiertes oxidatives Zellschaden zu beobachten war (56). Deutlich erhöhte Levels an IL-6, IL-1beta sowie Prostaglandin E2 im Liquor von ALS-Patienten stützen die Theorie einer entzündungsbedingten Genese. Zudem triggert ein hohes Prostaglandin E2 die Freisetzung von Glutamat aus Astroglia, was zu einer Verstärkung des exzitatorischen Stresses führt (57).



▲ Zunahme

Abb. 10: Mögliche Pathomechanismen bei der Entstehung der ALS

2.3 Guillain-Barré-Syndrom

Definition

Das Guillain-Barré-Syndrom GBS ist eine akut entzündliche, monophasisch verlaufende demyelinisierende Erkrankung des peripheren Nervensystems. Die Axone der peripheren Nerven können in unterschiedlichem Ausmaß betroffen sein. Die erstmals 1916 durch die französischen Neurologen Georges Guillain, Jean-Alexandre Barré und André Strohl beschriebene Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine rasch progrediente, symmetrisch betonte Schwäche proximaler und distaler Muskelgruppen bis hin zur Quadriplegie sowie Ateminsuffizienz – nicht selten sind verschiedene Hirnnerven beteiligt.

Typischerweise kommt es zu einer Abschwächung der Muskeleigenreflexe mit begleitenden sensiblen, zentripetal voranschreitenden Reiz- und Ausfallserscheinungen. Nach Moulin et al. 1997 (58) können in bis zu 90% der Fälle ausgeprägte radikuläre, neuralgieforme Schmerzen auftreten. Daneben finden sich sehr häufig Störungen des autonomen Nervensystems (im Sinne von Brady- und Tachykardien), kardialen Erregungsleitungsstörungen als auch Dysregulationen in der Darmmotilität und Schweißsekretion (59).

Epidemiologie

In über 50% der Fälle stellt das GBS die häufigste Ursache für akute generalisierte Lähmungen in Nord- und Westeuropa dar (60) mit einer Inzidenz von 0,8-2/100 000, während Männer etwas häufiger erkranken (1,25:1 nach Hughes und Rens 1997).

GBS tritt in allen Altersgruppen auf, wobei Häufigkeit als auch Morbidität und Mortalität mit zunehmendem Alter linear ansteigen (61).

In 40% der Fälle geht der Erkrankung ein Infekt der oberen Atemwege voraus, in ca. 20% ein gastrointestinaler Infekt, wobei eine stattgehabte Infektion mit *Campylobacter jejuni* am häufigsten diagnostiziert wird (62).

Ein Zusammenhang mit einer Impfung und einem GBS ließen sich für Influenza und einem vormals verwendeten Tollwut-Vakzin evaluieren. Für weitere Impfstoffe, wie Polio-, Typhus-, Cholera- oder Diphtherie-Tetanus-Pertussis-Vakzine konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko nicht stichhaltig bewiesen werden (61).

Diagnostik

Zur Diagnosesicherung dienen neben den klinischen Zeichen einer progredient schlaffen Parese mit Hypo- oder Areflexie und Progression über weniger als vier Wochen vor allem die Elektrophysiologie und die Liquordiagnostik.

Im Liquor zeigt sich ab ca. der zweiten Krankheitswoche eine zytoalbuminäre Dissoziation mit isolierter Erhöhung des Proteingehaltes bei normaler Zellzahl. Dieses kann bei 90% der Patienten detektiert werden (63). Neurographisch manifestiert sich die Demyelinisierung in einer verringerten Nervenleitungsgeschwindigkeit oder Leitungsblöcken, verlängerter F-Wellen-Latenz und motorischer Amplitudenreduktion (64).

Nach neueren Studienlagen gilt der Verlust des H-Reflexes in der Frühphase der Erkrankung (ab dem 5. Krankheitstag) als das sensitivste Kriterium (65).

Krankheitsbilder

Man unterscheidet hinsichtlich klinischem Bild, Immunpathogenese und elektrophysiologischen Befunden die akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (AIDP), was dem „klassischen“ Bild des GBS entspricht und in Westeuropa mit 85-90% vertreten ist, daneben die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN), die akute motorische und sensorische Neuropathie (AMSAN) und das Miller-Fisher-Syndrom (MFS).

AIDP

Das klassische pathologische Bild des Guillain-Barré-Syndroms zeigt eine mononukleäre Zellinfiltration in den betroffenen Nerven, Plexus und Nervenwurzeln.

Man geht von einer systemischen Aktivierung von T-Zellen im peripheren Immunsystem aus. Erhöhte proinflammatorische Zytokinspiegel an IFN-gamma, TNF-alpha oder IL-6/IL-2 konnten im Blut von GBS-Patienten detektiert werden (66). Durch Überwindung der Blut-Nerven-Schranke mittels Matrixmetalloproteinasen und löslichen Adhäsionsmolekülen, deren erhöhte Titer ebenfalls bei GBS-Patienten (67) zu detektieren waren, gelingt die Migration autoreaktiver T-Zellen ins periphere Immunsystem. Nach Bindung an die passenden MHC-Moleküle erfolgt die Aktivierung und klonale Expansion der T-Lymphozyten, welche ihrerseits wiederum Zytokine freisetzen, um die im unteren Axonlemma ortsständige Mikroglia zu aktivieren. Diese aktivierten Makrophagen führen zur Invasion der Schwannzell-Basalmembran und schließlich zur Lyse des Myelins. In zentripetaler Richtung erfolgt die Zerstörung des Myelins auf humoralem Wege durch Antikörperbindung auf der Oberfläche der Schwannzellen, der Fixation von Komplement und Destruktion der Schwannzellen mit Auflösung der Myelinscheide.

In schweren Läsionen können auch die Axone in Mitleidenschaft gezogen werden im Sinne einer „Bystander“-Reaktion auf die toxischen Enzyme und Radikale, die im Rahmen des inflammatorischen Geschehens freigesetzt werden (68). Bei der v.a. in ländlichen Gegenden Chinas endemisch vorkommenden akuten motorischen axonalen Neuropathie (AMAN) beobachtet man rein motorische Ausfälle mit nur milder autonomer Dysfunktion. Bei 76% dieser Patienten kann eine Infektion mit *Campylobacter jejuni* nachgewiesen werden (69). Man vermutet, daß durch bakterielle gangliosidähnliche Epitope B-Zellen stimuliert werden, Antikörper zu produzieren, die kreuzreaktive axolemmale Antigene opsonieren und zu einer Komplementbindung führen. Dadurch werden ortsständige Makrophagen veranlaßt, den periaxonalen Raum/Ranvierschen Schnürring zu befallen, was zur Blockierung der Nervenleitung oder zur direkten axonalen Schädigung führt (70).

Bei der Ätiologie der akuten motorischen und sensorischen Neuropathie (AMSAN) geht man von einer ähnlichen Pathogenese wie der AMAN aus, wobei sich das entzündliche Geschehen vor allem auf die dorsalen Spinalwurzeln ausdehnt (71). Das etwa 5% aller GBS-Fälle ausmachende Miller-Fisher-Syndrom ist durch die Trias Ophthalmoplegie, Ataxie und Areflexie gekennzeichnet; eine motorische Schwäche fehlt in aller Regel. Einige Patienten zeigen zusätzliche Hirnstammenläsionen im Sinne einer Bickerstaff-Enzephalitis. Die Pathologie bleibt bisher unklar, da aufgrund eines eher milden und unkomplizierten Verlaufes nur einige wenige Fälle histopathologisch untersucht wurden: hier zeigt sich eine Inflammation und Demyelinisierung der Spinalwurzeln und der Hirnnerven (72).

Pathogenese

Humorale und zelluläre Immunantworten gegen antigene Epitope auf Schwanzzellen, Myelin oder Axonen sind in der Pathogenese des Guillain-Barré-Syndroms involviert. In der frühen Phase der Erkrankung wird vor allem das Komplementsystem als pathogenetischer Initiator der immunmedierten Myelindestruktion vermutet (68). Weiterhin vermutet man eine T-Zell-Beteiligung am entzündlichen Geschehen (meßbar erhöhte Titer an aktivierten T-Lymphozyten, löslichem IL-2-Rezeptor) (73) und auch die histopathologisch erwiesene multifokalen Lymphozyteninfiltration bei den meisten GBS-Fällen (74).

Neben der zellulären Immunität wird auch der humoralen Immunantwort eine große Rolle in der Pathogenese zugeschrieben, wofür auch die Wirksamkeit der Plasmapherese beim GBS spricht. Man geht von einer Kreuzreaktivität, im Sinne eines molekularen Mimikry, gegenüber bakteriellen Epitopen und körpereigenen Proteinen aus (75).

Es werden vor allem Infektionen mit *Campylobacter jejunii*, aber auch Cytomegalievirus- und *Mycoplasma pneumoniae*-Infektionen mit einer nachfolgenden GBS-Erkrankung in Zusammenhang gebracht. Es liegen Epitopähnlichkeiten zwischen bakteriellen Lipopolysacchariden der Zellwand und humanen Gangliosiden und Myelinproteinen vor, die zu einer möglichen Kreuzreaktivität und damit zu einer Immunstimulation führen (76).

Die Experimentelle Autoimmunneuritis (EAN) spiegelt als tierexperimentelles Modell sehr eng die Pathologie der akuten inflammatorischen demyelinisierenden Neuropathie (AIDP) wieder, welche dem gängigen klinischen Bild des GBS entspricht. Hier konnte die Sekretion bestimmter Antikörper gegen Myelinproteine wie P0, P1 oder PMP 22 isoliert werden (77). Glycolipide und Ganglioside identifizierte man als weitere Antigene, gegen die sich die Autoimmunität vor allem bei den verschiedenen GBS-Unterformen richtet (siehe Tab. 3).

	Antikörper
AIDP (Akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie)	P0, P1, PMP 22
AMSAN (Akute motorische und sensorische Neuropathie)	GM1, GM1b, GD1a
AMAN (Akute motorische axonale Neuropathie)	Ga1Nac-GD1a, GM1, GM1b, GD1a,
Miller-Fisher-Syndrome	GQ1b, GT1a

Tab. 3: Klassifikation des Guillain-Barré-Syndroms und seiner typischen Antikörpermuster, modifiziert nach Hughes und Cornblath 2005 (78)

2.4 Alzheimer Demenz

Definition

Der Morbus Alzheimer als eine Form einer neurodegenerativen Erkrankung stellt sich in seinem Verlauf mit dem fortschreitenden Verlust kognitiver, mentaler und psychoaffektiver Fähigkeiten dar. Die Alzheimer-Erkrankung umfaßt eine ätiologisch heterogene Gruppe von neuropathologisch und klinisch sehr ähnlichen Krankheitsbildern. Man unterscheidet präsenile, familiäre (autosomal dominante) Formen (familial Alzheimer's disease, FAD) von der Gruppe der senilen, sporadischen Alzheimer-Demenz (senile Demenz vom Alzheimer-Typ, SDAT), deren Manifestationsalter meist nach dem 65. Lebensjahr liegt (79).

Neuropathologisch kommt es zu einer, durch massiven Abbau von Neuronen bedingten Hirnatrophie, die v.a. das limbische System und den cerebralen Kortex involviert. Charakteristika bilden die intrazellulären Ablagerungen aus verändertem mikrotubuliassoziierten Protein Tau (neurofibrillary tangles, NFT) als auch die extrazellulären Amyloid-Plaques (80).

Epidemiologie

Alter ist der Hauptindikator für die Entwicklung einer Demenz. Man geht weltweit etwa von 24,3 Millionen Menschen aus, die an einer Demenz leiden, 4,6 Mio. neue Erkrankungen pro Jahr kommen dazu. Die meisten Menschen mit einer Demenz leben aufgrund der demographischen Situation in den entwickelten Ländern (60% im Jahr 2001, mit einem erwarteten Anstieg auf 71% im Jahr 2040).

Nach Schätzungen der WHO im World Health Report 2003 nimmt das Krankheitsbild der Demenz die wichtigste Stellung in der Gesundheitsbeeinträchtigung der über 60-Jährigen ein. Demnach führt Demenz zu 11,2% der Jahre, die mit Behinderung gelebt werden, während Schlaganfälle mit 9,5%, Rücken- und Gelenksbeschwerden mit 8,9%, kardiovaskuläre Erkrankungen mit 5,0% und alle Formen von Krebs mit 2,4% beteiligt sind (81).

Pathogenese

Der Nachweis von amyloidalen Ablagerungen (A β -Amyloid) gilt als Spezifikum für die Alzheimer-Demenz, und ein vermehrtes Vorkommen scheint für den Abbau der intellektuellen Fähigkeiten maßgeblich verantwortlich zu sein, wobei das Ausmaß der Ablagerungen eng mit dem Grad der Demenz zu korrelieren scheint (82).

Ausgehend von A β -Proteinsequenzanalysen wurde deutlich, daß die A β -Sequenz nur Teil eines wesentlich größeren Vorläuferproteins ist, dem mehr als 170 kb umfassenden APP-Gen (Amyloid Precursor Protein) (83). Mutationen in diesem Gen führen zu einer Erhöhung der A β -Amyloid-Freisetzung um das fünf- bis achtfache (84).

Genetische Ursachen

Als genetische Ursache der familiären Alzheimer-Demenz (FAD) konnten neben dem APP-Gen auf Chromosom 21 weitere Gene identifiziert werden, wie das Gen für Apolipoprotein (ApoE) auf Chromosom 19, Presinilin 1 (PS1) auf Chromosom 14 und Presinilin 2 (PS2) auf Chromosom 1, wobei vier dieser Gene an ca. 50% aller FAD-Fälle beteiligt sind (83).

Sporadische Alzheimer-Form

Neben genetischen Ursachen wurden erstmals 1975 auch inflammatorische Prozesse in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung vermutet (85).

Neuere immunhistochemische Untersuchungen zeigen, daß Zytokine, Wachstumsfaktoren, Komplement-Proteine, Akute-Phase-Proteine und Adhäsionsmoleküle mit der Plaquebildung vergesellschaftet sind. Astrozyten und Mikroglia scheinen dabei selbst durch das A β -Protein aktiviert zu werden. Mikroglia, die mit A β -Protein und gamma-IFN behandelt wurden, sezernierten neurotoxische Faktoren wie TNF-alpha als auch NO (86), während Astrozyten verstärkt Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen (87). Neurofibrillenveränderungen mit hyperphosphoryliertem Tau-Protein spielen neben dem β A4-Protein 1-42 eine Rolle bei der Pathogenese. Die neurofibrillären Bündel finden sich bei der Alzheimer-Demenz hauptsächlich in den am stärksten betroffenen Arealen und Assoziationsgebieten. Die Fibrillen enthalten neben Tau-Protein aber auch Tau-negative Einschlüsse, die sich unspezifisch mit Ubiquitin-Antikörpern anfärben lassen und im Zusammenhang mit einer Motoneuronbeteiligung zu stehen scheinen (88). Diese Fakten münden schlüssig in der Hypothese des Ungleichgewichts zwischen Bildung und Abbau bzw. sonstiger Entfernung von Amyloid (89). Weiterhin konnte man eine erhöhte Inzidenz an Alzheimer-Demenzerkrankungen nach Schädel-Hirn-Traumen feststellen (90). Der Einfluß chemischer Noxen auf die Pathogenese wird kontrovers bewertet: ein Zusammenhang wurde zwischen der Serum-Aluminiumkonzentration und der AD-Inzidenz diskutiert (91). Ebenso existieren Hypothesen zur Bedeutung des oxidativen Stresses, wonach die durch die mitochondriale Atmungskette anfallenden freien Sauerstoffradikale zu einer Beeinträchtigung der antioxidativen Enzyme (Katalasen, Superoxiddismutasen, Gluthationperoxidasen) und damit zu einer Begünstigung der Erkrankung in vulnerablen Zelltypen führen können (92). Am Ende der Entwicklung steht der durch Apoptose bzw. Nekrose realisierte Zelltod.

Diagnostik

Beweisend für eine Alzheimer-Demenz sind die neuropathologischen Darstellungen der Amyloid-haltigen Plaques und Neurofibrillenbündel. Klinisch handelt es sich bei der Diagnose Alzheimer immer um eine Ausschlussdiagnose, die in etwa 80% d.F. mit dem neuropathologischen Befund übereinstimmt (93).

Gemäß ICD-10 folgt die Diagnosestellung nach folgenden Kriterien – siehe Tabelle 4. Untersuchungen wie cCT oder MRT, PET oder SPECT können die Diagnose stützen (94). Tau-Protein läßt sich bei den Erkrankten auch im Nervenwasser nachweisen: präspektiv möglicherweise ein sicherer Nachweistest zu Lebzeiten. Die diagnostische Treffsicherheit der Liquoruntersuchungen kann durch eine Kombination der beiden Marker Tau-Protein und β -42-Peptid verbessert werden. Das Tau-Protein kann inzwischen mit kommerziell erhältlichen ELISAs nachgewiesen werden. Hohes Tau-Protein/erniedrigtes β 42-Peptid gelten heute als wertvolle Biomarker für die sporadische (nicht erbliche) Alzheimerkrankheit (95).

<p>Obligat</p> <p>Demenz-Syndrom</p> <ul style="list-style-type: none">• Erfolgreicher Ausschluß von: sekundäre Demenz-Syndrome, delirantes Syndrom, Bewußtseinsstörung, psychiatrische Erkrankungen wie Depression, Schizophrenie <p>Unterstützend</p> <ul style="list-style-type: none">• Beginn zwischen 40. und 90. Lj. (meist nach 65. Lj.)• Schleichender Beginn und kontinuierliche Progression (auch passagerer Stillstand)• Kein plötzlicher Beginn• Keine frühen fokalen Symptome (z.B. Hemiparese, Sensibilitätsstörung, Gesichtsfelddefekt, Koordinationsstörung, Gangstörung, Epilepsie)• Assoziierte Symptome wie Depression, Schlafstörung, Inkontinenz, Wahn, Halluzinationen, Erregungszustände, sexuelle Störungen, Muskeltonuserhöhungen, Myoklonus, Gangstörungen (auch Epilepsie im Verlauf)• Positive Familienanamnese• Progrediente Hirnatrophie in der Bildgebung, Unauffällige Liquor- und EEG-Befunde

Tab. 4: Klinische Kriterien für Alzheimer-Demenz (nach ICD-10, DSM-IV-TR und NINCDS-ADRDA)

3 Ziel- und Fragestellung

Das Proteasom präsentiert als multikatalytische Einheit in Zusammenhang mit der Ubiquitinkaskade ein physiologisch katabolisches System für den Abbau von abnorm gefalteten, alterschwachen aber auch kurzlebigen und vielen langlebigen Proteinen (13), das in allen Zellen strukturell und funktionell etabliert ist. Es spielt eine große Rolle für die Regulation von Stoffwechsel, Transkription und Zellzyklus durch seine schnelle Degradation geschwindigkeitsbestimmender Proteine, Transkriptionsfaktoren und regulatorischer Proteine. Im Rahmen der Immunantwort kommt dem Proteasom eine hohe Bedeutung zu durch die Beteiligung an der Antigen-Prozessierung.

Durch die Aufbereitung von körpereigenen als auch zellfremden Proteinen entstehen Peptidfragmente mit passenden Längen, die via MHC-I/II-Pathway immunkompetenten Zellen präsentiert werden können (11). Schließlich ist das Ubiquitin-Proteasom-System in der Lage, auf verschiedenen Wegen auf den programmierten Zelltod (Apoptose) regulativ Einfluß zu nehmen. (96, 97, 98, 99). In dieser Arbeit gingen wir der Frage nach, ob sich das zirkulierende Proteasom (cProteasom) im Serum, aber vor allem auch im Liquor von Patienten mit neurodegenerativen und neuroimmunologischen Erkrankungen nachweisen läßt. Dazu sollten Serum-Liquor-Paare von Patienten mit Multipler Sklerose, Amyotropher Lateralsklerose, Guillain-Barré-Syndrom und Alzheimer-Demenz hinsichtlich Konzentration des zirkulierenden Proteasoms (cProteasom) untersucht und die ermittelten Werte in einen Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe gebracht werden.

Weiterhin sollte evaluiert werden, ob eine Korrelation der cProteasom-Level zwischen Serum und Liquor besteht. Grundlage für diese Überlegungen sind Studien von Egerer et al. 2002 (1). Hier detektierte man in den Seren von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Systemischen Lypus Erythematodes (SLE), primärem Sjögren Syndrom (pSS), Polymyositis/Dermatomyositis (PM/DM) und Rheumatoider Arthritis (RA) signifikant erhöhte Konzentrationen an zirkulierendem Proteasom (cProteasom). Weitere Forschungen ziehen die Möglichkeit in Betracht, daß das Proteasom selbst zum Angriffspunkt der körpereigenen Immunabwehr wird. Diese Vermutung konnte von Egerer et al. (1) bestätigt werden, wonach in untersuchten Seren neben den Antikörpern gegen freizirkulierende DNA auch Anti-Proteasom-Antikörper bei 57% der Patienten mit SLE, bei 60% der Patienten mit PM/DM und bei 39% der Patienten mit primärem Sjögren Syndrom gefunden wurden. Auch Mayo et al. 2002 (2) lieferten in ihrer Untersuchung evidente Aspekte auf die Prävalenz antiproteasomaler Antikörper bei Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose. In einer weiteren Analyse der

antiproteasomalen Antikörper im Serum und im Liquor der Patienten mit Multipler Sklerose wollten wir diese Ergebnisse eruieren und eine mögliche Korrelation zu den erhobenen cProteasom-Levels herausstellen. Schließlich sollten die gewonnen Ergebnisse in den Kontext aktueller Forschungen zur Pathoimmunologie der jeweiligen Krankheitsbilder eingeordnet werden.

4 Material und Methodik

4.1 Patienten und untersuchte Medien

In die vorliegende Arbeit wurde eine Gruppe von 139 Patienten mit neurodegenerativen und -immunologischen Erkrankungen: darunter 32 Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose, 25 mit Guillain-Barré-Syndrom, 30 mit Multipler Sklerose und 52 mit Alzheimer Demenz sowie eine Kontrollgruppe von 33 gesunden Probanden eingeschlossen (Tab. 5).

Erkrankung/Kontrolle	ALS	GBS	MS	AD	Gesunde Probanden
Anzahl	32	25	30	52	33
Männlich	16	15	16	33	15
Weiblich	16	10	14	19	18

Tab. 5: Anzahl der in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten

Es wurden jeweils 150 µg Patientenserum und -liquor für die Analyse aus Rückstellproben des Liquorlabors der Klinik für Neurologie der Charité Berlin verwendet, um daraus die Konzentrationen des zirkulierenden Proteasoms (cProteasoms) sowie der Proteasom-Antikörper zu bestimmen.

Einverständniserklärung (informed consent) lag vor der Untersuchung bei allen Patienten vor.

4.2 Methodik

4.2.1 Bestimmung des zirkulierenden Proteasoms

Mikrotiterplatten wurden über Nacht beschichtet mit dem polyklonalen Proteasom-spezifischen AntiProteasom-Antikörper K42 1:1000 (Institut für Biochemie der Charité Berlin) in einer Carbonatpuffer-Lösung bei pH 9,6. Die verbleibenden Bindungsstellen wurden mit 0,5%-igen fetalem Kälberserum (FCS) in Pufferlösung bei pH 7,4 geblockt.

Die humanen Plasmaproben, Verdünnung 1:10, und die unverdünnten Liquorproben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Eichkurven wurden erstellt unter Verwendung von gereinigtem humanen Proteasom (Institut für Biochemie der Charité Berlin) in sechs Verdünnungsschritten von 1000 ng/ml bis auf 12,5 ng/ml. Nach der Reinigung wurde ein Biotin-markierter monoklonaler Anti-Proteasom-Antikörper, HP 903 (10µg/ml) (Biogenes, Berlin), für

den Nachweis des Antigens (Verdünnung 1:1000) appliziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die gebundenen Biotin-markierten Antikörper wurden unter Verwendung von Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (Sigma, Verdünnung 1:2000) mit Tetramethylbenzidin als Substrat nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten nach Stoppen mit 1mol Schwefelsäure mittels Mikroplatten-Reader bei 450 nm nachgewiesen.

Der Referenzbereich (< 400 ng/ml) wurde berechnet unter Verwendung des Mittelwertes plus 2,5facher Standardabweichung, basierend auf der Analyse von 85 gesunden Probanden. Um die Möglichkeit der nichtspezifischen Bindung auszuschließen, testeten wir verschiedene Kontrollproteine (Rinderserumalbumin, FCS) anstelle des Proteasoms und konnten keine positive Reaktion beobachten (1).

4.2.2 Bestimmung der Antikörper gegen das 20S-Proteasom

Multititerplatten wurde über Nacht mit 20S Proteasom in Carbonat-Puffer ph 9,6 inkubiert. Eine Blockierung der verbleibenden Bindungsstellen erfolgte mit Rotiblock in Wasser 1:10. Serum wurde 1:100 verdünnt (PBS/Tween), Liquor wurde unverdünnt eingesetzt. 50 µl der Proben wurden 40 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde ein anti-human-IgG-POD-gekoppelter Antikörper zugegeben und 30 min. inkubiert. Nach den einzelnen Schritten wurde jeweils 4x mit PBS/Tween gewaschen. Nach Zugabe von TMB und Stoppen mit 1mol Schwefelsäure wurde bei 450 nm gemessen. Die Konzentration wurde gegen eine Eichkurve aus einem definierten Patientenserum bestimmt und die Konzentration in U/ml angegeben. Der Cut-Off im Serum beträgt < 25 U/ml.

4.2.3 Statistisch angewendete Tests und Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels deskriptiver Datenanalyse der absoluten Konzentrationen, mit Angabe von Mittelwert, Standardabweichung sowie Median und Quartilen. Der Vergleich der Signifikanzniveaus der einzelnen Krankheitsgruppen zur gesunden Kontrollgruppe erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Für die graphische Darstellung wurden Boxplots, Korrelations- und Streudiagramme sowie ROC-Kurven zur Veranschaulichung der Sensitivität des Nachweises des cProteasoms angewendet (SPSS für Windows: Release 11.01.1, Copyright © SPSS Inc. 1998 – 2001).

5 Ergebnisse

5.1 Auswertung der ermittelten Konzentrationen an cProteasom im Serum und Liquor der untersuchten Gruppen

5.1.1 Deskriptive Statistik

Erkrankung/Kontrolle	ALS	GBS	MS	AD	Gesunde Probanden
Konzentration cProteasom Serum [ng/ml]					
Mittelwert	466,02	654,23	513,29	815,07	571,01
Standardabweichung	213,9	350,02	278,87	667,27	421,27
Median	415,45	575,5	464,7	702,7	540,7
Minimum	201,0	100,90	133,60	93,6	0,00
Maximum	959,7	1272,50	1136,60	3463,10	1978,40

Tab. 6: Gemessene Konzentrationen des zirkulierenden Proteasoms im Serum der einzelnen Gruppen

Erkrankung/Kontrolle	ALS	GBS	MS	AD	Gesunde Probanden
Konzentration cProteasom Liquor [ng/ml]					
Mittelwert	20,52	9,51	6,49	17,37	14,87
Standardabweichung	15,64	6,48	5,78	5,85	4,35
Median	17,29	8,01	5,24	16,2	15,2
Minimum	0,38	0,00	0,00	8,10	0,00
Maximum	68,93	23,18	21,91	32,50	21,30

Tab. 7: Gemessene Konzentrationen des zirkulierenden Proteasoms im Liquor der einzelnen Gruppen

Die Konzentrationen im Serum zeigten im Median Bereiche von 415 ng/ml (ALS) bis 702 ng/ml (Alzheimer Demenz), die im Median im Liquor Bereiche von 5 ng/ml (MS) bis 17 ng/ml (ALS).

5.1.2 Boxplots – Graphische Darstellung der cProteasomenkonzentrationen

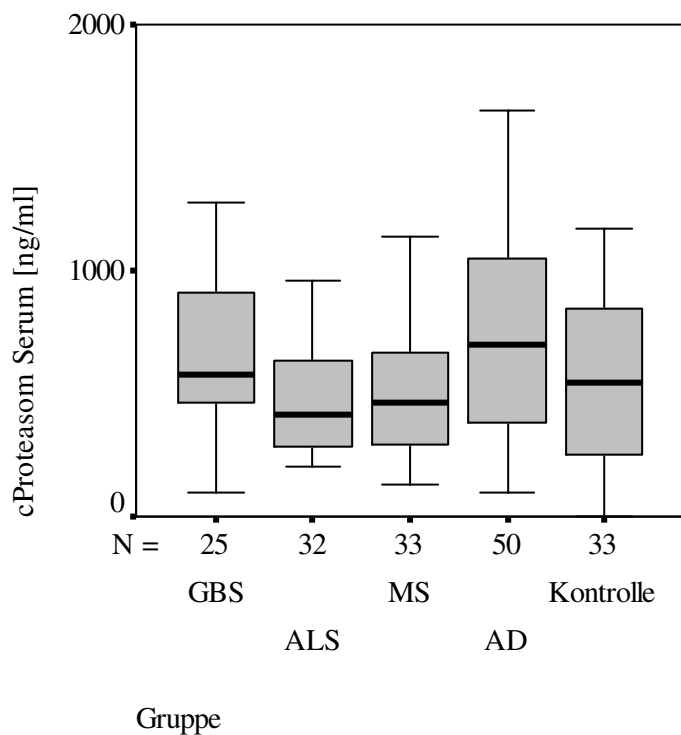


Abb. 11: Boxplot cProteasomkonzentrationen aller Gruppen im Serum

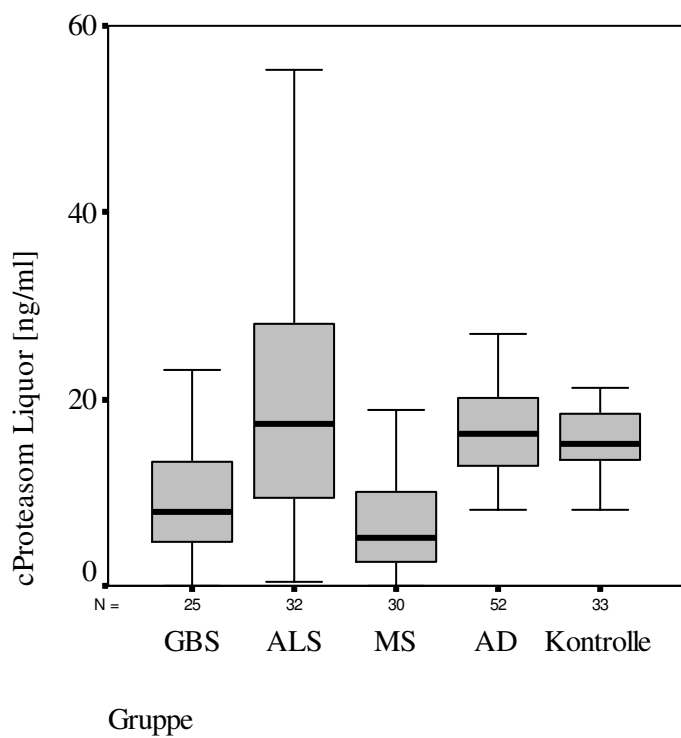


Abb. 12: Boxplot cProteasomenkonzentrationen aller Gruppen im Liquor

Zur genaueren Analyse der Konzentrationen des cProteasoms im Liquor der untersuchten MS-Patienten wurde die Form der Multiplen Sklerose bzw. der Krankheitszustand mitbetrachtet (Abb. 13). Von den 30 untersuchten MS-Fällen konnten 7 Patienten einem schubförmig remittierenden MS-Verlauf und 5 mit einem schubförmig progredienten Verlauf zugeordnet werden. Drei Patienten stellten sich mit einer Erstsymptomatik einer Neuritis nervi optici vor. Bei zwei Patienten konnte ein akuter Schub diagnostiziert werden. Desweiteren wurden die Unterschiede in der Liquorkonzentration an cProteasom unter dem Einfluß aktueller immunsuppressiver Medikation dargestellt (Abb. 13). Von 17 untersuchten Liquores befanden sich 7 mit und 10 ohne immunsuppressive Therapie. Bei einem asymptotischen Signifikanzniveau von $p = 0,3$ konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in den Konzentrationen dieser beiden Gruppen ermittelt werden.

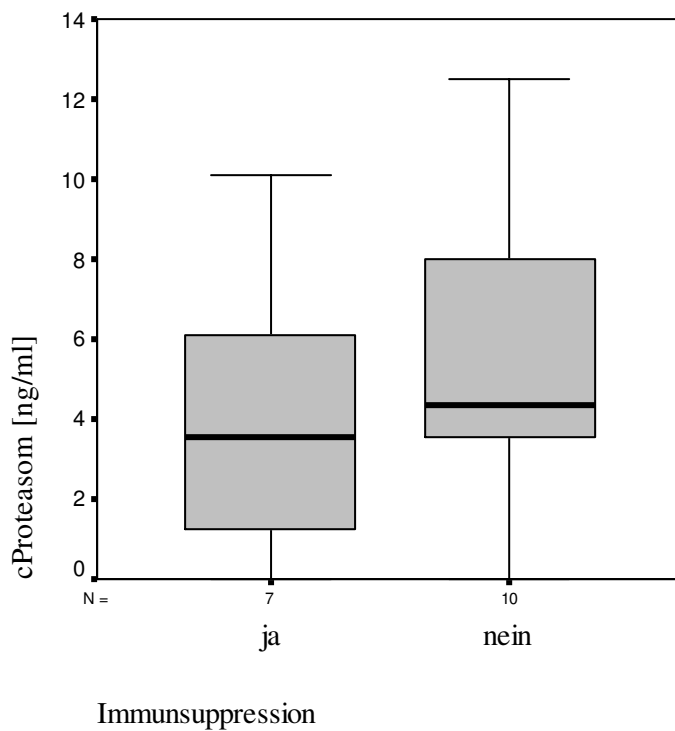


Abb. 13: Boxplot cProteasomenkonzentrationen der MS-Patienten mit und ohne aktuelle Immunsuppression (Steroidapplikation)

5.1.3 Korrelation und Streudiagramme

In der folgenden statistischen Auswertung wird der Zusammenhang zwischen den Konzentrationen des cProteasoms im Serum und im Liquor analysiert. Wichtig hierbei war herauszufinden, ob eine signifikante Korrelation zwischen beiden Werten zu beobachten war, d.h., ob eine Änderung der Konzentration innerhalb des Serums sich auf die Höhe der Konzentration im Liquor unmittelbar auswirkt. Das folgende Streudiagramm macht diese Zusammenhänge bei den 172 untersuchten Patienten bzw. Probanden deutlich.

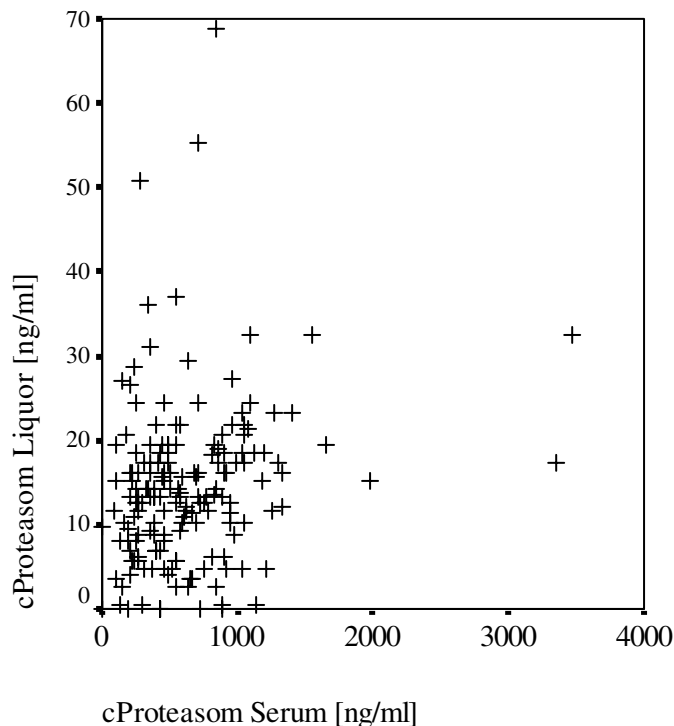


Abb. 14: Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentrationen Serum/Liquor aller untersuchten Gruppen

Korrelation cProteasom Serum/Liquor:

Wie graphisch sichtbar (Abb. 14), konnte bei den Probanden und den meisten Krankheitsgruppen kein relevanter Zusammenhang zwischen der Konzentration des cProteasoms im Serum und der des cProteasoms im Liquor gefunden werden. Dies wurde mittels Korrelationsanalyse nach Spearman auch rechnerisch bei allen untersuchten Gruppen bestätigt. Bei allen 5 untersuchten Gruppen bewegten sich die Korrelationen in einem Bereich von 0,2 bis 0,5 auf einem Signifikanzniveau von $\alpha > 0,05$.

Lediglich bei der Gruppe „Alzheimer Demenz“ (siehe auch Abb. 17) konnte ein signifikanter Zusammenhang von 0,41 ermittelt werden. Damit wurde deutlich gemacht, daß es bei den meisten Gruppen keinen Zusammenhang zwischen der Konzentration des cProteasoms im Serum mit der im Liquor zu geben scheint.

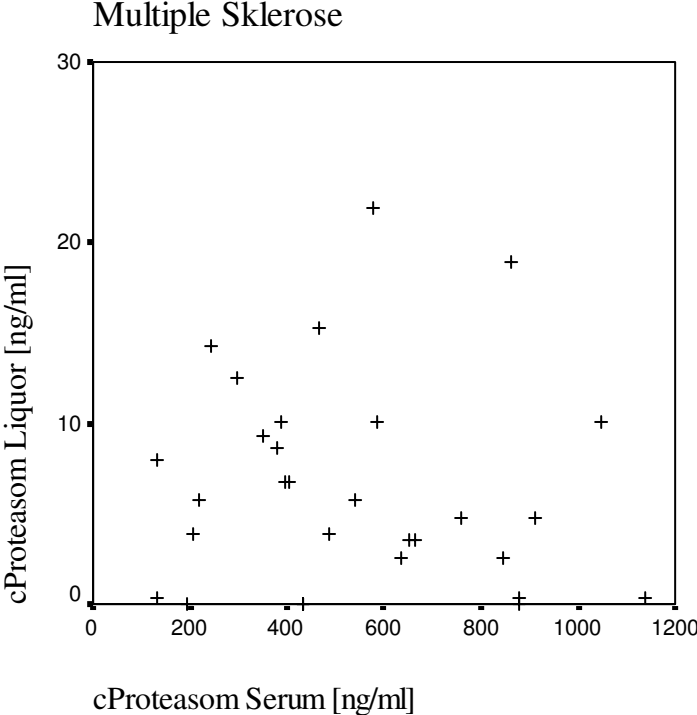


Abb. 15: Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentration Serum/Liquor bei Multipler Sklerose

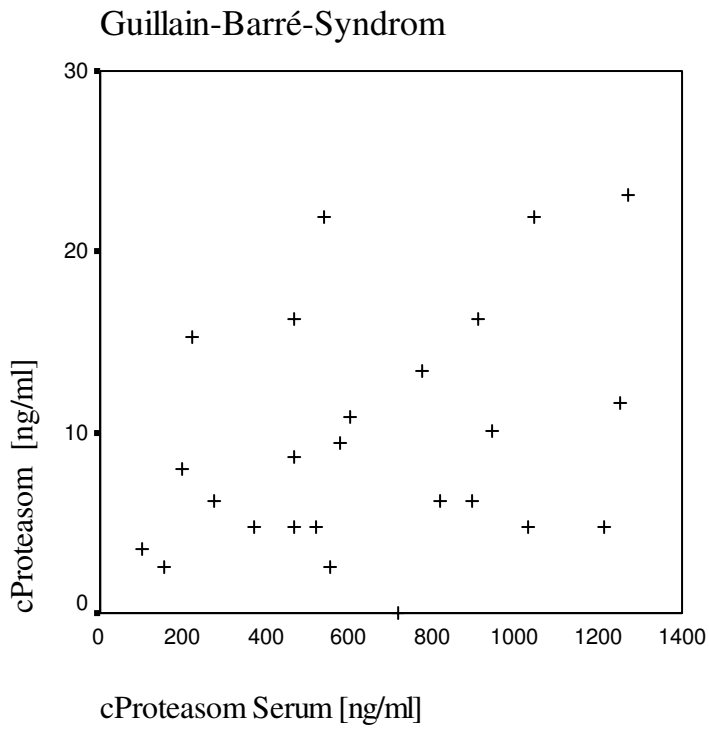


Abb. 16: Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentration Serum/Liquor bei Guillain-Barré-Syndrom

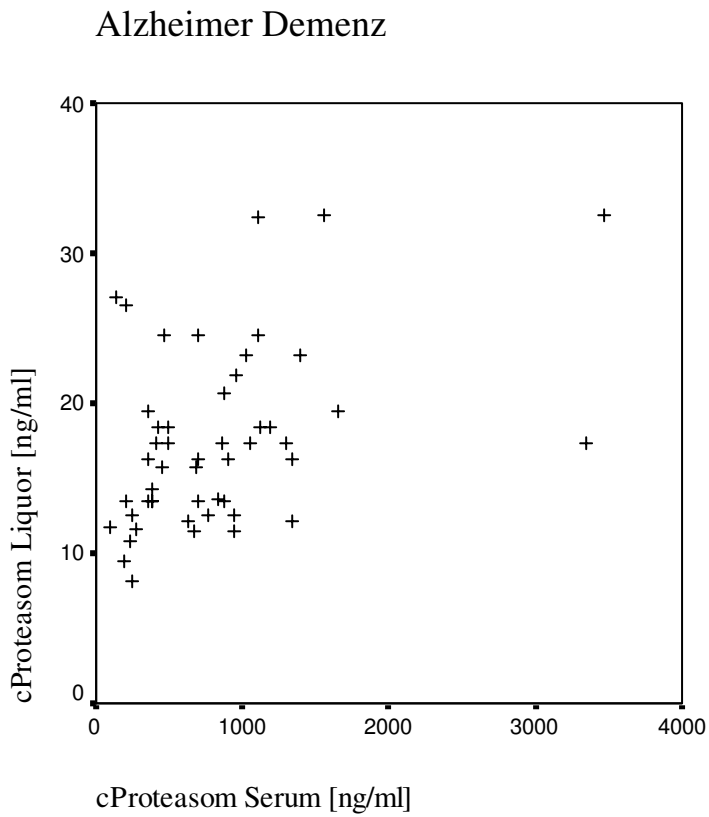


Abb. 17: Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentration Serum/Liquor bei Alzheimer Demenz

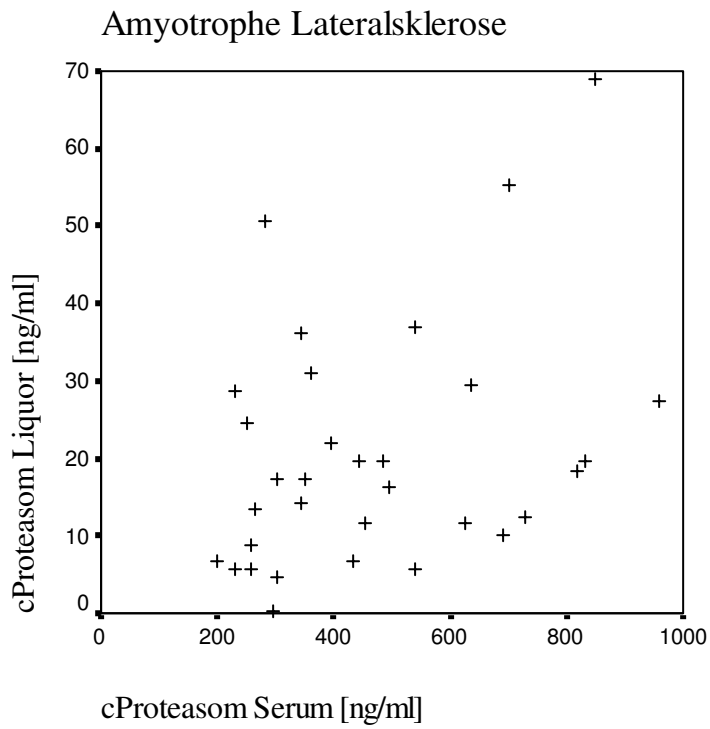


Abb. 18: Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentration Serum/Liquor bei Amyotropher Lateralsklerose

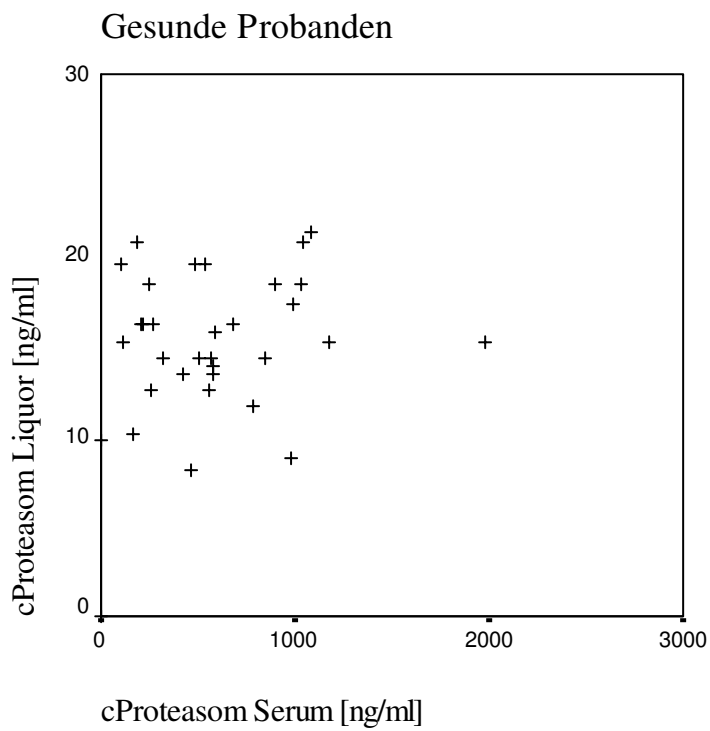


Abb. 19: Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentration Serum/Liquor der Kontrollgruppe

5.1.4 Mann-Whitney-U-Test

Im Folgenden wurden die Konzentrationen des cProteasoms jeweils einer Krankheitsgruppe mit der der Kontrollgruppe (Liquornormalbefund) mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen, um die Konzentrationen vergleichen und statistisch beurteilen zu können. Für die Gruppe Amyotrophe Laterasklerose ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede sowohl der Serum- als auch der Liquorkonzentrationen (p-Wert von 0,49 bzw. 0,37).

In der Gruppe der Patienten mit Multipler Sklerose konnte kein signifikanter Unterschied der Serumwerte im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe ermittelt werden. Es zeigte sich jedoch im Liquor eine sehr deutliche, wie im Boxplot graphisch sichtbare und auch statistisch nachweisbare, Differenz (p-Wert < 0,001). Ebenso konnte bei der Gruppe der Patienten mit GBS kein relevanter signifikanter Zusammenhang in der Serumkonzentration gesehen werden, wohl aber im Liquor (Signifikanzniveau von 0,001). Die Analyse der Proteasomenkonzentrationen bei Patienten mit Alzheimer Demenz zeigte weder in den Serumwerten (p = 0,005) noch in den Liquorwerten (p = 0,124) eine statistisch relevante Abweichung zu den Konzentrationen aus der Referenzgruppe.

5.1.5 ROC-Kurven

Nachfolgende ROC-Kurven stellen die Sensitivität der Untersuchung hinsichtlich der Trennschärfe dar. Bei den Patienten mit Multipler Sklerose konnte die höchste Sensitivität der Untersuchung ermittelt werden. Im Liquor ist bei Patienten mit Multipler Sklerose eine signifikant erniedrigte cProteasomenkonzentration von 87% gegenüber gesunden Probanden nachweisbar (Abb. 20).

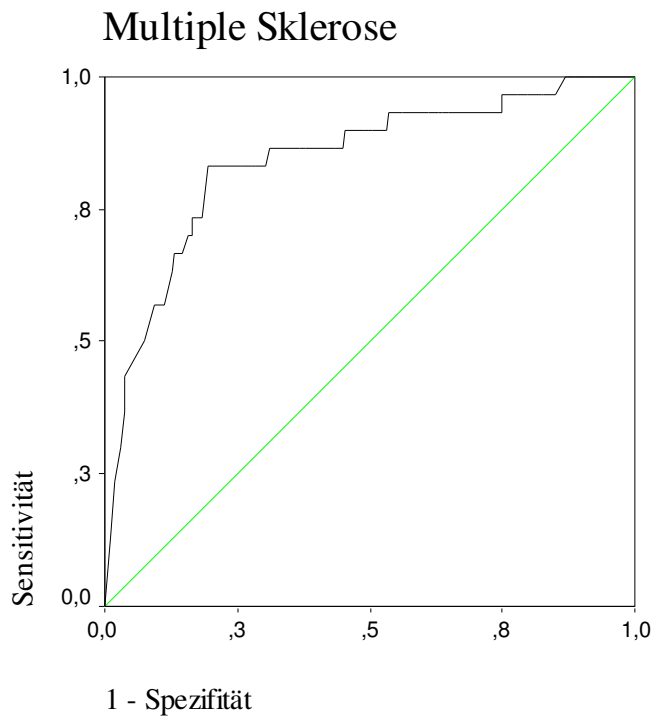


Abb. 20: ROC-Kurve bei Multiple Sklerose

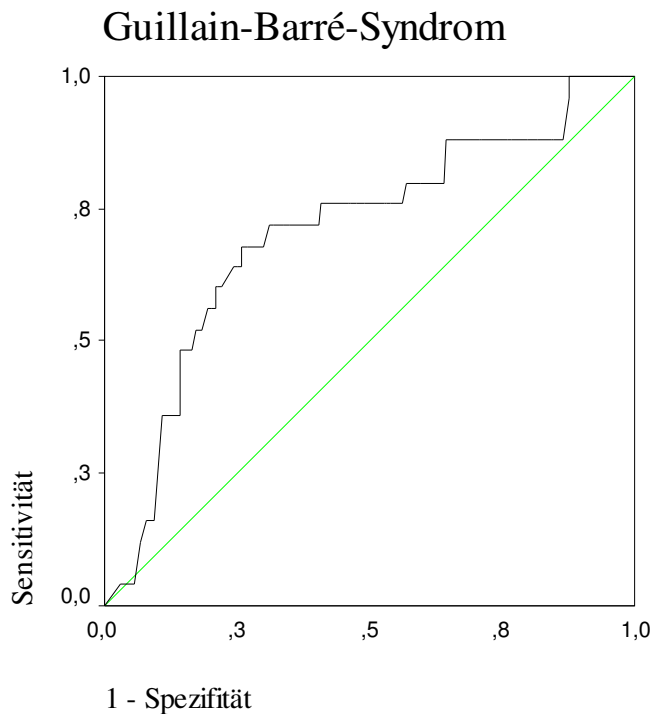


Abb. 21: ROC-Kurve bei Guillain-Barré-Syndrom

Für die Gruppe der Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom konnte eine Sensitivität der cProteasomenkonzentrationen im Liquor von 70% ermittelt werden (Abb. 21).

Bei den anderen drei untersuchten Gruppen (ALS, Alzheimer Demenz und Gesunde Kontrollgruppe) konnten keine signifikanten Sensitivitäten bzw. Spezifitäten ermittelt werden.

5.2 Ergebnisse der Analyse der Antiproteasom-Antikörper im Liquor und im Serum der untersuchten MS-Patienten

In nachfolgenden Analysen wurde die Hypothese untersucht, wonach das Proteasom selbst zum Angriffspunkt der körpereigenen Abwehr werden kann. Egerer et al.(1) beobachteten bei ihrer Untersuchung von autoimmunologisch verursachten Erkrankungen (SLE, PM/DM und pSS) Anti-Proteasom-Antikörper. Die signifikant erniedrigten Spiegel an cProteasom im Liquor der untersuchten MS-Patienten gaben Anhalt zu einer weiterführenden Untersuchung auf Anti-Proteasom-Antikörper im Serum und natürlich im Liquor. 30 Serum-Liquor-Paare wurden hinsichtlich der Konzentration an antiproteasomalen Autoantikörpern analysiert und mit einer erweiterten Kontrollgruppe von 33 + 15 weiteren Gesunden verglichen (Tab. 8).

5.2.1 Deskriptive Datenanalyse

Erkrankung/Kontrolle	Multiple Sklerose	Gesunde Probanden
Anzahl	30	48
Männlich	16	21
Weiblich	14	27

Tab. 8: Anzahl der auf Antikörper gegen das zirkulierende Proteasom untersuchten Probanden

Erkrankung/Kontrolle	Multiple Sklerose	Gesunde Probanden
Proteasom-Antikörper [U/ml] Serum		
Mittelwert	44,94	32,7
Standardabweichung	36,45	23,9
Median	34,52	26,58
Minimum	14,96	8,99
Maximum	160,5	125,48

Tab. 9: Gemessene Antikörpertiter im Serum der untersuchten MS-Patienten und der gesunden Kontrollen

Erkrankung/Kontrolle	Multiple Sklerose	Gesunde Probanden
Proteasom-Antikörper [U/ml]		
Liquor		
Mittelwert	0,19	0,07
Standardabweichung	0,16	0,06
Median	0,15	0,06
Minimum	0,01	0,01
Maximum	0,68	0,4

Tab. 10: Gemessene Antikörpertiter im Liquor der untersuchten MS-Patienten und der gesunden Kontrollen

Die Konzentrationen im Serum zeigten Bereiche von im Median 26,58 U/ml in der Kontrollgruppe und Werte bis 34,52 U/ml in der Gruppe der MS-Patienten (Tab. 9). Im Liquor rangierten die Werte innerhalb der MS-Gruppe im Bereich von 0,15 U/ml. Die Kontrollgruppe zeigte Meßwerte von 0,06 U/ml (Tab. 10). Der Vergleich der Serumkonzentrationen an Antiproteasom-Autoantikörper ergab zwischen beiden Gruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,075$). Dem gegenüber lagen die Werte der Antiproteasom-Antikörper bei den untersuchten MS-Liquores im Mittel um das 2,5fache höher als die der gesunden Kontrollen ($p < 0,001$).

5.2.2 Boxplots – Graphische Darstellung der Antikörperrniveaus

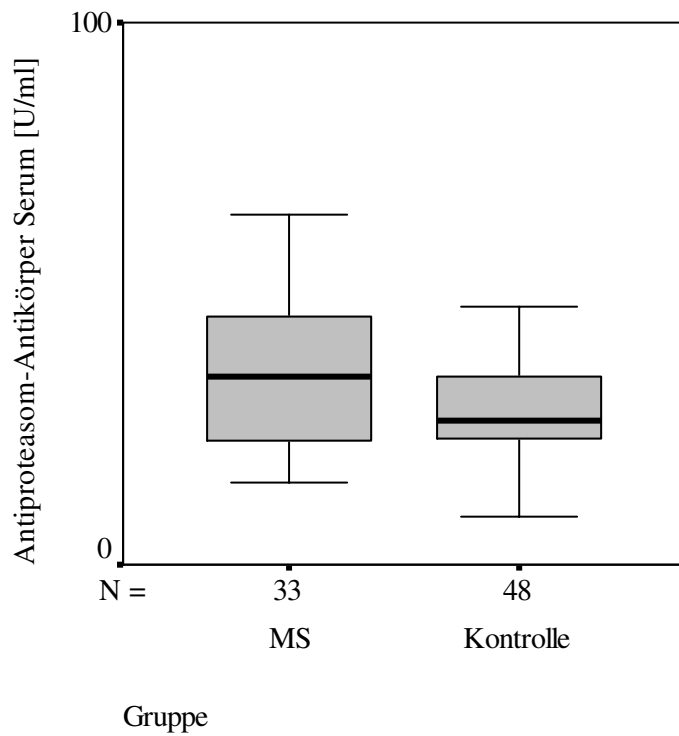


Abb. 22: Boxplot Antiproteasom-Antikörper im Serum bei MS-Patienten und der Kontrollgruppe

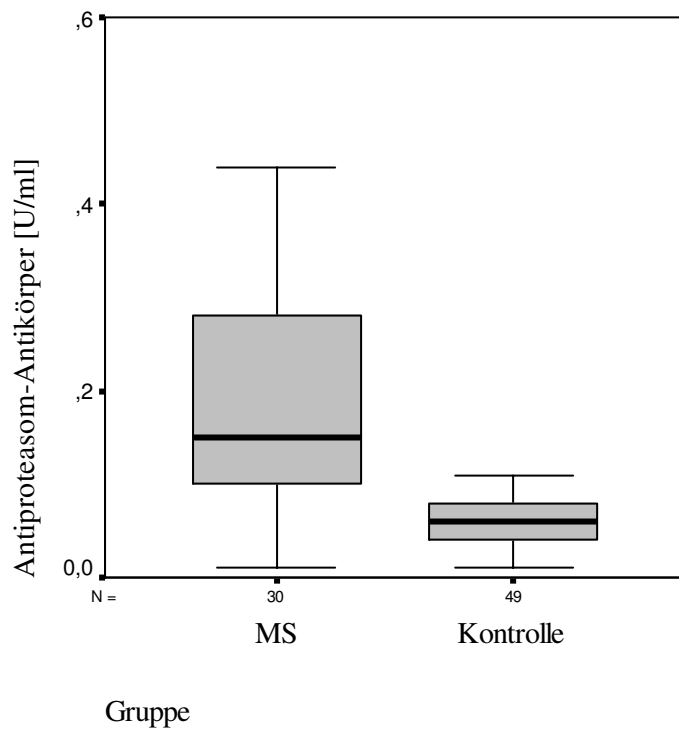


Abb. 23: Boxplot Antiproteasom-Antikörper im Liquor bei MS-Patienten und der Kontrollgruppe

5.2.3 Mann-Whitney-U-Test

Die Konzentrationen der antiproteasomalen Antikörper der MS-Patienten werden im Folgenden mit denen der Kontrollgruppe verglichen, um die Ergebnisse statistisch beurteilen zu können. Der Vergleich der Serumkonzentrationen an Antiproteasom-Autoantikörper ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,075$). Dem gegenüber zeigte sich im Vergleich der Liquorkonzentrationen ein erheblicher, statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$), wie auch in der Graphik (s. Abb. 10) sichtbar wird.

5.2.4 Korrelationsanalysen

Die Beurteilung des Zusammenhangs zwischen den Konzentrationen des cProteasoms und der antiproteasomalen Antikörper im Serum bzw. Liquor erfolgte mittels Korrelationsanalyse nach Spearman. Graphisch stellen dies die folgenden Streudiagramme dar. Dabei zeigt Abbildung 24 den Zusammenhang im Serum zwischen cProteasomenkonzentration und Titer der korrespondierenden Antiproteasom-Antikörper und Abbildung 25 den Zusammenhang im Liquor der MS-Patienten.

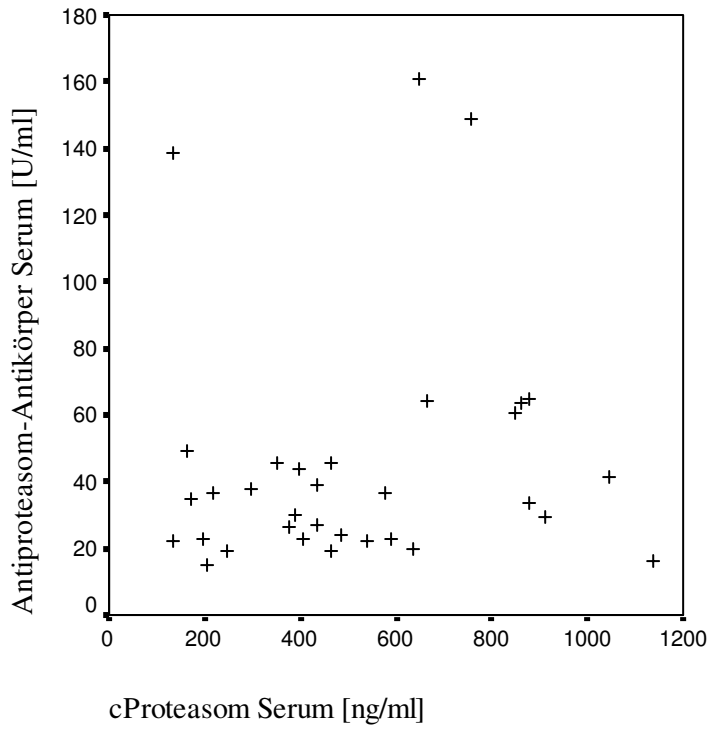


Abb. 24: Korrelationsdiagramm Konzentration cProteasom und Antiproteasom-Antikörper im Serum der untersuchten MS-Patienten

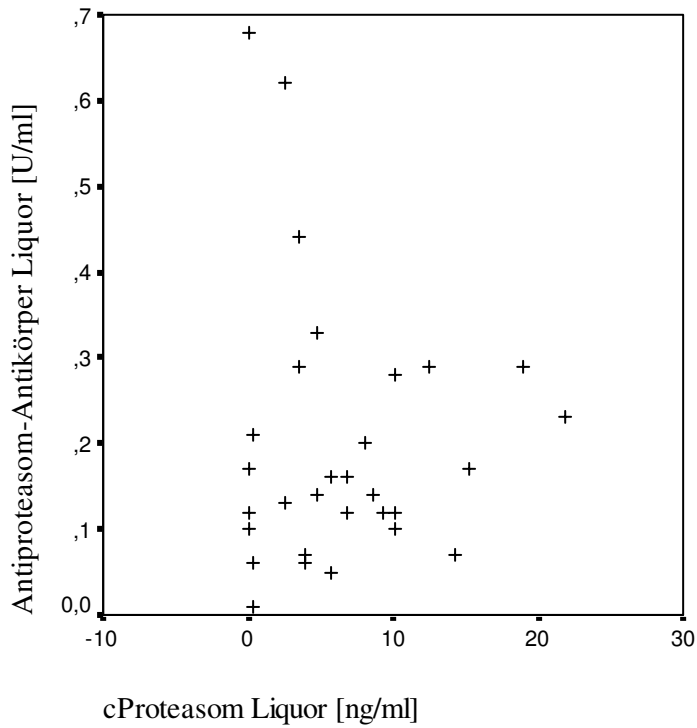


Abb. 25: Korrelationsdiagramm Konzentration cProteasom und Antiproteasom-Antikörper im Liquor der untersuchten MS-Patienten

Wie graphisch schon sichtbar, konnte auch mittels Korrelationsanalyse kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Serum-Liquor-Konzentrationen an cProteasom und ihren korrespondierenden Antikörpertitern ermittelt werden (0,07 für Liquor und 0,18 im Serum).

Die Analyse der Kontrollgruppe hinsichtlich einer Korrelation zwischen Antikörpertitern und Konzentrationen an cProteasom, sowohl im Liquor als auch Serum, ergab ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang (siehe dazu graphisch Abb. 26 und Abb. 27).

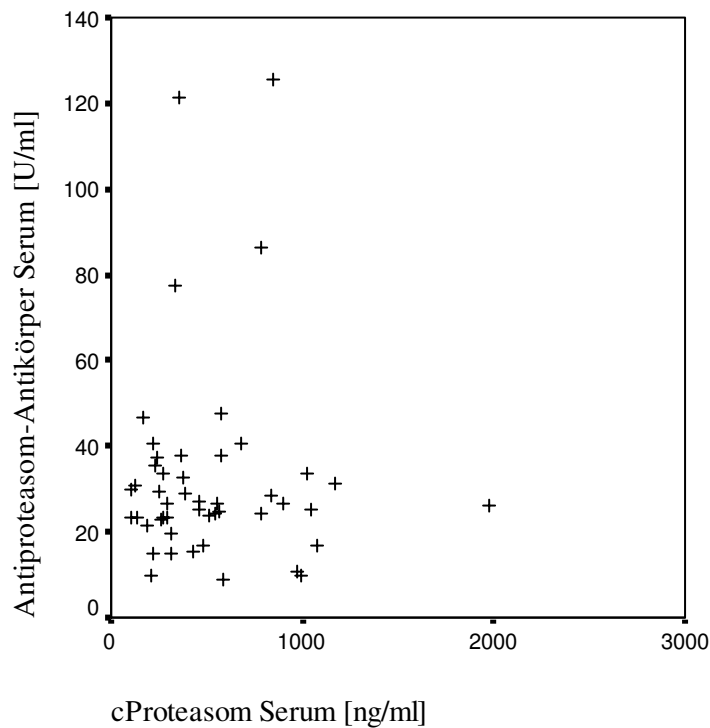


Abb. 26: Antiproteasom-Antikörper-Korrelation im Serum der Kontrollgruppe

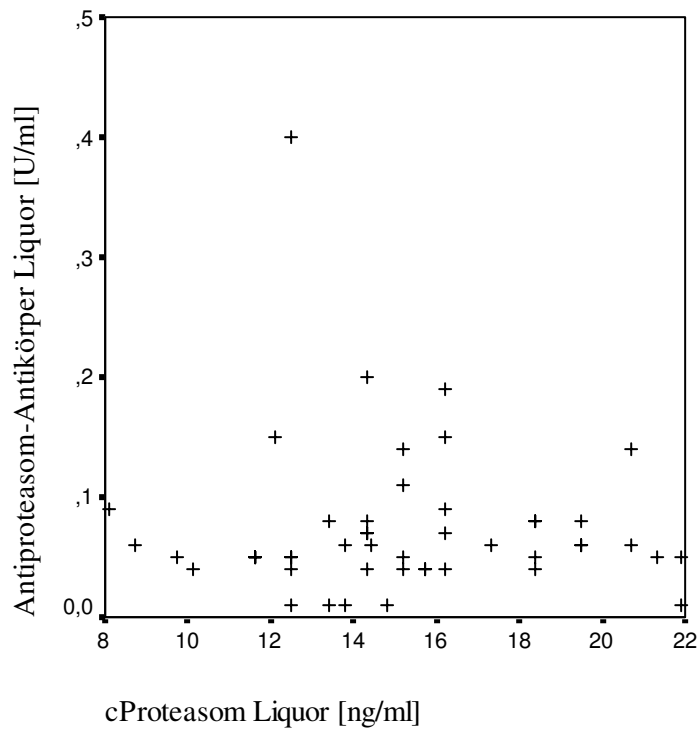


Abb. 27: Antiproteasom-Antikörper-Korrelation im Liquor der Kontrollgruppe

Abschließend wurde der Zusammenhang zwischen Antikörpertitern der korrespondierenden Medien (Liquor-Serum) für die Patienten mit MS und für die Kontrollgruppe untersucht. Die Analyse der Korrelation des Antikörperrniveaus zwischen Serum und Liquor erbrachte bei den untersuchten MS-Fällen rechnerisch kein signifikantes Ergebnis (Korrelationskoeffizient von 0,57 auf einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$), jedoch innerhalb der Kontrollgruppe (Korrelationskoeffizient von 0,288 auf einem Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$). Dieses wird auch in nachfolgenden Streudiagrammen ersichtlich (Abb. 28 und Abb. 29).

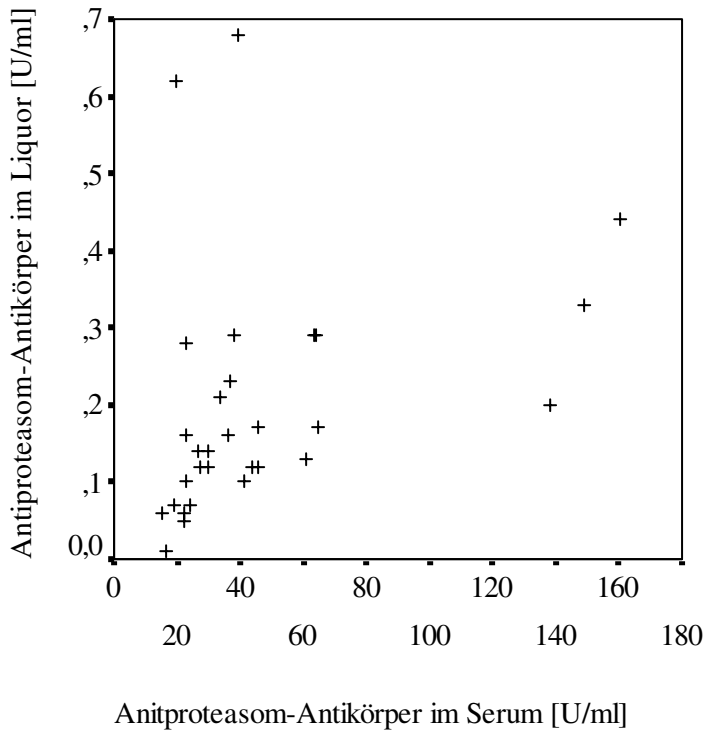


Abb. 28: Korrelation Antiproteasom-Antikörper Serum-Liquor der MS-Patienten

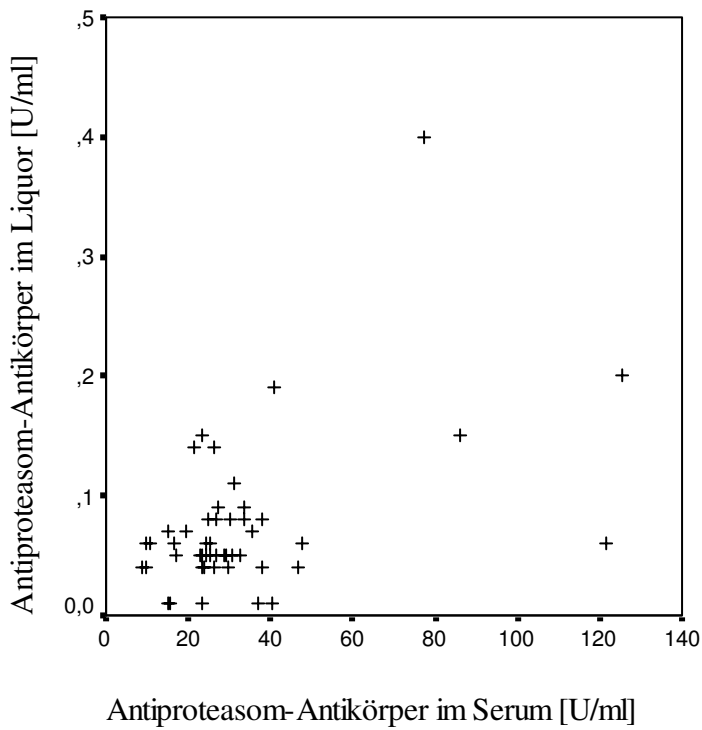


Abb. 29: Korrelation Antiproteasom-Antikörper Serum-Liquor der Kontrollgruppe

6 Diskussion

In vorliegender Arbeit wurde untersucht, inwieweit dem Proteasom bzw. den Anti-Proteasom-Antikörpern eine Rolle in der immunologisch vermuteten Entstehung der Multiplen Sklerose und in der Pathogenese weiterer entzündlicher (Guillain-Barré-Syndrom) bzw. neurodegenerativer Erkrankungen (Amyotrophe Lateralsklerose, Alzheimersche Demenz) zukommen können. Im Folgenden werden die ermittelten Ergebnisse jeder Krankheitsgruppe in Bezug auf eine Kontrollgruppe gesunder Probanden interpretiert und im Kontext der aktuell beschriebenen krankheitsspezifischen Pathomechanismen diskutiert.

6.1 Diskussion der MS-Ergebnisse

Die Multiple Sklerose ist eine Erkrankung des Zentralnervensystems, wobei bei der Erforschung der Pathogenese nach allgemeiner Auffassung verschiedene autoimmunologische Mechanismen ermittelt werden konnten (100). Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen auch, spielen die Aktivierung von Lymphozyten und veränderte bzw. defekte Regulationsmechanismen der Immunantwort eine maßgebliche Rolle. Die Antigen- als auch Organspezifität werden durch die Antigen-Präsentation und -Erkennung, durch den immunologischen Status und die Antwort des Zielorgans vermittelt (101).

Bei der Multiplen Sklerose geht man davon aus, daß die im peripheren Immunsystem aktivierten T-Lymphozyten nach Migration ins ZNS als Entzündungsauslöser dienen können, wenn sie dort auf ihr spezifisches Antigen treffen.

Als potentielle Autoantigene wurden verschiedene Bestandteile der Myelinscheiden identifiziert, wobei sich in den meisten Arbeitsgruppen das Hauptaugenmerk auf das MBP (Basische Myelinprotein) und das PLP (Proteolipidprotein) legte. Aber auch seltener vorkommende Myelinproteine wie das Myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) oder das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) können bei MS-Patienten zu einer dominanten T-Zell-Antwort führen (37). Die humorale Seite des entzündlichen Geschehens ist gekennzeichnet durch die Sekretion von Immunglobulinen als Folge der klonalen Expansion der Immunglobulin sezernierenden B-Zellen, deren Antigenpezifität noch nicht ausreichend geklärt ist. Forschungen zeigen, daß sich die Antikörper gegen besagte Myelinproteine wie MOG (102) als auch gegen Ganglioside (103) richten. Aktivierte T-Lymphozyten können also bei Kontakt mit den geeigneten Antigenen und entsprechender HLA-Exprimierung eine Entzündungsreaktion auslösen und durch eine zytokinabhängige Rekrutierung weiterer Entzündungszellen diese Inflammation aufrechterhalten.

Dieses Szenario wird vor allem im aggressiven Schub beobachtet und vom Organismus durch Apoptose der aggressiven T-Lymphozyten schließlich zum Stillstand gebracht.

Warum es bei MS-Patienten zu einer pathologischen Aktivierung bzw. zur Persistenz autoreaktiver T-Lymphozyten kommt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt der Forschungen noch nicht vollends verstanden.

Das Proteasom als immunologisch aktiver Partikel mit nukleärer als auch zytosolischer Lokalisation spielt eine große Rolle in der Initiierung und Modulation der Immunantwort. Durch seine katalytische Funktion werden Peptidfragmente kreiert, die via MHC-I-Pathway immunkompetenten Zellen Informationen über den Unterschied zwischen „selbst“ und „nicht selbst“ liefern (104).

Im Rahmen eines immunologischen Geschehens werden proinflammatorische Zytokine wie gamma-IFN und TNF-alpha durch immunkompetente Zellen wie T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen freigesetzt, die zur Bildung des „Immunproteasoms“ führen, das durch Ersatz der homologen konstitutiven Beta-Untereinheiten durch LMP2, LMP7 und MECL-1 zu einem Boost in der katalytischen Aktivität und damit zu einer gesteigerten Antigenprozessierung führt (105).

In einer Arbeit von Egerer et al. 2002 (1) wurden unter anderem die Serum von Patienten mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Lupus Erythematoses, primärem Sjögren Syndrom, Polymyositis/Dermatomyositis und Rheumatoider Arthritis hinsichtlich der Konzentrationen an zirkulierenden Proteasom (cProteasom) untersucht. Hierbei konnten auch die ersetzten, immunologisch aktivierten Untereinheiten LMP7 in den Samples detektiert werden, was den Hinweis auf ein autoimmunologisches Geschehen stützt. Da sich die meisten Forschungen vorwiegend mit der Untersuchung immunologischer Marker im Serum beschäftigten, wollten wir nicht nur im Serum, sondern vor allem am Ort des entzündlichen Geschehens – im Liquor – Folgendes evaluieren:

1. Ist das cProteasom im Liquor überhaupt nachweisbar und wenn ja, in welchen Bereichen rangiert es?
2. Gibt es signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe?
3. Liegen im Liquor auch Antiproteasom-Antikörper vor, und wenn, in welchen Bereichen rangieren sie?
4. Bestehen signifikante Korrelationen im Antikörperniveau bei der Multiplen Sklerose zwischen Serum und Liquor?
5. Wie stützen die ermittelten Werte die These einer immunologisch vermittelten Pathogenese, und wie fügen sich diese Ergebnisse ein in den Rahmen der bisher erfolgten Forschungsergebnisse zur Pathogenese der Multiplen Sklerose?

Wir untersuchten die Serum-Liquor-Paare von 30 Patienten mit klinisch und serologisch gesicherter MS auf ihre Konzentrationen an freiem, zirkulierendem Proteasom (cProteasom) und verglichen dies mit der Analyse von 33 Serum-Liquor-Paaren einer gesunden Kontrollgruppe. In unseren Untersuchungen rangierten die Konzentrationen an cProteasom für die gesunden Kontrollen in einem Bereich von 571,01 ng/ml im Serum, während Egerer et al. 2002 in ihrer Arbeit (1) Werte von 221,41 ng/ml im Mittel für die gesunde Kontrollgruppe ermittelten. Diese Abweichung sehen wir in der Anzahl der untersuchten Fälle begründet: während Egerer et al. 85 gesunde Serumkontrollen zur Analyse brachten, liegt in vorliegender Untersuchung eine Fallzahl von 33 MS-Serumproben vor. Diese untersuchten Werte im Serum lagen bei den MS-Patienten im Mittel bei 513 ng/ml, womit sich kein signifikanter Unterschied zu unseren Kontrollanalysen ergab. Bei Bestimmung der cProteasom-Konzentrationen im Liquor rangierten die Level an cProteasom der Gesunden im Mittel bei 14,87 ng/ml. Die Analyse der Liquorkonzentrationen der MS-Gruppe zeigte Werte von 6,49 ng/ml. Diese Differenz konnte auch rechnerisch als signifikant ($p < 0,001$) beschrieben werden.

Weitere Hypothesen ziehen die Möglichkeit in Betracht, daß das Proteasom selbst zum Angriffspunkt der körpereigenen Immunabwehr wird. Diese Vermutung konnte bestätigt werden in o.g. Arbeit von Egerer et al. (1), wo in Seren von Patienten mit Systemisch Lupus Erythematodes (SLE) neben Antikörpern gegen freizirkulierende DNA auch Antiproteasom-Antikörper bei 57% der Patienten mit SLE, bei 60% der Patienten mit Polymyositis/Dermatomyositis und bei 39% der Patienten mit primärem Sjögren Syndrom gefunden wurden.

Um herauszufinden, ob auch bei der Multiplen Sklerose dieser Mechanismus zur Pathogenese beitragen kann, haben wir o.g. 30 Serum-Liquor-Paare hinsichtlich der Konzentration an antiproteasomalen Autoantikörpern analysiert und mit einer erweiterten Kontrollgruppe von 33 + 15 Gesunden verglichen. Der Vergleich der Serumkonzentrationen an Antiproteasom-Autoantikörpern ergab zwischen beiden Gruppen keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,075$). Dem gegenüber lagen die Werte der Antiproteasom-Antikörper bei den untersuchten MS-Liquores im Mittel um das 2,5fache höher als die der gesunden Kontrollen ($p < 0,001$), was die These einer möglichen Autoreaktivität gegenüber dem Proteasom bei der Multiplen Sklerose stützt.

Die erste Beschreibung einer humoralen Antiproteasom-Antwort erfolgte durch Arribas et al. 1991 bei Patienten mit Systemischen Lupus Erythematoses, dem Prototyp der systemischen Autoimmunerkrankung, wobei in 35% der Fälle eine Seropositivität detektiert werden konnte (106). In einer weiteren Arbeit von Mayo et al. 2002 (2) wurde die Untersuchung hinsichtlich antiproteasomaler Antikörper auf andere Autoimmunerkrankungen, u.a. primäres Sjögren Syndrom, Vaskulitis, Sarkoidose und Morbus Behcet und die Multiple Sklerose ausgedehnt. Dabei konnte beobachtet werden, daß alle o.g. systemischen Autoimmunerkrankungen eine Seropositivität gegenüber dem Proteasom bzw. proteasomalen Untereinheiten aufwiesen, aber die Prävalenz von Antiproteasom-Antikörpern bei MS-Patienten signifikant höher lag: bei 110 untersuchten MS-Patienten konnte hier eine Seropositivität von 66% beobachtet werden, im Liquor wurden 80% positiv getestet auf Antiproteasom-Antikörper (2).

In unserer Untersuchung konnte sowohl im Liquor als auch im Serum eine Prävalenz von 100% von Anti-Proteasom-Antikörpern gefunden werden (30 von 30). Ebenso konnten bei unseren gesunden Kontrollen Antiproteasom-Antikörper ermittelt werden, in signifikant erniedrigten Bereichen gegenüber den untersuchten MS-Proben, jedoch auch mit einer Prävalenz von 98% im Serum (48 von 49) und 100% im Liquor (49 von 49), was die Vermutung nahelegt, daß eine natürliche Autoreaktivität gegenüber Proteasom auch im nicht entzündlich veränderten Gewebe vorzukommen scheint. Weiterhin beschrieben Mayo et al. (2) in dieser Arbeit, daß keine Korrelation zwischen der neurologischen Involviertheit und der Seropositivität besteht, was wir auch in unseren Analysen bestätigen konnten. Von den 30 untersuchten MS-Fällen konnten 7 Patienten einem schubförmig remittierenden MS-Verlauf und 5 einem schubförmig progredienten Verlauf zugeordnet werden. 3 Patienten stellten sich mit einer Erstsymptomatik einer Neuritis nervi optici vor. Bei 2 Patienten konnte ein akuter Schub diagnostiziert werden. Innerhalb der untersuchten Gruppen fanden sich weder im Serum noch im Liquor statistisch signifikante Unterschiede in der Höhe der antiproteasomalen Antikörper. Auch konnte kein statistisch relevanter Zusammenhang bezüglich der immunsuppressiven Medikation (Steroiapplikation) und Höhe der Autoantikörper beobachtet werden. Natürlich muß man diese Ergebnisse kritisch bewerten, da aufgrund der geringen Fallzahlen nur eine eingeschränkte Validität der Meßwerte zu ermitteln war, was die Notwendigkeit nahelegt, diese Zusammenhänge zwischen Antiköperniveau und neurologischem Status der MS in weiteren Studien mit entsprechender Fallzahl zu verfolgen. Ein weiterer Faktor, der in die Überlegungen zur Pathogenese der Multiplen Sklerose mit einbezogen werden muß, sind die Hinweise auf eine virale Beteiligung. So konnten verschiedene Viren bei MS-Patienten isoliert bzw. höhere Ak-Titer detektiert werden (Epstein-Barr-Virus, Humanes Herpesvirus 6A, Humanes T-Zell Lymphotropes Virus I). Allerdings konnte bisher eine direkte Auslösung einer MS durch eine

Virusinfektion nicht belegt werden. Vielmehr scheint eine virale Infektion bei vorhandener genetischer Disposition und beim Zusammenwirken anderer Umweltfaktoren die Erkrankungssuszeptibilität zu steigern und ein Schub durch eine akute Infektion getriggert werden zu können (44). Die Wirksamkeit von antiviralen Wirkstoffen, wie Interferon-beta, in der Therapie der MS wurde als Hinweis auf eine virale Beteiligung an der Immunpathogenese diskutiert. Gerade das körpereigene Interferon-System trägt in der Frühphase einer viralen Infektion, noch vor beginnender humoraler Aktivierung, zur Elimination der Viruspartikel bei, vornehmlich realisiert durch endogenes Interferon-alpha und -beta (107).

Übersichtsarbeiten von Arnason und Reder 1994 (108) sowie Neighbour et al. 1981 (109) fanden eine allgemein verminderte IFN-Antwort bei MS-Patienten, wohingegen auch dies widerlegende Arbeiten von Tovell et al. 1983 (110) existieren.

Wandinger et al. 2001 (137) konnten in ihren Untersuchungen zur funktionellen Beeinträchtigung des endogenen Interferonsystems bei MS-Patienten deutlich machen, daß die Fähigkeit zur IFN-beta-Synthese als Antwort auf virale Stimuli in Blutleukozyten von Patienten mit Multipler Sklerose eingeschränkt ist, im Sinne einer primären Beeinträchtigung der Typ-I-assoziierten IFN-Genexpression.

Die bei einem entzündlichen Geschehen freigesetzten Interferone bedingen eine ubiquitäre Aktivierung des körpereigenen Immunsystems, so auch des Proteasoms. Bei Anwesenheit von proinflammatorischen Stimuli wie Interferon-gamma bzw. TNF-alpha im Rahmen eines viralen Infektes reagiert das Immunsystem mit Bildung des Immunproteasom auf den nun erhöhten Bedarf der Antigen-Prozessierung von Antigenen zur Präsentation via MHC. Somit können mittels zytokinabhängiger Induktion des Proteinaktivators PA 28 und durch den Ersatz der homologen Beta-Untereinheiten durch LMP7, LMP2 und MECL-1 die katalytischen Eigenschaften des 20S-Proteasoms verdoppelt und damit die Generierung von dominanten T-Zell-Epitopen optimiert werden (105). Vorausgesetzt man geht von einer primär labilen IFN-Antwort bei Patienten mit Multipler Sklerose aus, so wäre es durchaus denkbar, daß die daraus resultierende verminderte Immunstimulation auch zu einer verminderten Präsenz des Immunproteasoms führt. Dieses bedeutet weniger antivirales Potential des Körpers und eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer viralen Infektion, welche eine MS zu begünstigen scheint.

In unserer Hypothese führt demnach ein IFN-Mangel auch auf Ebene des Proteasoms zu einer Abwehrschwäche und kann somit eine MS begünstigen. In Kongruenz damit sehen wir daher auch die meßbar erniedrigten Proteasomtiter.

Aber: wir messen ausschließlich cProteasom und haben hierbei keine Differenzierung zwischen Immunproteasom und konstitutivem Proteasom vorgenommen. Das wirft die Frage nach Untersuchungen der Zusammensetzung des cProteasoms auf. Bisher fanden nur Mayo et al. 2002 (2) bei MS-Patienten in Epitopmappingstudien die Präsenz von spezifischen Autoantikörpern gegen die Untereinheiten C2/C5/C8 und C9 des konstitutiven Proteasoms. Zu Untersuchungen hinsichtlich der Präsenz von Untereinheiten des Immunproteasoms liegen Arbeiten von Egerer et al. 2002 (1) vor, der die Immunproteasomuntereinheit LMP7 bei Patienten mit Systemischen Lupus Erythematoses, dem Prototyp der Autoimmunerkrankung, und primären Sjögren Syndrom identifizierte. Feist et al. 1999 (112) fanden die alpha-Untereinheit HC9 des konstitutiven Proteasoms als Hauptantigen bei SLE und Autoimmunmyositis. Sie detektierten zudem noch weitere alpha-Untereinheiten wie HC8 und HC2 als auch Beta-Untereinheiten des Immunproteasoms (MECL-1, LMP7). Die Seren von MS-Patienten dienten in dieser Untersuchung als Kontrollgruppe – es waren keine Antikörper gegen besagte Untereinheiten meßbar (112).

In bisherigen Studien ist man davon ausgegangen, daß das Immunproteasom notwendig ist für eine hinreichende Viruselimination. Bei Infektion einer körpereigenen Zelle mit einem Virus wird der gesamte Immunapparat stimuliert und über die damit einhergehende Zytokinfreisetzung (IFN-gamma, TNF-alpha) auch vermehrt das Immunproteasom exprimiert. Nussbaum et al. 2005 vermuteten durch ihre Untersuchungen hinsichtlich der Viruselimination bei LMP7/LMP2-Knockout-Mäusen, daß das primäre Ziel des Immunproteasoms ist, nicht nur mikrobielle Epitope zu generieren, sondern zusätzliche Epitope, die aus dem viel längeren Wirtsproteom stammen (113). Somit würde das Immunproteasom dazu beitragen, eine körpereigene Zelle als „infiziert“, „tumorös“ oder aber anderweitig „fehlerhaft“ zu markieren und sie damit als „attakierbar“ dem körpereigenen Immunsystem zu präsentieren. Dieses kann zu einer vermehrten Anwesenheit selbst-spezifischer CD8+ T-Zellen führen, die wiederum helfen könnten in der Bekämpfung einer akuten Infektion durch Erkennen der neuen, IFN-gamma-abhängigen Selbst-Epitope.

Nach durchlaufener Infektion könnten, so Nussbaum et al., einige dieser Zellen in die Gedächtnisphase treten und damit Schutz vor einer Vielzahl anderer Virusinfektionen bieten.

In o.g. Arbeit wird folgende Theorie postuliert: Das Immunproteasom fördert die Generierung von CD8+ Memory Zellen, welche nicht virus-, sondern inflammationsspezifisch sind. Das bedeutet, daß die Übertragung des Schutzes gegenüber anderen viralen Infekten nicht, wie bisher angenommen, auf dem Erkennen von Epitopgemeinsamkeiten beruht, sondern auf dem Erkennen des inflammatorischen Stimulus, der durch immer wiederkehrende kongruente Zytokinmuster zu einer Aktivierung der CD8+ Memory Zellen führt. Das Immunsystem reagiert also nicht auf den viralen Aggressor selbst, sondern im Folgenden auf das „Echo“, das die vorausgegangene

Infektion im Zytokinmuster hinterlassen hat. Diese Ergebnisse und Schlußfolgerungen fügen sich in die Tatsache, daß bei Exposition von MS-Patienten mit IFN-gamma, ohne Anwesenheit eines viralen Stimulus, die Erkrankung exazerbiert (114). Diese Beobachtungen und Theorien finden mit den in unseren Analysen gemachten signifikant erniedrigten Proteasomtitern eine Bestätigung, obschon hinsichtlich des komplexen Zytokinsystems vorerst offen bleibt, inwiefern sich Zytokinstatus und Proteasomausstattung gegenseitig bedingen und beeinflussen. Eine allgemein verminderte IFN-Antwort bei MS-Patienten sowie eine signifikante Abschwächung in der proteasomalen Ausstattung legen die Vermutung nahe, daß ein Zusammenhang besteht.

Die Bedeutung des Proteasoms bei der Apoptose:

Apoptose als Mechanismus des Organismus, Gewebe oder Zellen zu eliminieren, die einen gestörten oder krankhaften Entwicklungsverlauf annehmen, konnte durch verschiedene Experimente in der Vergangenheit belegt werden. So konnte bei der EAE, einer im Tierexperiment ausgelösten, der MS sehr ähnlichen Erkrankung, nachgewiesen werden, daß die Inflammation im ZNS durch den programmierten Zelltod autoreaktiver T-Lymphozyten terminiert wird (115), wie auch Untersuchungen an Patienten mit akuter disseminierter Enzephalomyelitis (ADEM) bestätigen: hier konnte man ein Drittel der im ZNS etablierten T-Lymphozyten als apoptotisch identifizieren (24). Der Apoptose scheint also in der Pathogenese der MS eine sehr bedeutende, wenngleich auch sehr differenzierte Rolle zuzukommen. Schon Pender et al. 1998 (25) äußerten den Verdacht, daß verschiedene Mechanismen einer gestörten Apoptose maßgeblich zur Entstehung einer Multiplen Sklerose beitragen können. Nach Lucchinetti (26) wurde eine Klassifizierung der MS nach histopathologischen Kriterien vorgenommen: so beobachtet man bei Typ I und Typ II eine antikörpervermittelte, T-Zell-medierte Entmarkung, während bei Typ III und Typ IV eine Apoptose der Oligodendrozyten und der Verlust von Myelin-assoziiertem Glykoprotein im Vordergrund steht, dieses also weniger die autoimmune Genese der Erkrankung beschreibt, sondern vielmehr an eine virus- oder toxininduzierte Dystrophie denken läßt. Eine Ursache für die vermehrte Apoptose der Subtypen III und IV geht nach neueren Untersuchungen auf eine Überexpression des p53 Gens zurück (116), welches durch einen Defekt in seiner Transkription und Regulation zu einer vermehrten Produktion von proapoptischen Proteinen der bcl-Genfamilie führt. Untersuchungen mit selektiven Proteasominhibitoren haben gezeigt, daß nach Blockade des Ubiquitin-Proteasom-Komplexes apoptoseverstärkende Proteine und Transkriptionsfaktoren wie p53 akkumulierten (98). Bei den Typen I und II geht man von einer Störung der Apoptose der T-Lymphozyten aus, was heißt, daß hier eine fehlerhafte Regulation der Apoptose zu einer Persistenz autoreaktiver T-Lymphozyten führt (28).

Einerseits führt eine verminderte oder fehlende Apoptose zur Persistenz autoreaktiver myelinspezifischer T-Zellen. Andererseits kann die MS durch ein Übermaß an Apoptose Glia- und Nervenzellgewebe zerstört werden und die Erkrankung exazerbieren (117).

Daß das Ubiquitin-Proteasom-System Einfluß auf die Regulation intrazellulärer Prozesse wie Proteindegredation und Apoptose ausübt, ist seit geraumer Zeit bekannt. Die Frage, was genau passiert und welche Bedeutung es für das Überleben und die Integrität von Zellen hat, konnte bisher erst in Ansätzen geklärt werden. In einigen Modellen konnte untersucht werden, inwieweit das Ubiquitin-Proteasom-System einen Einfluß auf das Ausmaß und die Regulation des programmierten Zelltodes nimmt. Durch die Beobachtung der Ecdyson-abhängigen Muskelatrophie während der Mauserung des Tabakschwärmers *Manduca sexta* durch Dawson and Arnold et al. 1995 (118) konnte viel zum Verständnis der Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems am programmierten Zelltod beigetragen werden. So war hier zu beobachten, daß es zu einem massiven Anstieg im freien Pool als auch in der mRNA-Expression für Ubiquitin kam, kurz vor dem Beginn der intersegmentalen Muskelfaseratrophie. Ebenso war eine Zunahme der proteolytischen Aktivität des Proteasoms um das 5-8fache zu messen, was durch Umprogrammierung des 26S-Proteasoms (Ersatz der Beta-Untereinheiten) zum Immunproteasom erklärt werden konnte. Die Identifizierung von verschiedenen Substanzen, die selektiv die Proteasomfunktion inhibieren können, wie z.B. der natürliche Streptomyces-Metabolit Lactacystin als auch die synthetisch hergestellten Peptidaldehyde MG-132 und PSI, haben sehr zum Verständnis des Ubiquitin-Proteasom-Systems beigetragen (119). Durch Interaktion mit der Beta-Untereinheit können die chymotrypsin-like Aktivität des Proteasoms und damit die Gesamtproteolyse geblockt werden (11). Bei Untersuchungen an proliferierenden Zelllinien konnte durch eine selektive Blockade des 26S-Proteasoms mittels Lactacystin Apoptose induziert werden (96), was die Vermutung stützt, daß die Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems wesentlich für die Integrität und das Überleben von proliferierenden Zellen verantwortlich zu sein scheint. Durch fehlende Degradation der für die Zellzyklusprogression verantwortlichen Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p27kip1 verharren die Zellen in der Go/G1-Phase und aktivierten schließlich ihr Zelltod-Programm (97). Ebenso konnten weitere die Apoptose verstärkende Proteine und Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die nach Blockade des Ubiquitin-Proteasom-Komplex akkumulierten wie c-myc, p53, p21, E2F, c-jun als auch I κ B, wodurch Nf κ B nicht in den Nucleus translozieren konnte, um dort antiapoptotische als auch proinflammatorische Gene zu induzieren (98).

Im Kontrast dazu zeigten Sadoul und Fernandez et al. 1996 (99), daß in terminal differenzierten Zellen, wie sympathischen Neuronen und Makrophagen, Apoptose durch selektive Proteasomblockade verhindert werden konnte. Man vermutet die Involvierung des Proteasomkomplexes in der Aktivierung von Pro-Kaspase-3 als auch in einer Aktivierung von IL-1 converting enzyme, was bei nichtproliferierenden Zellen zwangsläufig zur Apoptose führen würde und durch Proteasominhibitoren geblockt werden konnte. Wahrscheinlich spielt in diesem Fall eine Stabilisierung von antiapoptotischen Signalgebern wie bcl-2 auch eine nicht unwesentliche Rolle.

Hayashi und Faustmann 2001 (120) vermuteten eine unsaubere bzw. defekte MHC-I Selbstpeptidpräsentation bei ihren Untersuchungen an Lymphozyten von sogenannten NOD-Mausstämmen (Non Obese Diabetic) durch einen Defekt und/oder Mangel an der proteasomalen Untereinheit LMP2. Weiterhin konnte festgestellt werden, daß die proteasomale Prozessierung sowohl der NF- κ B Prekursorproteine p105 und p100 als auch seines Inhibitors I κ B in diesen LMP2-defekten Lymphozyten stark beeinträchtigt sind. NF- κ B kann normalerweise im aktivierten Zustand in den Zellkern gelangen und dort aktiv an der Regulation der Gentranskription für Zytokine, Lymphozytenreifung und antiapoptotische Signalgeber teilnehmen (15). Ebenso wäre die eingeschränkte Degradation von apoptoseverstärkenden Proteinen und Transkriptionsfaktoren wie p53, p21 oder c-myc eine Ursache für ein Übermaß an Apoptose. Durch eine gestörte bzw. verminderte proteasomale Funktion wäre eine Forcierung des programmierten Zelltodes über diesen Weg denkbar. Demnach ist es plausibel, warum auch beim Gesunden antigene Strukturen und MS-artige Inflammationszustände lokal ablaufen, aber niemals zu einer Persistenz der Autoreaktivität und schließlich zur Demyelinisierung führen.

Es scheint, daß ein gezieltes, auf die aktuelle immunologische aktivierte Phase des Organismus abgestimmtes „Auf und Ab“ in der Apoptose notwendig ist, um Krankheitserreger zu eliminieren, den Körper vor weiteren Infekten mit immunologischen Gedächtnis auszustatten und gegebenenfalls eine überschießende Immunaktivierung rechtzeitig zu terminieren. Und so liegt der Verdacht nahe, daß eine verminderte oder auch gestörte proteasomale Funktion diese Mechanismen beeinträchtigt. Wie genau dies sich im Detail verhält, bleibt weiteren gezielten Untersuchungen vorbehalten.

6.2 Diskussion Guillain-Barré-Syndrom

Das Guillain-Barré-Syndrom als eine demyelinisierende Erkrankung des peripheren Nervensystems zeigt in der Pathogenese gewisse Analogien zur Multiplen Sklerose. Man geht, wie auch bei der MS, von einer gestörten T-Zell-Reaktivität aus. Die im peripheren Immunsystem, beispielsweise im Rahmen eines Infektes, aktivierten T-Lymphozyten können in das periphere Immunsystem eindringen und dort bei Kontakt mit dem geeigneten Antigen die Inflammationskaskade (mit Zytokinsekretion, B-Zell-Stimulation und Rekrutierung von Makrophagen und ortsständiger Glia) in Gang setzen.

Um einen weiteren Einblick in die pathoimmunologischen Mechanismen zu gewinnen, untersuchten wir in vorliegender Arbeit die Rolle, die das Proteasom als immunologisch aktiver Partikel in diesem Zusammenhang einnehmen kann. Hierbei analysierten wir das frei zirkulierende Proteasom (cProteasom) im Liquor und im Serum von 25 Patienten mit klinisch, elektrophysiologisch als auch liquorologisch gesichertem Guillain-Barré-Syndrom und verglichen dies mit der Analyse von 33 Serum-Liquor-Paaren einer gesunden Kontrollgruppe.

In unseren Untersuchungen konnten wir im Serum keine statistisch relevanten Unterschiede in der Höhe der cProteasom-Konzentrationen finden: die Konzentrationen an cProteasom für die gesunden Kontrollen rangierten im Mittel in einem Bereich von 571,01 ng/ml im Serum. Die GBS-Seren zeigten Werte von 654,23 ng/ml im Mittel. Die Untersuchung des Liquors dagegen zeigte eine auch rechnerisch als signifikant anzusehende ($p < 0,001$) Verminderung der proteasomalen Konzentrationen der Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe. Eine Untersuchung hinsichtlich Korrelation zwischen Serum- und Liquorkonzentrationen erbrachte keine statistisch relevante Signifikanz. Auffällig bei den Analysen waren die Analogien in den Proteasomkonzentrationen im Liquor zwischen den MS- und den GBS-Patienten. So rangieren die Konzentrationen für die Patienten aus der GBS-Gruppe im Mittel bei Werten von 9,51 ng/ml und die der MS-Patienten bei 6,49 ng/ml und zeigen damit statistisch signifikante erniedrigte Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe (14,87 ng/ml) und zu den beiden anderen untersuchten Gruppen (ALS: 20,52 ng/ml und AD: 17,37 ng/ml). Diese Beobachtung konnte bedingt auch im Serum gemacht werden: Hier beliefen sich die Konzentrationen an cProteasom für die GBS-Gruppe auf 654,23 ng/ml und die der MS-Gruppe auf 513,29 ng/ml. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe der Patienten mit ALS konnte dies jedoch nicht als statistisch relevanter Unterschied ausgewiesen werden.

Diese Analogien in der proteasomalen Konzentration im Liquor im Vergleich zu den Fällen von Multipler Sklerose lassen auf die schon vermuteten Gemeinsamkeiten in der Pathogenese schließen. Das Pendant zur Mirkoglia stellen im peripheren Nervensystem die residenten Makrophagen dar. Sie fungieren als antigenpräsentierende Zellen und führen in Inflammationszuständen durch Sekretion von toxischen Metaboliten und proinflammatorischen Zytokinen zu einer progredienten Schädigung der Markscheide. Eine Depletion von Makrophagen, so Jung et al. 1993 (121), führte zu einer deutlichen Reduzierung in der Schwere der Erkrankung. Ebenso können sie durch eine Induktion von T-Zell-Apoptose, Sekretion antiinflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren zu einer Remyelinisierung beitragen. Erniedrigungen der proteasomalen Ausstattung könnten demnach einen Hinweis auf eine dysbalancierte proteasomale Regulation dieser T-Zell-Apoptose liefern. Antigen-spezifische T-Zellen erkennen ihre Epitope durch hinreichende Präsentation via MHC-I/MHC-II. Eine unsaubere oder aber verringerte Präsentation via MHC-I durch einen Mangel oder Defekt an Proteasom könnte auch beim GBS zu einer Expansion autoreaktiver T-Zellen führen. Die selektiv im Liquor erniedrigten cProteasomspiegel könnten als Ausdruck einer gestörten intrathekalen Antigenpräsentation sein, die im Falle der Infektabwehr eine Chronifizierung der Entzündung begünstigen würde. So ist es sinnvoll, im Verlauf weiterer Studien zu untersuchen, wie sich bei der als „MS des peripheren Immunsystems“ auch beschriebenen chronischen Verlaufsform des GBS, der CIDP (chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuritis), intrathekaler Proteasomenstatus und Erkrankungsverlauf bedingen.

6.3 Diskussion Alzheimer Demenz

Beweisend für die Diagnose einer Alzheimer Demenz ist der Nachweis der Amyloid-haltigen Plaques und Neurofibrillenbündel im Hirnschnittpräparat. Klinisch handelt es sich bei der Diagnose Alzheimer immer um eine Ausschlußdiagnose, die in etwa 80% d.F. mit dem neuropathologischen Befund übereinstimmen (93). Untersuchungen wie cCT oder MRT, PET oder SPECT können die Diagnose stützen (94). Tau-Protein läßt sich bei den Erkrankten auch im Liquor nachweisen. Die diagnostische Treffsicherheit der Liquoruntersuchungen kann durch eine Kombination der beiden Marker Tau-Protein und β -42- Peptid verbessert werden.

Die Beteiligung des UPS (Ubiquitin-Proteasom-System) an der Pathogenese der AD wurde durch immunhistochemische Beobachtungen von ubiquitinilisierten Tau-Proteineinschlüssen in den Neurofibrillären Tangles festgestellt (122). Ebenso liefert eine verstärkte Präsenz des UPS bei Anwesenheit proinflammatorischer Stimuli Hinweise auf eine neuroinflammatorische Genese der Erkrankung. Es wurde vermutet, daß apoptotischer Zelltod durch die Toxizität der pathologischen Proteineinschlüsse oder aber auch durch eine beeinträchtigte Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Apparates ausgelöst werden kann (123). Dem Proteasom als multikatalytischer Proteasekomplex kommt in erster Linie die Aufgabe der Degradation falschgefalteter, zerstörter und auch kurzlebiger Proteinen zu. Während Phasen eines erhöhten intrazellulären Proteinturnovers (wie bei der Muskelatrophie, beim Fasten oder auch bei degenerativen und inflammatorischen Prozessen) kann durch einen Neuzusammenbau des Proteasoms der Proteinumsatz vervielfacht werden (118). Nun konnte in eine Studie von Adorí et al. 2005 (124) zur Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei neurodegenerativen Prozessen wie der Creutzfeld-Jakob- und der Alzheimerschen Erkrankung nachgewiesen werden, daß die Verteilung des UPS nicht ubiquitär gleich ist, sondern Gebiete mit unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. In o.g. Arbeit wurden aus Hirnschnittpräparaten von Patienten mit autopsisch gesicherter Alzheimer Demenz, Creutzfeld-Jakob-Erkrankung und von Kontrollpräparaten immunhistochemisch die Verteilung von Ubiquitin, proteasomalen Untereinheiten (S6a, S6b, und S10b, S4 und S7) und des Hitzeschockproteins Hsp 72 untersucht. Gebiete mit einem schwächeren Immunlabeling korrespondierten mit den pathologisch gesicherten affektierten Gebieten in Fällen von CJD und AD und zeigten mehr positive TUNEL-Reaktion, also eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber Zelltod. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, daß das Hitzeschockprotein Hsp 72 eine prominente Antwort auf verschiedene Arten von zellulärem Stress (125) und in Kooperation mit dem UPS und molekularen Chaperonen ein Bestandteil des Protein-Qualitätskontroll- und Protektionssystems ist (126).

Ein Überladen des UPS mit unzerschneidbaren Substraten, Mutationen oder aber starker oxidativer Streß führen zur Akkumulation abnormaler Proteine und zur selektiven Degeneration der Neurone (127). Das 26S-Proteasom, regulatorische ATPase subunits S6b und Hsp 72 wurden in Neurofilamenttangles bei der Alzheimerschen Erkrankung als auch in Lewy-Bodies bei der diffusen Lewy-Body-Erkrankung gefunden (128). Weitere Studien gehen von einer selektiven Hemmung des UPS durch eine mutante Form des Ubiquitins (UB¹⁺) aus, welches selektiv in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten überexprimiert wird. Diese Variante selbst verhindert durch Einbau in die Polyubiquitinketten deren normalen Abbau durch das 26S-Proteasom und führt damit zur Formation von Ubiquitineinschlüssen, sogenannte „Aggresomen“, in kultivierten Zellen. Weiterhin sind Präseniline, welche positiv auf die γ -Sekretase-abhängige Spaltung (A β -Generierung) des Amyloidprecursorproteins regulatorisch Einfluß nehmen, ebenso Substrate des UPS. Es ist daher möglich, daß eine progressive, altersabhängige Inhibition des 26S-Proteasoms durch UB¹⁺-Ubiquitinketten zur Pathogenese der AD beitragen könnte. Schließlich würde die Inhibition des Proteasoms zu einer Verhinderung der Degradation von mißgefalteten Proteinen des Endoplasmatischen Retikulums führen, zum Anfallen zellulärer toxischer Metabolite und damit letztlich zum Untergang der betroffenen Zellen (129).

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich o.g. Störungen im Ubiquitin-Proteasom-System auch in einer quantitativen Veränderung der Proteasomkonzentrationen niederschlagen. Unsere Überlegungen zielten ab auf die Untersuchung der cProteasom-Levels im Liquor als auch im Serum von Patienten mit klinisch diagnostizierter Alzheimer Demenz im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Hierbei fanden wir in der Gruppe der Alzheimer-Demenz Konzentrationen im Serum an cProteasom im Mittel von 815,07 ng/ml. Die der Kontrollgruppe rangierten bei 571,01 ng/ml im Mittel. Es konnte damit keine statistisch relevante Differenz beschrieben werden ($p = 0,005$). Ebenso zeigte sich auch in den Liquores im Vergleich zur Kontrollgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,124$): das cProteasomlevel der Patienten mit Alzheimer-Demenz rangierte im Mittel bei 17,37 ng/ml, das der Kontrollgruppe bei 14,87 ng/ml. Hinsichtlich der Korrelation zwischen Serum- und Liquorkonzentrationen an cProteasom konnte ein diskreter statistisch relevanter Zusammenhang (Korrelationskoeffizient von 0,41) ermittelt werden. Die Hypothese einer quantitativen Beeinflussung des UPS bestätigte sich in dieser Untersuchung nicht. In unseren Analysen konnten keine singnifikanten Unterschiede in der Höhe der Proteasomenkonzentrationen im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe gefunden werden.

Nun muß der Tatsache Rechnung getragen werden, daß aus dem Pool der untersuchten Liquores nur klinisch die Diagnose Alzheimer Demenz gesichert werden konnte und ein Einfluß weiterer dementieller Erkrankungen auf die Untersuchungsergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann, da keine neuropathologische Analyse stattfinden konnte. Und so werden weitere Studien erforderlich sein, einen möglichen Zusammenhang zwischen Liquorkonzentrationen an cProteasom und neuropathologischen Befund klar herauszustellen.

6.4 Diskussion Amyotrophe Lateralsklerose

Die erstmals vor 125 Jahren von Charcot beschriebene Erkrankung bezeichnet einen degenerativen Befall motorischer Nerven in Gehirn, Hirnstamm und Rückenmark ohne klar ersichtliche Ätiologie bzw. Risikofaktoren, die im Median nach drei Jahren zum Tode führt (46). Man geht mittlerweile von einer multifaktoriellen Genese der Erkrankung aus. Diskutiert werden bei der familiären Form der ALS Mutationen im Gen, das für die Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1) kodiert (48), es dadurch mit neuen toxischen Eigenschaften ausstattet und damit den Untergang motorischer Neuronen hervorrufen kann (50). Am Ende der Kaskade von Ereignissen, die zum SOD1-medierten Zelltod führen, steht die Apoptose. Bestätigung dieser „Apoptose-Theorie“ liefern Untersuchungen hinsichtlich der Überexpression von proapoptotischen Kaspasen-1 und -3 (52) im Rückenmark von mSOD1-Mäusen sowie des Verlustes mitochondrialer Integrität durch oxidative Schädigung. Dieses führt zu einer Freisetzung von Cytochrom C, welches wiederum die Aktivierung Apoptose-initiiierender Kaspasen bedingt (53). Weiterhin wurden Störungen im Glutamat-Haushalt im Sinne eines toxischen Einflusses des exzitatorischen Neurotransmitters beschrieben: intrazelluläre Transmitterfreisetzung bei Zelluntergang oder eine selektive Reduktion des Glutamat-Transporter-Proteins EAAT2 (55) dienen als mögliches Erklärungsmodell für neuronalen Zelltod. Eine aktive Teilnahme von Astroglia und Mikroglia an der Neurodegeneration durch Freisetzung von immunmodulatorischen Zytokinen und deutlich erhöhte Levels an IL-6, IL-1beta sowie Prostaglandin E2 im Liquor von ALS-Patienten stützen die Theorie einer entzündungsbedingten Genese (57). Weitere Überlegungen zur Pathogenese der ALS gehen nach neueren Untersuchungen von einer Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) aus. So ist bekannt, daß das UPS in einer engen Verbindung zur Pathogenese von verschiedenen neurodegenerativen Prozessen steht. Gestützt wird diese Theorie durch die Ubiquitin-positiven intraneuronalen Einschlüsse (130) und die Unfähigkeit der Neuronen, akkumulierte Proteinaggregate abzubauen. Unter normalen Bedingungen werden Ubiquitin und ubiquitinylierte Proteinaggregate sehr schnell abgebaut und können deshalb in gesunden Zellen nicht akkumulieren.

Fehler in dieser Elimination können daher rühren, daß eine Malfunktion des UPS vorherrscht oder aber eine strukturelle Veränderung von einigen Proteinen vorliegt, was sich in ihrer Unzugänglichkeit zur Proteolyse darstellt (131).

In einer Studie von Mendonça et al. 2006 (132) zur Expression von Ubiquitin und Proteasom in Motoneuronen und Astrozyten von ALS-Patienten wurde mittels Immunhistochemie eine enge Korrelation zwischen Neurofilament-positiven affektierten Gebieten, Ubiquitin und Proteasom detektiert. Dabei präsentierten sich die Mehrzahl der überlebenden Neurone bei der ALS mit einer intensiven Anfärbbarkeit für die Proteasomuntereinheiten Alpha und Beta, und auch die quantitative Analyse zeigte, daß die Proteasomexpression in den Motoneuronen der Patienten mit ALS im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Interessanterweise konnte diese Beobachtung auch in den Astrozyten gemacht werden, welche eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des perineuronalen Mikroklimas spielen. Andere Untersuchungen wiederum konnten demonstrieren, daß die Neuronen der sporadischen und familiären ALS für das 20S-Proteasom nicht positiv sind (130). Es scheint daher möglich, daß eine gewisse Dysfunktion innerhalb der proteasomalen Untereinheiten vorliegt bzw. die Proteasomaktivität per se affektiert ist. Abnormale Proteinaggregate könnten die Levels an intrazellulärer Proteolyse erhöhen, was eine erhöhte Rekrutierung an zytosolischen Pool von Ubiquitin und Proteasom bedeutet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß das UPS direkt oder indirekt (durch eigene Malfunktion oder durch Überladung mit Proteinaggregaten) in der Pathogenese der ALS involviert ist. Seine Dysfunktion kann den Metabolismus der Neurone soweit verändern, daß sie im Zelltod münden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die ALS eine Störung der Proteinaggregation aufweist, die neuronale und auch nicht-neuronale Zellen (133) wie Astrozyten und Mikroglia affektiert (134). Unsere Untersuchung beschäftigte sich mit der Frage nach der Präsenz des Proteasoms im Serum und Liquor von ALS- Patienten und dessen quantitativen Beschaffenheit im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Hierbei analysierten wir eine Gruppe von 32 Patienten mit sporadischer Amyotropher Lateralsklerose und eine Gruppe von 33 gesunden Probanden. Die gemessenen Konzentrationen an cProteasom im Serum in unseren Analysen (Median 415,45 ng/ml) zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe (540,7 ng/ml) keine statistisch signifikanten Unterschiede (p-Wert von 0,49). Ebenso konnte im Liquor der ALS-Patienten hinsichtlich der Levels an zirkulierendem Proteasom (17,29 ng/ml im Median) im Vergleich zu den gesunden Probanden (15,2 ng/ml im Median) keine relevanten Unterschiede detektiert werden (p = 0,37). Hinsichtlich der Korrelation zwischen Konzentration an cProteasom im Serum der im Liquor konnte keine Korrelation beschrieben werden (p > 0,32 auf einem Signifikanzniveau von $\alpha > 0,05$).

Der lokale Nachweis des Proteasoms fand in den o.g. Arbeiten vor allem in affektierten Arealen wie im motorischen Kortex und in den motorischen Hirnnervenkernen statt, und zwar durch den Nachweis einer signifikant erhöhten Proteasomexpression in den Motoneuronen der Patienten mit ALS im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein erhöhter Bedarf an intrazellulärer Proteolyse zum Abbau abnormaler Proteinaggregate bedeutet eine erhöhte Rekrutierung an zytosolischen Pool von Ubiquitin und Proteasom (132). Ebenso gingen unsere Überlegungen von einer gesteigerten Apoptose von neuronalen Zellen aus und der damit vermehrten Freisetzung intrazellulärer Partikel wie des Proteasoms, welches sich dann messbar im Liquor niederschlagen könnte. In unserer Untersuchung konnte diese Hypothese der quantitativen Beeinflussung des Levels an cProteasom gegenüber einer gesunden Probandengruppe nicht herausgestellt werden. Letztlich besteht die Möglichkeit einer erhöhten Apoptoserate in Verbindung mit einer Malfunktion oder Minderpräsenz des Proteasoms. Dieses würde nicht unbedingt zu meßbaren Veränderungen in der cProteasom-Ausstattung im Liquor führen. Unsere Überlegungen fanden hiermit Abschluß, daß eine Beteiligung des Proteasoms, wie auch schon in oben genannten Arbeiten, an der Pathogenese der ALS per se nicht ausgeschlossen werden kann. Es werden jedoch weitere quantitative Analysen notwendig sein, um einen detaillierteren Aufschluß über den Zusammenhang zwischen intraneuronaler Beschaffenheit des Ubiquitin-Proteasom-Systems und der Liquorkonzentration des Proteasoms zu gewinnen.

7 Zusammenfassung

Das Proteasom präsentiert als multikatalytische Einheit im Zusammenhang mit der Ubiquitinkaskade ein physiologisch katabolisches System für den Abbau abnorm gefalteter, altersschwacher sowie auch kurz- und langlebiger Proteine. Es existiert in allen Zellen des Organismus und nimmt auch auf die Apoptose einen regulativen Einfluß. Durch die Beteiligung an der Antigen-Prozessierung kommt dem Proteasom auch eine wichtige Bedeutung in der Immunantwort zu. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Proteasom sowohl im Serum als auch im Liquor von Patienten mit neurodegenerativen und -immunologischen Prozessen wie der Multiplen Sklerose, dem Guillain-Barré-Syndrom, der Amyotrophen Laterasklerose und der Alzheimerschen Demenz nachweisbar ist, ob im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe statistisch relevante Unterschiede detektierbar sind, und welche Bedeutung die gewonnenen Ergebnisse in der Pathogenese dieser Erkrankungen einnehmen können. Dazu untersuchten wir eine Gruppe von 139 Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen: 32 Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose, 25 mit Guillain-Barré-Syndrom, 30 mit Multipler Sklerose und 52 mit klinisch diagnostizierter Alzheimer Demenz sowie eine Kontrollgruppe von 33 gesunden Probanden. Von diesen Patienten wurden jeweils 150 µg Patientenserum und -liquor für die Analyse aus Rückstellproben des Liquorlabors der Klinik für Neurologie der Charité Berlin verwendet, um daraus die Konzentrationen des zirkulierenden Proteasoms (cProteasoms) sowie die Proteasomen-Antikörper zu bestimmen.

Die Analyse der gesunden Kontrollgruppe erbrachte im Serum Konzentrationen an cProteasom von 571,01 ng/ml im Mittel (SD 421,27 ng/ml), für die Gruppe der MS-Patienten 513,29 ng/ml (SD 278,87 ng/ml). Patienten mit ALS zeigten Werte von 466,02 ng/ml (SD 213,9 ng/ml), die Gruppe der GBS-Fälle 654,23 ng/ml (SD 350,02 ng/ml), und bei den Patienten mit Alzheimerscher Demenz rangierten die Levels an cProteasom im Serum im Mittel bei 815,07 ng/ml (SD 287,87 ng/ml). Eine Signifikanz zur Kontrolle bestand bei keiner der Gruppen. Im Liquor hingegen fand sich eine signifikante Minderung bei den MS-Patienten auf 6,49 ng/ml (SD 5,78) gegenüber 14,87 ng/ml (SD 4,35) der Kontrollgruppe (p-Wert < 0,001). Auch im Liquor der Patienten mit GBS konnte ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang in der Serumkonzentration gesehen werden (Signifikanzniveau von 0,001). Aufgrund dieser relevanten Ergebnisse bei der Multiplen Sklerose vertieften wir in einer weiteren Analyse der Serum-Liquor-Paare unsere Betrachtungen auf die Ausprägung von Antiproteasom-Antikörpern.

Die erste Beschreibung einer humoralen Antiproteasom-Antwort erfolgte durch Arribas et al. 1991 bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematoses, dem Prototyp der systemischen Autoimmunerkrankung, wobei in 35% der Fälle eine Seropositivität detektiert werden konnte (106). Durch Mayo et al. 2002 (2) wurde die Untersuchung hinsichtlich antiproteasomaler Autoantikörper auf andere Autoimmunerkrankungen wie die Multiple Sklerose ausgedehnt. Bei 110 untersuchten MS-Patienten konnte hier eine Seropositivität von 66% beobachtet werden, im Liquor wurden 80% positiv auf Antiproteasom-Antikörper getestet (2).

In unserer Untersuchung konnte sowohl im Liquor als auch im Serum eine Prävalenz von 100% von Antiproteasom-Antikörpern gefunden werden (30 von 30). Ebenso konnten bei unseren gesunden Kontrollen Antiproteasom-Antikörper ermittelt werden, in signifikant erniedrigten Bereichen gegenüber den untersuchten MS-Proben, jedoch auch mit einer Prävalenz von 98% im Serum (48 von 49) und 100% im Liquor (49 von 49), was die Vermutung nahelegt, daß eine natürliche Autoreaktivität gegenüber Proteasom auch im nicht entzündlich veränderten Gewebe vorzukommen scheint. Für die Antiproteasom-Antikörper fanden sich nur im Liquor signifikante Differenzen der Mittelwerte: 0,19 U/ml (SD 0,16) für die MS-Patienten, 0,07 U/ml (SD 0,06) für die Kontrollgruppe.

Es liegt nahe, daß die nachgewiesenen Abweichungen der Konzentrationen des Proteasoms und der Antiproteasom-Antikörper eine Rolle sowohl in der Immunpathogenese der Multiplen Sklerose als auch des Guillain-Barré-Syndroms spielen. So könnte die Verminderung des Proteasoms im Liquor zu einer ungenügenden Kontrolle aktivierter T-Lymphozyten führen. Andererseits könnte auch das Proteasom selbst als Autoantigen in der Pathogenese der MS Bedeutung haben (2). Eine unsaubere oder aber verringerte Präsentation via MHC-I durch einen Mangel oder Defekt an Proteasom könnte auch bei dem GBS zu einer Expansion autoreaktiver T-Zellen führen. Die selektiv im Liquor erniedrigten cProteasomspiegel könnten als Ausdruck einer gestörten intrathekalen Antigenpräsentation sein, die im Falle der Infektabwehr eine Chronifizierung der Entzündung begünstigen würde.

So ist es sinnvoll, im Verlauf weiterer Studien zu untersuchen, wie sich bei der als „MS des peripheren Immunsystems“ beschriebenen chronischen Verlaufsform des GBS, der CIDP, intrathekalen Proteasomstatus und Erkrankungsverlauf bedingen. Durch diese diversen und noch zu wenig verstandenen komplexen Funktionen, die das Proteasom hinsichtlich der Apoptose übernimmt, kann man schlußfolgern, daß ein gezieltes, auf die aktuelle immunologisch aktivierte Phase des Organismus abgestimmtes „Auf und Ab“ in der Apoptose notwendig scheint, um Krankheitserreger zu eliminieren, den Körper vor weiteren Infekten mit immunologischem Gedächtnis auszustatten und gegebenenfalls eine überschießende Immunaktivierung rechtzeitig zu terminieren. Und so liegt der Verdacht nahe, daß eine verminderte oder auch gestörte proteasomale Funktion diese Mechanismen beeinträchtigt. Wie genau dies sich im Detail verhält, bleibt weiteren gezielten Untersuchungen vorbehalten.

8 Anhang

A Literaturverzeichnis

- 1 - Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolf PE. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune disease. *J Rheumatol* 2002; 29: 2045-52
- 2 - Mayo I, Arribas J, Villoslada P, Alvarez DoForno R, Rodriguez-Vilarino S, Montalban X, de Sagarra MR, Castano JG. The proteasom is a major autoantigen in multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125:2658-67
- 3 - Baumeister W, Dahlmann B, Hegerl R, Kopp F, Kuehn L, Pfeifer G. Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett.* 1988; 241:239-245
- 4 - Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB. Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J Mol Biol.* 1993; 229: 14-19
- 5 - Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4Å resolution. *Nature* 1997; 386: 463-471
- 6 - Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D. A Subcomplex of the Proteasome Regulatory Particle Required for Ubiquitin-Conjugate Degradation and Related to the COP9-Signalosome and eIF3. *Cell* 1998; 94: 615-623
- 7 - Braun BC, Glickman MH, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M. The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature Cell Biol* 1999; 1: 221-226
- 8 - Ferrel K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem. Sci* 2000; 25:83-88
- 9 - Orłowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 1990;29: 10289-10297
- 10 - Glickmann MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. Destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 2002 ; 82: 373-428

- 11 - Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. The size peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 1999; 274 (6): 3363-71
- 12 - Goldberg AL, Gaczynska M, Grant E, Michalek M, Rock KL. Functions of the proteasome in antigen presentation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995; 60: 479-490
- 13 - Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 1994; 79 (1): 13-21
- 14 - Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*. 1994; 78 (5): 773-85
- 15 - Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49): 6853-66
- 16 - Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998; 396: 119-22
- 17 - Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997; 64: 33
- 18 - Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996; 85: 781-84
- 19 - Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of pro-caspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *MolCell*. 1998; 1: 949-57
- 20 - Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-33
- 21 - Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 516-24
- 22 - Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281:1322-26
- 23 - Myashita T, Reed JC. Tumor suppressor p 53 is a direct transcriptional activator of the bax gen. *Cell* 1995; 80: 293-99

- 24 - Bauer J, Stadelmann C, Bancher C, Jellinger K, Lassmann H. Apoptosis of T lymphocytes in acute disseminated encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999; 97(6):543-46.
- 25 - Pender MP. Genetically determined failure of activation-induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of multiple sclerosis. *Lancet*. 1998; 351: 978-81. Review.
- 26 - Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol*. 1996; 6: 259-274
- 27 - Wosik K, Antel J, Kuhlmann T, Brück W, Massie B, Nalbantoglu J. Oligodendrocyte injury in multiple sclerosis: a role for p53. *Journal of Neurochemistry* 2003; 85: 635 – 644
- 28 - Pette M, Fujita K, Kitze B, Whitaker JN, Albert E, Kappos L, Wekerle H. Myelin basic protein-specific T lymphocyte line from MS patients and healthy individuals. *Neurology* 1990; 40: 1170-1176
- 29 - Soane L, Cho HJ, Niculescu F, Rus H, Shin ML. C5b-9 Terminal Complement Complex Protects Oligodendrocytes from Death by Regulating Bad Through Phosphatidylinositol 3-Kinase /Akt Pathway. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 2305-11
- 30 - Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343 (13): 938-52.
- 31 - Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46 (4): 907-11
- 32- Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. *Brain* 1989; 112 (1):133-46
- 33 - Soderstrom M. Clues to the immunopathogenesis of multiple sclerosis by investigating untreated patients during the very early stage of disease. *Neurol Sci* 2001; 22: 145-49
- 34 - Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 1986; 9: 271-77

- 35 - Vass K, Lassmann H. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol* 1990; 137: 789-800
- 36 - Oppenheimer DR. The cervical cord in multiple sclerosis. *Neuropathol Exp Neurol* 1978; 4: 151-62.
- 37- de Rosbo NK, Hoffmann M, Mendel I, Yust I, Kaye J, Bakimer R. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol* 1997; 27: 3059-69
- 38 - Kojima K, Berger T, Lassmann H, Hinze Selch D, Zhang Y, Gehrman J. Experimental autoimmune panencephalitis und uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 1994; 180: 817-29
- 39 - Rösener M, Muraro Pa, Riethmüller A, Kalbus M, Sappeler G, Thompson RJ. 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: A novel candidate autoantigen in demyelinating diseases. *J Neuroimmunol* 1997; 75: 28-34
- 40 - Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallström E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.* 1998; 8: 681-694
- 41 - Hartung HP, Heininger K, Schäfer B, Fierz W, Toyka KV. Immune mechanism in inflammatory polyneuropathy. *Ann N Y Acad Science* 1988; 540: 122-61.
- 42 - Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, Krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, Strominger JL, Svejgaard A, Hjorth JP, Holmdahl R, Wucherpfennig KW, Fugger L. A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell-receptor. *Nature Genetics* 1999; 23: 343-347
- 43 - Bielekova Bibiana, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, Gran B, Eaton J, Antel J, Frank JA, McFarland HF, Martin R. Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: Results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nature Medicine* 2000; 6: 1167-1175

- 44 - Ascherio A, Zhang S, Hernan M, Olek M, Coplan P, Brodovicz K, Walker A. Hepatitis B vaccination and the risk of multiple sclerosis: case control studies. *Gastroenterol Clin Biol* 2001; 25: 927-929
- 45 - Barnett LA, Fujinami RS. Molecular mimicry: a mechanism for autoimmune injury. *FASEB J.* 1992; 6: 840-844
- 46 - Munsat TL, Andres PL, Finison LJ, Conlon T, Thibodeau LM. The natural history of motoneuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1988; 38: 409-13
- 47 - Lopez-Vega JM, Calleja J, Combarros O, Polo JM, Bericano J. Motor neuron disease in Cantabria. *Acta Neurol Scand.* 1988; 77 (1): 1-5
- 48 - Brown RH Jr. Amyotrophic lateral sclerosis: recent insights from genetics and transgenic mice. *Cell* 1995; 80: 687-92
- 49 - Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 1995; 64: 97-112
- 50 - Cleveland DW, Laing N, Hulse PV, Brown RH. Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature* 1995; 378: 342-3
- 51 - Kostic V, Lackson-Lewis V, De Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 1997; 277: 559-62
- 52 - Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motoneuron death in Cu/Zn superoxide dismutase familial ALS. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13901-6
- 53 - Kroemer G, Zamzani M, Susin A. Mitochondrial control of apoptosis. *Trends Immunol* 1997; 18: 44-51
- 54 - Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia S, Cleveland DW, Price DL. An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* 1995; 14: 1105-16

- 55 - Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kunczi RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1995; 38 (1): 73-84
- 56 - Almer G, Vukosavic S, Romero N, Przedborski S. Inducible Nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1999; 72: 2415-25.
- 57 - Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, Kostic V, Przedborski S. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology* 2002; 58: 1277-9
- 58 - Moulin DE, Hagen N, Feasby TE, Amireh R, Hahn A. Pain in Guillain-Barre syndrome. *Neurology.* 1997;48(2):328-31.
- 59 - Arnason BGW, Soliven B. Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. In Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW (eds): *Peripheral Neuropathy*, 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1993, 1437-1497
- 60 - Govoni V, Granieri E. Epidemiology of the Guillain-Barré syndrome. *Current Opinion in Neurology* 2001; 14: 605-613
- 61 - Hughes RAC, Rees JH. Clinical and epidemiologic features of Guillain-Barré Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases* 1997; 176: 92-98
- 62 - Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FG, Herbrink P, Schmitz PI, der Klerk MA, van Doorn PA. The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barré syndrome: a case control study. *Neurology* 1998; 51: 1110-1115
- 63 - Winer JB, Hughes RA, Osmond C. A prospective study of acute idiopathic neuropathy. I. Clinical features and their prognostic value. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51: 605-612
- 64 - Barohn RJ, Saperstein DS. Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. 1998; 18: 49-61
- 65- Gordon PH, Wilbourn AJ. Early electrodiagnostic findings in Guillain-Barré syndrome. *Arch Neurol.* 2001; 58: 913-917

- 66 - van der Meché, FGA, van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: immune mechanisms and update on current therapies. *Ann Neurol* 1995; 37: 14-31
- 67 - Kieseier BC, Archelos JJ, Hartung HP. Different effects of Simvastatin and Interferon-beta on the proteolytic activity of matrix metalloproteinases. *Arch Neurol* . 2004; 61: 929-932
- 68 - Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY et al. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 1996; 39:627-37
- 69 - Ho TW, Hsieh ST, Nachamkin I, Willison HJ, Sheikh K, Kiehlbauch J, Flanigan K, McArthur JC, Cornblath DR, McKhann GM, Griffin JW. Motor nerve terminal degeneration provides a potential mechanism for rapid recovery in acute motor axonal neuropathy after *Campylobacter* infection. *Neurology* 1997; 48: 717-724
- 70 - Griffin JW, Li CY, Macko C et al. Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of the Guillain-Barré syndrome. *J Neurocytol* 1996; 25: 33-51.
- 71 - Griffin JW, Li CY, Ho TW et al. pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré-Syndrome. *Ann Neurol* 1998; 44:780-8
- 72 - Phillips MS, Stewart S, Anderson JR. Neuropathological findings in Miller-Fisher-Syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984; 47: 492-95
- 73 - Taylor WA, Hughes RA. T lymphocyte activation antigens in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol*. 1989; 24: 33-39
- 74 - Schmidt B, Toyka KV, Kiefer R, Full J, Hartung HP, Pollard J. Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Muscle Nerv* 1996; 19: 474-487
- 75 - Ang CW, Jacobs BC, Laman JD. The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol* 2004; 25: 61-66
- 76 - Yuki N, Taki T, Inagaki F, Kasama T, Takahashi M, Saito K, Handa S and Miyatake T. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp.Med.* 1993; 178(5):1771-5

- 77 - Gabriel CM, Hughes RAC, Moore SE, Smith KJ, Walsh FS. Induction of experimental neuritis with peripher myelin protein 22. *Brain* 1998; 121: 1895-902
- 78 - Hughes RAC, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 2005; 366:1653-66
- 79 - Reisberg B. Alzheimer's Disease. The standard Reference Reisberg, B (Hrsg.) New York The Free Press 1983:1-33
- 80 - Selkoe, DJ. Alzheimer's Disease: genes, proteins and therapy. *Physiol. Rev.* 2001; 81: 741-766
- 81 - Ferri C, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005; 366 (9503): 2112-17
- 82 - Masters CL, Simms G, Weinmann NA, Multhaup G, MacDonald BL, Beyreuther K. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 1985; 82 : 4245-49
- 83 Tanzi RE, Kovacs DM, Kim TW, Moir RD, Guénette SY, Wasco W. The gene defects responsible for familial Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis* 3, 1996:159-168
- 84 - Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McColongue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 1992: 672-4
- 85 - Ishii T, Haga S, Shimizu F. Identification of components of immunoglobulins in senile plaques by means of fluorescent antibody technique. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 1975; 32: 157-162
- 86 - Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos LJ, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature* 1995; 374: 647-50
- 87 - Araujo DM, Cotman CW. Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1992. 569: 141-5
- 88 - Woulfe J, Kertesz A, Munoz DG. Frontotemporal dementia with ubiquitinated cytoplasmic and intranuclear inclusions. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2001;102(1):94-102.

- 89 - Josefson D. Lumbar punctures could be used to diagnose Alzheimer's disease, *BMJ* 2003; 326: 950a.
- 90 - Mortimer JA, French LR et al. Head injury as a risk for Alzheimer's disease. *Neurology* 1985; 35: 264-67
- 91 - Doll R. Review. Alzheimer's disease and environmental survival bias. *Age Ageing* 1993; 22: 138-153
- 92 - Hoyer S. Oxidative metabolism deficiencies in brains of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1996; 165:18-24
- 93 - Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC. Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). *Neurology* 2001; 56(9):1143-53.
- 94 - Scheltens P. All patients with suspected dementia should be scanned at least once with CT or MRI. *Int Psychogeriatr.* 2007; 19(3): 533-4.
- 95 - Riemenschneider M, Lautenschlager N, Wagenpfeil S, Diehl J, Drzezga A, Kurz A. Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid 42 proteins identify Alzheimer disease in subjects with mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2002; 59 (11):1729-34.
- 96 - Imajoh Ohmi S, Kawaguchi T, Sugiyama S et.al. Lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome, induces apoptosis in human monoblast U937 cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 217: 1070-77
- 97 - Pagano, M, Tam SW, Theodoras AM et al. Role of the ubiquitin-proteasom pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; 269:682-85
- 98 - Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha induced apoptosis by NF-kappa-B. *Science* 1996; 274: 787-89
- 99 - Sadoul R, Fernandez PA, Quiquerez AL et al. Involvement of the proteasom in the programmed cell death of NGF-deprived sympathetic neurons. *EMBO J* 1996;15: 3845-52
- 100 - Rosche B, Kieseier B, Hartung HP, Hemmer B. Neue Einblicke in die Immunpathogenese der Multiplen Sklerose. *Der Nervenarzt* 2003; 74: 654-63

- 101 - Marvack P, Kappler J, Kolzin BL. Autoimmun disease: Why and where it occurs. *Nat Med.* 2001; 7: 899-905
- 102 - Iglesias A, Bauer J, Litzenburger T, Schubert A, Linnington C. T- and B-Cell Responses to Myelin Oligodendrocyte Glykogenprotein in experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Glia* 2001; 36: 220-34
- 103 - Cross AH, Trotter JL, Lyons J. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol.* 2001 Jan 1;112(1-2):1-14.
- 104 - Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasom. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:179-87
- 105 - Dick TP, Ruppert T, Groettrup M. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 1996; 86: 253-62
- 106 - Arribas J, Luz Rodriguez M, Alvarez Do Forno R, Castano JG. Autoantibodies against the multicatalytic proteinase in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1991; 173: 423-27
- 107 - Belardelli F, Gresser I. The neglected role of type I-interferons in the T-cell response: Implications for its clinical use. *Immunol. Today* 1996; 17: 369-72
- 108 - Arnason BGW, Reder AT. Interferons and Multiple Sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* 1994, 17: 495-47
- 109 - Neighbour PA, Miller AE, Bloom BR. Interferone responses of leukocytes in multiple sclerosis.; *Neurology* 1981; 31: 561-66
- 110 - Tovell DR, McRobbie IA, Warren KG, Tyrell DLJ. Interferon production by lymphocytes from multiple sclerosis and non-MS patients. *Neurology* 1983; 33: 640-43
- 111 - Wandinger KP, Wessel K, Otto M, Reissland P, Kirchner H. Production of endogenous interferon-alpha and-beta in patients suffering from multiple sclerosis. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1998a; 64: 277-78
- 112 - Feist E, Kuckelkorn U, Dörner T et al. Autoantibodies in primary Sjögren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the α - and β -type. *Arthritis Rheum* 1999; 42:697-702

- 113 - Nussbaum AK, Rodriguez-Carreno MP, Benning N, Botten J, Whitton JL. Immunoproteasom-deficient mice mount largely normal CD8+ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. *The Journal of immunology* 2005; 175: 1153-60
- 114 - Panitch HS: Influence of infection on exacerbations of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*1994; 36 (Suppl.): 25-28
- 115 - Gold R, Hartung HP, Lassmann H. T-cell apoptosis in autoimmune diseases:termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanism. *Trends Neurisci.* 1997; 20: 399-404
- 116 - Ladiwala U, Li H, Antel JP, Nalbantoglu J. P53 induction by tumor necrosis factor- α and involvement of p53 in cell death of human oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry* 1999; 73: 605-611
- 117 - Zipp F, Wendling U, Beyer M, Griger U, Waiczies S, Wagenknecht B, Haas J, Weller M. Dual effect of glucocorticoids on apoptosis of human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *J Neuroimmunol* 2000b; 110(1-2): 214-22
- 118 - Dawson SP, Arnold JE, Mayer NJ et al. Developmental changes of the 26 S Proteasom in abdominal intersegmental muscles of *Manducasexta* during programmed cell death. *J Biol Chem* 1995; 270: 1850-58
- 119 - Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S and Elliott PJ. Proteasominhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999; 59 (11): 2615-22
- 120 - Hayashi T, Faustmann D. NOD mice are defective in proteasome production and activation of NF-kB. *MolCellBiol* 1999; 19 (12): 8646-59
- 121 - Jung S, Huitinga I, Schmidt B, Zielasek J, Dijkstra CD, Toyka KV, Hartung HP. Selective elimination of macrophages by dichlormethylene diphosphonate-containing liposomes suppresses experimental autoimmune neuritis. *J Neurol Sci.* 1993; 119: 195-202
- 122 - Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y. Ubiquitin is cinjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 1993; 11: 1151-1160

- 123 - Ding Q, Dimayuga E, Martin S, Bruce-Keller AJ, Nukala V, Cuervo AM, Keller JN. Characterization of chronic low-level proteasome inhibition on neural homeostasis. *Journal of Neurochemistry* 2003; 86: 489-497
- 124 - Ádori C, Kovács GG, Löw P, Molnár K, Gorbea C, Fellingner E, Budka H, Mayer RJ, László L. The ubiquitin-proteasome system in Creutzfeld-Jakob and Alzheimer disease: Intracellular redistribution of components correlates with neuronal vulnerability. *Neurobiology of Disease* 2005; 19: 427-435
- 125 - Feist E, Dörner T, Kuckelkorn U et al. The proteasome alpha-type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1996; 184: 1313-18
- 126 - Demand J, Alberti S, Patterson C, Höhfeld J. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Current Biology* 2001; 11: 1569-1577
- 127 - McNaught KSP, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*; 56:149-162
- 128 - Fergusson J, Landon M, Lowe J, Dawson SP, Layfield R, Hanger, DP and Mayer RJ. Pathological lesions of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies brains exhibit immunoreactivity to an ATPase that is a regulatory subunit of the 26S proteasome. *Neurosci. Lett* 1996; 219: 167-170
- 129 - Lam YA, Pickart CM, Alban A, Landon M, Jamieson C, Ramage R, Mayer RJ and Layfield R. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *PNAS* 2000; 97: 9902-9906
- 130 - Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol. Dis.* 2001; 8: 933-941
- 131 - Layfield R, Alban A, Mayer RJ, Lowe J. The Ubiquitin protein catabolic disorders. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2001; 27: 171-179

- 132 - Mendonça DMF, Chimelli L, Martinez AMB. Expression of ubiquitin and proteasome in motoneurons and astrocytes of spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* 2006; 404: 315-319
- 133 - Brujin LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, Sisodia SS, Rothstein JD, Borchelt DR, Price DL, Leveland DW. ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron* 1997; 18: 327-338
- 134 - Strong MJ, Kesavapany S, Pant HC. The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005; 64:1-16
- 135 - Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolyses. *J Biol Chem.* 2000; 275:14336-14345
125 - Hartl U. Molecular chaperone in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381:571-580
- 136 - Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 425-79
- 137 - Wandinger KP, Sturzebecher CS, Bielekova B et al. Complex immunomodulatory effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* 2001; 50: 349-57

B

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Struktur des 20S-Proteasoms 1
Abbildung 2	Struktur des 20S-Proteasoms 2
Abbildung 3	Aufbau des 26S-Proteasoms
Abbildung 4	Struktur des Ubiquitins 1
Abbildung 5	Struktur des Ubiquitins 2
Abbildung 6	Ablauf der Ubiquitinkonjugation
Abbildung 7	Das Immunproteasom
Abbildung 8	Ablauf der Apoptose
Abbildung 9	Verlaufsformen der MS nach Lublin und Reingold 1996 (31)
Abbildung 10	Mögliche Pathomechanismen bei der Entstehung der ALS
Abbildung 11	Boxplot cProteasomenkonzentrationen aller Gruppen im Serum
Abbildung 12	Boxplot cProteasomenkonzentrationen aller Gruppen im Liquor
Abbildung 13	Boxplot cProteasomenkonzentration der MS-Patienten mit und ohne aktuelle Immunsuppression (Steroidapplikation)
Abbildung 14	Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentrationen Serum-Liquor aller untersuchten Gruppen

Abbildung 15	Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentrationen Serum-Liquor bei Multipler Sklerose
Abbildung 16	Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentrationen Serum-Liquor bei Guillain-Barré-Syndrom
Abbildung 17	Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentrationen Serum-Liquor bei Alzheimer Demenz
Abbildung 18	Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentrationen Serum-Liquor bei Amyotropher Lateralsklerose
Abbildung 19	Korrelationsdiagramm cProteasomenkonzentrationen Serum-Liquor der Kontrollgruppe
Abbildung 20	ROC-Kurve bei Multipler Sklerose
Abbildung 21	ROC-Kurve bei Guillain-Barré-Syndrom
Abbildung 22	Boxplot Antiproteasom-Antikörper im Serum bei MS-Patienten und der Kontrollgruppe
Abbildung 23	Boxplot Antiproteasom-Antikörper im Liquor bei MS-Patienten und der Kontrollgruppe
Abbildung 24	Korrelationsdiagramm Konzentration cProteasom und Antiproteasom-Antikörper im Serum der untersuchten MS-Patienten
Abbildung 25	Korrelationsdiagramm Konzentration cProteasom und Antiproteasom-Antikörper im Liquor der untersuchten MS-Patienten
Abbildung 26	Antiproteasom-Antikörper-Korrelation im Serum der Kontrollgruppe

- Abbildung 27 Antiproteasom-Antikörper-Korrelation im Liquor der
Kontrollgruppe
- Abbildung 28 Korrelation Antiproteasom-Antikörper Serum-Liquor
der MS-Patienten
- Abbildung 29 Korrelation Antiproteasom-Antikörper Serum-Liquor
der Kontrollgruppe

C

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verteilung der verschiedenen Proteasomkompositionen im Zytosol von HeLa-Zellen nach Tanahashi et al. 2000 (135)
Tabelle 2	Mit einer MS-Erkrankung in Zusammenhang stehende potentielle Antigene und Viren
Tabelle 3	Klassifikation des Guillain-Barré-Syndroms und seiner typischen Antikörpermuster modifiziert nach Hughes und Cornblath 2005 (78)
Tabelle 4	Klinische Kriterien für Alzheimer-Demenz
Tabelle 5	Anzahl der in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten
Tabelle 6	Gemessene Konzentrationen des zirkulierenden Proteasoms im Serum der einzelnen Gruppen
Tabelle 7	Gemessene Konzentrationen des zirkulierenden Proteasoms im Liquor der einzelnen Gruppen.
Tabelle 8	Anzahl der auf Antikörper gegen das zirkulierende Proteasom untersuchten Probanden
Tabelle 9	Gemessene Antikörpertiter im Serum der untersuchten MS-Patienten und der gesunden Kontrollen
Tabelle 10	Gemessene Antikörpertiter im Liquor der untersuchten MS-Patienten und der gesunden Kontrollen

D

Abkürzungsverzeichnis

APAF-1	Apoptotic protease activating factor -1
AIFs	Apoptose-Induzierende-Faktoren
ADEM	akute disseminierte Enzephalomyelitis
AIDP	akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMAN	akute motorische axonale Neuropathie
AMSAN	akute motorische und sensorische Neuropathie
ApoE	Apolipoprotein
APP-Gen	Amyloid Precursor Protein
Bcl-2 / Bcl-xl	Apoptoseantagonisten
ccl-w/ced-9	Apoptoseantagonisten

bax, bak, bok, bad, bcl- xs	proapoptotische Proteine
CNPase	Zyklonukleotidphosphodiesterase
CARD-Domäne	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
cProteasom	Zirkulierendes Proteasom
CIDP	Chronisch-inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie
DM	Dermatomyositis
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EAAT2	Glutamat-Transporter-Protein
FCS	Fetales Kälberserum
FAD	Familial Alzheimer's disease
FALS	Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis
Fas	Todes-Rezeptor-Proteine

FasL	Todesrezeptorligand
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
HP903	Biotin-markierter monoklonaler Anti-Proteasom-Antikörper
HLA	Human Leucocyte Antigen
Hsp 72	Hitzeschockprotein
IFN- γ	Interferon-gamma
I κ B	Inhibitorprotein des Transskriptionsfaktor NF- κ B
IL-1	Interleukin-1
iNOS	inducible nitric oxid synthase
LMP2 LMP7	Latente Membranprotein 2 und 7
MHC-I	Major Histocompatibility Complex I
MECL-1	Multikatalytischer Endopeptidasekomplex-1
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein

MBP	Basische Myelinprotein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MFS	Miller-Fisher-Syndrom
MG-132	synthetisch hergestellten Peptidaldehyde
NF- κ B	Transkriptionsfaktor
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
NFT	Neurofibrillary Tangles
PA 700/ PA 28	Proteinaktivatoren
P 53	Vertreter der Tumorsuppressorgene
PP-MS	Primär progredienten Form der MultiplenSklerose
PLP	Proteolipidprotein
PMA	Progressive spinale Muskelatrophie
PBP	Pseudobulbärparalyse

PLS	Primäre Laterasklerose
PS1	Presinilin 1
PS2	Presinilin 2
PM	Polymyositis
pSS	Primäres Sjögren Syndrom
PBS/Tween	Phosphat gepuffte Kochsalzlösung
PSI	synthetisch hergestelltes Peptidaldehyd
RR-MS	schubförmig-remittierend verlaufende Multiple Sklerose-Form
RA	Rheumatoide Arthritis
smac	second mitochondria-derived activator of caspase
SP-MS	sekundär progredient verlaufende Multiple Sklerose-Form
SOD1	Cu/Zn-Superoxid-Dismutase
SDAT	senile Demenz vom Alzheimer-Typ

SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
TMB	Tetramethylbenzidin
TGF-beta	Tumor-growth-factor-beta
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

E Danksagung

An dieser Stelle möchte ich ausdrücklich Herrn Prof. Dr. Lutz Harms meinen besonderen Dank für die Ermöglichung dieser Arbeit und umfassende Betreuung aussprechen. Seine ständige Bereitschaft zu jeglicher Unterstützung, konstruktive Kritiken zu verschiedenen Gesichtspunkten der Arbeit, sein aufmerksames Durchlesen des Manuskriptes sowie die außerordentliche Geduld bedürfen dabei besonderer Erwähnung.

In aller Form bedanke ich mich bei Herr Dr. Dr. Karl Egerer und seinem Team der Medizinischen Klinik mit SP Rheumatologie und Klinischer Immunologie der Charité für die umfangreiche, professionelle wissenschaftliche Unterstützung im Zusammenhang mit den biochemischen Analysen, der statistischen und interdisziplinären Beratung auf hoch engagiertem Niveau.

Mein besonderer Dank gilt des weiteren Herrn PD Dr. Klaus-Peter Wandinger und Dr. Nicola Amberger für ihren wissenschaftlichen Beistand, ihre Betreuung und Rat, den ich als großes Privileg empfand.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Tanja Schink (Biomathematisches Institut der Charité) für ihre professionelle Unterstützung und Beratung zur statistischen Auswertung der Daten.

Abschließend gilt mein Dank den Kollegen und Kolleginnen des Liquorlabors und des Sekretariats der Klinik für Neurologie der Charité für ihre allseits hilfsbereite, unbürokratische und offene Zusammenarbeit.

Und schließlich bedanke ich mich hiermit in aller Form bei meiner Familie, meinen Freunden für ihre Geduld und ihren Zuspruch, ganz besonders jedoch bei Frank Lietz, Frank Fischer, Christian und Christoph für ihre erhebliche Unterstützung!

F

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Posterpräsentation

80. Kongreß der Dt. Gesellschaft für Neurologie (DGN)

12.09.2008

„Proteasom und Anti-Proteasom-Antikörper im Liquor bei MS“

P. Franke, K. Egerer, K.-P. Wandinger, L. Harms (Leipzig, Berlin)

Berlin, den

G Eidesstattliche Erklärung

hiermit erkläre ich an Eides statt, daß die hier vorliegende Arbeit von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die verwendeten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den

dissertation.de

<http://www.dissertation.de>