

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Proteasomale Autoantikörper in der
Dilatativen Kardiomyopathie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Bartel

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Stangl
2. Prof. Dr. med. S. Felix
3. Prof. Dr. rer. nat. E. Krüger

Datum der Promotion: 05.06.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)	6
1.1.1	Definition der dilatativen Kardiomyopathie (DCM).....	6
1.1.2	Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)	7
1.1.3	Autoantikörper in der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)	8
1.1.4	Immunadsorption (IA) bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)	9
1.2	Autoantikörper bei den rheumatischen Erkrankungen.....	10
1.3	Das Proteasom.....	10
1.3.1	Aufbau des Proteasoms	11
1.3.2	Funktionen des Proteasoms.....	12
1.3.3	Das Immunoproteasom	12
1.3.4	Das kardiale Proteasom.....	13
1.4	Proteasomale Autoantikörper.....	13
2	Herleitung der Aufgabenstellung	15
3	Material und Methoden.....	16
3.1	Material und Patienten	16
3.1.1	Patientenkollektiv	16
3.1.2	Geräte	17
3.1.3	Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien.....	17
3.1.4	Kits	18
3.1.5	Antikörper.....	19
3.2	Methoden	19
3.2.1	Proteinbiochemische Methoden	19
3.2.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	19
3.2.1.2	Ethanolausfällung von Proteinen	19
3.2.1.3	Isolation von 20S Proteasom	20
3.2.1.4	Eindimensionale SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).	21
3.2.1.5	Zweidimensionale SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (2D SDS- PAGE).....	22
3.2.1.6	Anfärben der SDS-Gele	23
3.2.1.7	Elektrotransfer von Proteinen nach der SDS- PAGE auf Immobilon- Membran.....	23
3.2.1.8	Identifizierung von Antikörpern mittels Immunodetektion.....	24
3.2.1.9	Strippen gebundener Antikörper von Immobilon-Membranen.....	25
3.2.1.10	Identifikation der Untereinheiten des 20S Proteasoms durch Massen- spektroskopie.....	26
3.2.1.11	Bestimmung von proteasomalen Autoantikörpern (PA) durch einen ELISA.....	27
3.2.1.12	Bestimmung der Nt-pro BNP-Konzentration	28
3.2.1.13	Bestimmung der Immunoglobulin-Konzentration	28
3.2.2	Statistik	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Detektion Proteasomaler Autoantikörper mittels ELISA	29
4.2	Eigenschaften der proteasomalen Autoantikörper	30
4.2.1	Untersuchung der im ELISA PA-positiven Patientenseren im Westernblot..	30

4.2.2	Detektion der von proteasomalen Autoantikörpern (PA) präferentiell erkannten Untereinheiten	32
4.2.3	Zuordnung der proteasomalen Autoantikörper (PA) zu den Immunglobulin- (IgG-) Subklassen	34
4.3	Zusammenhang zwischen proteasomalen Autoantikörpern (PA) und kardialen Funktionsparametern sowie den Endomyokardbiopsie- (EMB-) Befunden	37
4.3.1	Nt-pro BNP im Zusammenhang mit den proteasomalen Autoantikörpern (PA)	37
4.3.2	Zusammenhang zwischen linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) sowie linksventrikulärem enddiastolischem Durchmesser (LVEDD) und den proteasomalen Autoantikörpern (PA)	38
4.3.3	Detektion von viralem Genom in den Endomyokardbiopsien (EMB)	39
4.4	Immunadsorption (IA) bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)	41
4.4.1	Elimination der proteasomalen Autoantikörper (PA) durch die Immunadsorption (IA)	41
4.4.2	Verbesserung der kardialen Funktion nach der Immunadsorption (IA)	46
5	Diskussion	50
5.1	Erhöhte Prävalenz der proteasomalen Autoantikörper (PA) bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)	50
5.2	Einordnung der proteasomalen Autoantikörper (PA) in den klinischen Kontext ..	52
5.2.1	Produktion von proteasomalen Autoantikörpern durch eine virale Myokarditis	52
5.2.2	Pathogenität der proteasomalen Autoantikörper (PA)	54
5.2.3	Verwendung proteasomaler Autoantikörper (PA) als diagnostische oder prognostische Parameter	58
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis	62
8	Anhänge	70
8.1	Publikationsliste	70
8.2	Danksagung	71
8.3	Lebenslauf	72
8.4	Erklärung	73

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DM	Dermatomyositis
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EMB	Endomyokardbiopsie
ESC	European Society of Cardiology
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IA	Immunadsorption
IgG	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
Δ LVEF _{3Mon.}	LVEF 3 Monate nach der IA – LVEF vor der IA
Δ LVEF _{6Mon.}	LVEF 6 Monate nach der IA – LVEF vor der IA
Mon.	Monat
NEPHGE	Non equilibrium pH gradient electrophoresis (pH-Gradienten-Elektrophorese)
n.s.	nicht signifikant
PA	Proteasomale Autoantikörper
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PM	Polymyositis
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate (=Natriumdodecylsulfat) -Polyacrylamidgelelektrophorese
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
U	Units

1 Einleitung

1.1 Die dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Die DCM ist eine Erkrankung des Herzmuskels, deren Prävalenz auf 1:2.500 geschätzt wird. Die Prognose ist schlecht: Die DCM ist der dritthäufigste Grund für eine Herzinsuffizienz und der häufigste Grund für eine Herztransplantation (¹).

1.1.1 Definition der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)

Die Kardiomyopathien wurden seit 1995 nach dem Report der *World Health Organisation (WHO)* klassifiziert und definiert (²). 2006 wurde diese Definition in dem Bericht der *American Heart Association* reformiert (¹). Eine erneute Aktualisierung erfolgte in dem Report der *European Society of Cardiology (ESC)* von 2008, auf den sich diese Arbeit bezieht (³).

Die ESC definierte die Kardiomyopathie in dem genannten Report als eine myokardiale Störung mit struktureller und funktionaler Schädigung des Herzens bei Abwesenheit von koronarer Herzkrankheit, arterieller Hypertonie, Herzklappenerkrankungen oder angeborenen Herzfehlern in einem Ausmaß, das die Schädigung bedingen könnte. Die Unterscheidung zwischen primärer Kardiomyopathie (das Herz ist das einzige oder vorwiegend betroffene Organ) und sekundärer Kardiomyopathie (kardiale Beteiligung ist nur Teil der systemischen Erkrankung) wurde in dieser neuen Klassifikation aufgegeben, da sowohl viele als „primär“ klassifizierte Kardiomyopathien mit bedeutenden extra-kardialen Manifestationen einhergehen können, als auch viele als „sekundär“ deklarierte Kardiomyopathien vorwiegend das Herz betreffen können (³).

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch Dilatation und linksventrikuläre systolische Dysfunktion bei Fehlen von pathologischen Füllungsbedingungen (Hypertension, Klappenerkrankungen) oder koronarer Herzkrankheit charakterisiert. Eine Beteiligung des rechten Ventrikels ist möglich, jedoch nicht notwendig für die Diagnose (³).

1.1.2 Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)

Die Einteilung der DCM erfolgt gemäß der ESC nach der Ätiologie in die familiäre (hereditäre) und nicht-familiäre Form ⁽³⁾. Die Ätiopathogenese der nicht-familiären DCM ist vielfältig, z.B. können toxische, endokrine, virale oder autoimmune Prozesse, gegebenenfalls in Kombination, beteiligt sein ^(3;4). Es wird vermutet, dass insbesondere die virale Myokarditis eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der DCM spielt. ^(5;6).

Die mögliche Entwicklung einer DCM aus einer viralen Myokarditis ist Gegenstand vieler Studien. Es konnte bei 67,4% der Endomyokardbiopsien eines Patientenkollektives mit DCM virales Genom mittels PCR detektiert werden, wobei die häufigsten Viren Parvovirus B19 waren, gefolgt vom humanen Herpes Virus 6. In keiner der Endomyokardbiopsien wurde jedoch eine Myokarditis entsprechend der Dallas-Kriterien diagnostiziert ⁽⁷⁾. In einer anderen Studie wurde in 19 von 74 Endomyokardbiopsien von Patienten mit Herzinsuffizienz unklarer Genese und dilatierten Herzhöhlen eine Myokarditis nachgewiesen ⁽⁸⁾. Die Prävalenz einer Myokarditis bei der DCM wird in der Literatur insgesamt sehr unterschiedlich angegeben, was unter anderem auf abweichende Beurteilungen der Proben durch verschiedene Untersucher zurückgeführt wird ⁽⁹⁾.

Die hohe Prävalenz von viralem Genom in den Endomyokardbiopsien ⁽⁷⁾ weist darauf hin, dass eine virale Infektion des Myokards oder die virale Persistenz nach Abheilung der akuten Myokarditis, eventuell auch in Kombination, an der Pathogenese der DCM beteiligt sein könnten.

Während der akuten Infektion scheint das Herz über 2 Mechanismen geschädigt zu werden: Zum einen über die cytotoxischen Effekte der Viren selbst, zum anderen über die Virus-induzierte Immunantwort. Diese Immunantwort richtet sich in erster Linie gegen das Virus und damit auch gegen die Kardiomyozyten, die als Wirtszellen dienen und abgetötet werden, wodurch ein beträchtlicher myokardialer Schaden entsteht. Die Immunantwort richtet sich aber auch gegen primär intrazelluläre Zellbestandteile, die im Zuge der Infektion aus lysierten Kardiomyozyten freigesetzt werden und eine Autoimmunität auslösen können ^(10;11). Weiterhin wurden auch Antikörper beschrieben,

die sowohl an Proteine der Myozyten als auch an virale Epitope binden (molekulare Mimikry) ^(12;13).

Wird das Virus im Laufe der akuten Infektion nicht eliminiert, kann es zur Viruspersistenz kommen, bei der virale DNA oder RNA nachgewiesen wird, jedoch keine Myokardinfektion vorliegt ⁽¹⁴⁾. Es konnte gezeigt werden, dass diese Persistenz kardiotoxischer Viren bei Patienten mit (vorwiegend) abgelaufener Myokarditis bzw. DCM im Verlauf mit einer Verschlechterung der kardialen Funktion assoziiert ist ^(15;16). Die Myokardschädigung, die häufig von einer nur geringen Menge persistierender Viren verursacht wird, wird vermutlich durch Vorgänge wie eine vermehrte Zytokinexpression im Herzgewebe ⁽¹⁷⁾ sowie eine systemische Erhöhung der Zytokinspiegel ⁽¹⁸⁾, eine lokale chronische Entzündungsreaktion ⁽¹⁹⁾, eine Modulation der zellulären Signalkaskaden ⁽²⁰⁾ oder eine fortlaufende Triggerung der Antikörperproduktion bewirkt. Aber auch nach erfolgreicher Viruselimination kann die Erkrankung weiterhin progredient verlaufen, z.B. durch eine initial entstandene, irreversible Schädigung des Myokards, die langsam voranschreitet, oder durch eine fortbestehende antikardiale Autoimmunaktivität des Organismus ⁽⁵⁻⁷⁾. Die kontinuierliche Schädigung des Myokards könnte auf diese Weise nach der akuten Infektion sowohl bei Viruspersistenz als auch nach einer Viruseliminierung zu einer DCM führen.

1.1.3 Autoantikörper in der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)

Die Immunantwort im Laufe einer Infektion oder im Rahmen einer Kardiomyozytenschädigung anderer Ursache richtet sich, wie oben beschrieben, wahrscheinlich auch gegen die freigesetzten körpereigenen Zellbestandteile. In vielen Studien wurde hierbei die besondere Rolle der humoralen Autoimmunität bei der DCM betont. Es wurden Autoantikörper gegen verschiedene Zellproteine identifiziert, z.B. die schwere Kette des Myosins ⁽²¹⁾, den β -Adrenorezeptor ⁽²²⁾, den M₂-Subtyp des muscarinergen Acetylcholinrezeptors ⁽²³⁾ und den ADP-ATP Carrier ⁽²⁴⁾. Die Bedeutung der Autoantikörper bei der DCM ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass einige Autoantikörper zur Pathogenese der DCM beitragen, andere können auch lediglich als Epiphenomen auftreten.

Eine mögliche pathogenetische Relevanz konnte in vielen Studien durch Erforschung der Eigenschaften der Antikörper in vitro und in vivo bestärkt werden. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Antikörper gegen den β 1-Adrenorezeptor, die aus Seren von Patienten mit DCM mittels Affinitäts-Reinigung gewonnen wurden, positiv chronotrop auf isolierte Rattenkardiomyozyten wirken ⁽²⁵⁾. In einer anderen Studie wurden Kaninchen mit Peptiden, die in ihrer Sequenz einem Epitop des β 1-Adrenorezeptors entsprachen, immunisiert. Danach wurden Antikörper gegen diese Peptide in den Kaninchenserum sowie morphologische Veränderungen der Kaninchenherzen ähnlich der humanen DCM nachgewiesen ⁽²⁶⁾. In einem ähnlichen, jedoch erweiterten Experiment wurde ein eindrucksvoller Hinweis auf die Pathogenität der anti- β 1 Autoantikörper geliefert: Die Antikörper, die von Ratten nach deren Immunisierung mit β 1-Adrenorezeptor-Epitopen gebildet worden sind, wurden gesunden Ratten injiziert. Die so behandelten Tiere entwickelten daraufhin einen ähnlichen kardiomyopathischen Phänotyp wie die ursprünglich immunisierten Ratten ⁽²⁷⁾.

Nach Witebsky kann eine Autoimmunkrankheit u.a. als solche definiert werden, wenn ein Äquivalent der Erkrankung im Tiermodell durch den Transfer von Autoantikörpern oder Antigenen initiiert werden kann ⁽²⁸⁾. Da beide genannten Beweise für die DCM erbracht wurden ^(26;27), kann diese als Autoimmunkrankheit gewertet werden.

1.1.4 Immunadsorption (IA) bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)

Weitere Hinweise auf die Relevanz der Autoantikörper liefern die Ergebnisse vieler Studien, die sich mit der Immunadsorption (IA) befassen. Diese Plasmapherese eliminiert effektiv Immunglobuline aus dem Blut ⁽²⁹⁾. Die Besserung der kardiovaskulären Funktion der Patienten nach erfolgter IA weist auf den Beitrag der Autoantikörper zur kardialen Dysfunktion hin ^(30;31). Eine weitere Bestätigung dieser Hypothese wurde durch eine Studie mit DCM-Patienten erbracht, in der die Eigenschaften isolierter Antikörper mit der Effektivität der IA bei den einzelnen Patienten verglichen wurden. Die aus Serumproben gewonnenen Antikörper wurden mit isolierten Rattenkardiomyozyten inkubiert, anschließend wurde bei den Patienten eine IA durchgeführt. Hier profitierten nur die Patienten von der IA, deren Antikörper einen depressiven Effekt auf die isolierten Myozyten hatten ⁽³²⁾. In einer weiteren Studie korrelierte der kardiodepressive Effekt auf isolierte Rattenkardiomyozyten von

Antikörpern, die bei der IA eliminiert wurden, mit der frühen hämodynamischen Verbesserung der Patienten ⁽³³⁾. Somit scheint die Elimination der Autoantikörper aus dem Blut für den Erfolg der IA zumindest teilweise verantwortlich zu sein.

Im Rahmen der Studien über die IA wurde weiterhin ein Zusammenhang zwischen der effektiven Elimination der Immunglobuline der Klasse 3 aus dem Blut und der kardialen hämodynamischen Verbesserung durch die IA gezeigt. Es wurde geschlossen, dass die IgG₃-Fraktion der Autoantikörper einen besonderen Einfluss auf die kardiale Schädigung bei der DCM haben könnte ^(34;35).

1.2 Autoantikörper bei den rheumatischen Erkrankungen

Bei den meisten rheumatischen Erkrankungen findet charakteristischerweise eine humorale Immunantwort statt, bei der Antikörper, die gegen verschiedene intrazelluläre Antigene gerichtet sind, gebildet werden. Zu diesen Erkrankungen zählen z.B. die Systemische Sklerose, der systemische Lupus erythematodes (SLE), das Sjögren-Syndrom, das SHARP-Syndrom und die Polymyositis (PM) / Dermatomyositis (DM) ^(36;37). Einige Autoantikörper, z.B. Antikörper gegen doppelsträngige DNS (Anti-dsDNS-AK), antinukleäre Antikörper (ANA) und Rheumafaktoren (RF), stellen bei diesen Krankheiten etablierte diagnostische Parameter dar ⁽³⁸⁾.

1991 wurde erstmals von Arribas et al. ein vermehrtes Auftreten von Antikörpern gegen das Proteasom (Proteasomale Autoantikörper, PA) bei SLE entdeckt ⁽³⁹⁾.

1.3 Das Proteasom

Das Proteasom ist ein vorwiegend zytosolisch-lokalisierter, extra-lysosomaler proteolytischer Komplex, der für den Großteil der Proteindegradation verantwortlich und maßgeblich an der Entstehung der Mehrheit der MHC-I gebundenen Peptide beteiligt ist ⁽⁴⁰⁻⁴⁴⁾. Es kommt im Zytoplasma und dem Zellkern von allen eukaryoten Zellen vor und macht ca. 1% der gesamten Zellproteine aus ⁽⁴⁵⁾.

1.3.1 Aufbau des Proteasoms

Das 20S Proteasom setzt sich aus 4 übereinander gestapelten Ringen zusammen, so dass ein fassförmiger Komplex entsteht. Die Ringe werden von jeweils 7 Untereinheiten gebildet, wobei die beiden äußeren Ringe aus α - ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) und die beiden inneren Ringe aus β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 7$) bestehen⁽⁴⁶⁾ (s. Abb.1). Im Zentrum des Zylinders wird eine Kammer gebildet, in der die katalytischen Prozesse ablaufen. Die α -Untereinheiten regulieren den Ein- und Austritt der Substrate. Indem die N-Termini der α -Untereinheiten in den Eingang zur katalytischen Kammer ragen, versperren sie diese und ermöglichen jeglichen Zugang erst nach deren substantieller Umlagerung⁽⁴⁶⁾. Die Untereinheit $\alpha 3$ (=C9) scheint dabei eine besondere Rolle zu spielen, da die Deletion des in den Eingang ragenden und jede andere UE berührenden Endes dieser Untereinheit eine Öffnung zur katalytischen Kammer und damit eine starke Erhöhung der katalytischen Aktivität des Proteasoms bewirkt⁽⁴⁷⁾. Die beiden inneren β -Ringe tragen mit den Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ die katalytischen Zentren des Proteasoms.



Abb. 1: Aufbau des 20S Proteasoms. Das 20S Proteasom setzt sich aus jeweils 2 α - und zwei β -Ringen zu einem zylinderförmigen Komplex zusammen. Im Zentrum des Zylinders befindet sich das katalytische Zentrum, welches von den Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ gebildet wird und somit vom Zytosol abgeschirmt ist. Abb. nach Rechsteiner, 2005⁽⁴⁸⁾.

Das 26S Proteasom setzt sich aus dem 20S Proteasom und zwei regulatorischen Komplexen, 19S Regulatoren genannt, zusammen. Die beiden 19S Regulatoren assoziieren mit den α -Ringen und bedecken somit beide Seiten des 20S Proteasoms.

Sie sind für die Aktivierung des 20S Proteasoms, das Entfalten der zu degradierenden Proteine und die Spezifität der Proteolyse verantwortlich (^{41;47}). Ebenfalls an die α -Ringe bindet der Proteasom-Aktivator PA28. Dieser Komplex steigert den Substratumsatz des Proteasoms durch Erleichterung des Substratein- und -austritts (⁴⁹).

1.3.2 Funktionen des Proteasoms

Die Proteindegradation in eukaryoten Zellen erfolgt zum Großteil durch das Proteasom, wobei die Mehrzahl der Proteine vor der Einschleusung durch eine Polyubiquitin-Kette markiert wird. Das Proteasom baut beschädigte oder fehlgefaltete Proteine ebenso ab wie wichtige regulatorische Proteine (z.B. Cycline) (^{40;50}). Des Weiteren aktiviert das Proteasom einen Teil der Transkriptionsfaktoren, z.B. NF κ B, über deren Generation aus den jeweiligen Vorläuferproteinen (⁵¹). Das Proteasom ist somit an vielfältigen zellulären Vorgängen wie der Proteinhomeostase, dem Zellzyklus, dem Zellwachstum und der Apoptose regulierend beteiligt (^{40;43;52}). Die große Mehrheit der Peptide, die als Liganden für den MHC-I Rezeptor dienen, wird ebenfalls durch das Proteasom generiert, so dass es außerdem eine wichtige Rolle im Immunsystem einnimmt (^{41;43;53}).

1.3.3 Das Immunoproteasom

Die enge Verbindung des Proteasoms mit der Immunabwehr wird bei Betrachtung des so genannten Immunoproteasoms besonders deutlich. Interferon γ induziert den Einbau der Immununtereinheiten β 1i (Lmp2), β 2i (MECL-1) und β 5i (Lmp7) anstatt der Untereinheiten β 1 (Y), β 2 (Z) und β 5 (X), so dass das Immunoproteasom entsteht (⁵⁴⁻⁵⁶). Da dieser Austausch die katalytisch aktiven Untereinheiten betrifft, kann dadurch der funktionelle Unterschied zwischen den beiden Formen dieser Protease erklärt werden. Das Immunoproteasom generiert mehr Liganden für den MHC-I Komplex als das konstitutive Proteasom (⁵⁷).

Das Immunoproteasom wurde in Zellen aus primären und sekundären lymphatischen Organen nachgewiesen, wie dem Thymus, der Milz und Lymphknoten (^{58;59}). Das konstitutive Proteasom wird aber auch z.B. während der akuten Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes* in der Leber innerhalb von 7 Tagen fast vollständig durch das Immunoproteasom ersetzt (⁶⁰).

1.3.4 Das kardiale Proteasom

Neben der schon seit längerem bekannten wichtigen Funktion des Proteasoms im Immunsystem wurde dessen umfangreiche Beteiligung an der Aufrechterhaltung der kardialen Funktion und deren Pathologie in den letzten Jahren zunehmend eminent (⁶¹⁻⁶⁴). Zellen wie Kardiomyozyten sind starken mechanischen Kräften ausgesetzt und daher besonders anfällig für Proteinschäden (⁶⁵). Da defekte Proteine apoptotische Reaktionskaskaden auslösen und durch Aggregation die Zellen stark schädigen können, müssen diese in den Kardiomyozyten schnell und effizient abgebaut werden, um die kontraktile Funktion der Zellen weiterhin zu gewährleisten (⁶⁵). Da die Proteindegradation vorrangig über das Ubiquitin-Proteasom-System abläuft, hat das Proteasom eine zentrale Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Funktion der Kardiomyozyten und somit der Herzfunktion insgesamt. Es bleiben jedoch noch viele Fragen bezüglich der genauen Zusammenhänge ungeklärt. So konnte z.B. gezeigt werden, dass nach myokardialer Ischämie die kardiale kontraktile Funktion durch Hemmung des Proteasoms verbessert werden kann (^{66;67}). Diese Beobachtung widerspricht der bekannten kardioprotektiven Funktion des Proteasoms, so dass weitere Studien nötig sind, um die pathophysiologischen Zusammenhänge besser erklären zu können.

1.4 Proteasomale Autoantikörper

Die oben beschriebene Entdeckung von Autoantikörpern gegen das Proteasom ist u.a. deshalb besonders interessant, da hier Antikörper gegen einen Zellbestandteil gebildet werden, der sehr eng an die Präsentation von MHC-I gebundenen Peptiden gekoppelt ist. Damit ist das Proteasom eng mit der Unterscheidung körpereigen - körperfremd verbunden, welche grundsätzlich die Bildung von Autoantikörpern verhindern sollte.

Nach der Entdeckung proteasomaler Autoantikörper (PA) bei 35% eines Patientenkollektivs mit SLE von Arribas et al. 1991 (³⁹) standen diese Antikörper im Zentrum vieler Studien und konnten bei weiteren Autoimmunerkrankheiten nachgewiesen werden. Feist et al. bestätigten das Vorkommen von PA bei SLE mit einer Prävalenz von 58% in ihrem Patientenkollektiv und entdeckten zusätzlich PA bei 63% der von ihnen untersuchten Patienten mit Dermatomyositis (DM) und bei 62% der Patienten mit Polymyositis (PM). Die genauere Untersuchung der PA im Westernblot nach

zweidimensionaler SDS-PAGE zeigte, dass die Mehrzahl der PA aus den Patientenseren gegen die proteasomale Untereinheit $\alpha 3$ (C9) gerichtet war ⁽⁶⁸⁾. In einer weiteren Studie wurden PA bei 39% von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom detektiert. Auffällig war hier, dass die PA an verschiedene α - und β - Untereinheiten banden ⁽⁶⁹⁾.

Weitere Erkrankungen, bei denen PA nachgewiesen wurden, sind das Ovarialkarzinom ⁽⁷⁰⁾, die Multiple Sklerose ^(70;71), die Psoriasis-Arthritis ⁽⁷²⁾, der Diabetes mellitus ⁽⁷³⁾ und die paraneoplastische cerebelläre Degeneration ⁽⁷⁴⁾.

Die Bedeutung der PA ist noch weitestgehend ungeklärt. Bei SLE und autoimmuner Myositis (DM und PM) wurde ein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und dem Titer der PA beschrieben ⁽⁷⁵⁾. Dies eröffnet die Möglichkeit, PA als diagnostische Marker zu nutzen, trifft jedoch keine Aussage darüber, ob die PA ein Epiphenomen der Erkrankungen darstellen oder gegebenenfalls pathogen sind. Einen ersten Hinweis auf die Funktionalität der PA erbrachte eine Studie von Brychcy et al., bei welcher der Einfluss von PA auf die katalytische Aktivität des Proteasoms untersucht wurde. Es wurde gezeigt, dass die PA zwar die proteolytische Aktivität des 20S Proteasoms selbst nicht veränderten, jedoch die Steigerung des Substratumsatzes durch den Proteasom-Aktivator PA28 effektiv hemmten ⁽⁷⁶⁾. Nach diesem viel versprechenden Einstieg in die Erforschung einer möglichen funktionalen Bedeutung der PA sind weiterführende Studien notwendig.

2 Herleitung der Aufgabenstellung

Neben anderen möglichen Ätiopathogenesen ist die Theorie der Entstehung einer DCM über ein autoimmunes Geschehen in der Literatur etabliert, so dass eine Zuordnung der DCM zu den Autoimmunkrankheiten möglich ist. Da bei diversen anderen Autoimmunkrankheiten erhöhte Titer von PA gefunden wurden, sollte in dieser Arbeit geprüft werden, ob diese auch bei der DCM gebildet werden. Ein weiterer Zusammenhang besteht darin, dass die Erkrankungen, bei denen erhöhte PA-Titer nachgewiesen wurden, großteils den systemisch-entzündlichen Erkrankungen (systemic inflammatory diseases, SID) zuzuordnen sind. Diesen ist eine häufige kardiale Beteiligung gemein, die sich u.a. als Myokarditis oder Kardiomyopathie manifestieren kann (⁷⁷). Eine Verbindung zwischen der DCM und PA ist demnach möglich.

Um diese Verbindung zu prüfen, wurde das Vorkommen von PA in einem Kollektiv von 90 DCM-Patienten und 90 gesunden Kontrollprobanden untersucht. Zur besseren Einordnung der Rolle der PA sollten deren proteinbiochemische Eigenschaften, z.B. in Bezug auf die präferentiell erkannte Untereinheit des 20S Proteasoms, untersucht werden. Da sich diese Untereinheiten bezüglich ihres molekularen Gewichts und isoelektrischen Punkts unterscheiden, bietet sich die Verwendung von ein- und zweidimensionalen SDS-PAGEs mit anschließender Immunodetektion an.

In der Literatur finden sich Hinweise auf einen pathogenetischen Beitrag von Autoantikörpern an der Initiation oder Aufrechterhaltung der DCM. Um Hinweise auf die Entstehung der PA und deren Bedeutung bei der DCM zu erhalten, sollte das Auftreten der PA im Zusammenhang mit klinischen Parametern zur Beurteilung der kardialen Funktion und den Ergebnissen von Endomyokardbiopsien betrachtet werden.

Die 90 in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden einer Immunadsorptions- (IA) Therapie unterzogen, so dass der Einfluss der IA auf die PA und die klinischen Parameter der Patienten untersucht werden konnte. Außerdem sollte analysiert werden, ob sich der PA-Titer als prädiktiver Wert dazu eignet, den Benefit von einer IA für den Patienten im Voraus abzuschätzen, um dieses Therapieverfahren gezielter einsetzen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Patienten

3.1.1 Patientenkollektiv

In die Studie wurden 90 Patienten der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) von 2003 bis 2007 fortlaufend aufgenommen. Ausgeschlossen wurden Patienten, die jünger als 30 Jahre alt waren, an Infektionskrankheiten, Tumorerkrankungen, chronischem Alkoholabusus oder Herzinsuffizienz anderer bekannter Ursache litten. Alle Patienten zeigten echokardiographisch eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion (linksventrikuläre Ejektionsfraktion $\leq 45\%$) und eine Herzinsuffizienz (NYHA II-IV) bei einer Krankheitsdauer über 6 Monate. Eine koronare Herzkrankheit wurde bei allen Patienten mittels Koronarangiographie, ebenso wie eine akute Myokarditis bei 78 der 90 durch Endomyokardbiopsie (EMB) entsprechend den Dallas-Kriterien (⁷⁸) ausgeschlossen. 12 Patienten lehnten eine EMB ab. Alle Patienten waren seit mindestens drei Monaten kontinuierlich mit ACE-Hemmern / Angiotensin Rezeptor Antagonisten, β -Blockern und Diuretika eingestellt.

Alle Patienten wurden in der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald mit einer Immunadsorption (IA) behandelt, die nach dem verbesserten Protokoll für die IgG₃-Eliminierung mit Protein A-Säulen (Immunoadsorba[®], Fresenius Medical care AG, Bad Homburg) über 5 konsekutive Tage durchgeführt wurde [Protokoll nach (³⁵)]. Am letzten Tag wurden Immunglobuline mit 0,5g/kg polyklonalem IgG (Venimmun N[®], Sandoglobulin[®]) substituiert. Von allen Patienten standen Serumproben vom Tag vor der IA, direkt nach der IA und nach drei sowie sechs Monaten zur Verfügung.

Des Weiteren lagen von allen Patienten die Daten von Echokardiographien (Vivid 5, GE Healthcare, UK) vor, die von Kollegen der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald vor der Behandlung sowie drei und sechs Monate nach der Therapie durchgeführt wurden. Zusätzlich wurden bei 78 der 90 Patienten Endomyokardbiopsien (EMB) entnommen, bei denen nach Mahrholdt et al., 2006 (⁷⁹) die Existenz von viralem Genom untersucht wurde.

Als Kontrollgruppe dienten 90 Blutspender. Die Proben sowie die Daten zu Geschlecht und Alter wurden uns freundlicherweise von der Blutspende des Institutes für Transfusionsmedizin, Campus Charité Mitte, zur Verfügung gestellt.

Jeder Patient stimmte der Teilnahme an der Studie schriftlich zu. Das Studienprotokoll erfüllte die ethischen Grundsätze der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethik-Kommission der Universität Greifswald bewilligt.

3.1.2 Geräte

ÄKTA FPLC	GE Healthcare
Deca-Probe incubation manifold PR 150	Hoefer
Elektrophorese-Einheit SE 250 Series Mighty Small II	Hoefer
Fluorimeter Synergy HT mit KC4 Software	BioTek
Kühlzentrifuge 3K10	Sigma
Kühlzentrifuge Avanti J-25, Rotor JA25.5	Beckman-Coulter
Kühlzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Kühlzentrifuge GS-6R	Beckman-Coulter
MALDI TOF/TOF Proteomics Analyser	Applied Biosystems
Mikrokonzentrator 5301	Eppendorf
MonoQ-Säule	GE-Healthcare
Semidry-Blot-Kammer	pEQLAB
Spectrophotometer Ultrospec™ 2100 <i>pro</i> UV/Visible	GE-Healthcare
Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K	GE-Healthcare

3.1.3 Reagenzien, Lösungen, Verbrauchsmaterialien

3MM Papier	Whatman
Acetonitril	Merck
Acrylamid 4K-Lösung 30 %, 37,5:1	Appllichem
Ampholine	Serva
β-Mercaptoethanol	Roth
DEAE Sephacel™	GE-Healthcare
DMSO	Appllichem

DTT	Applichem
Fluorogenes Peptid-substrat "Tyr": Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC	Bachem Biochemica
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore
Luminol	Fluka
MALDI Proben Platten	Applied Biosystems
Mikrotiterplatten	Dynatec
Molekulargewichtsstandard, Protein prestained	Fermentas
Molekulargewichtsstandard, Protein Rainbow	Amersham
NP40 (Nonidet)	Applichem
p-Coumaric acid	Sigma
PMSF	Roth
Protein A Sepharose CL-4B	GE-Healthcare
Röntgenfilme: Xomat-UV/AR/Biomax-MR	Kodak
Roti Block	Roth
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Roth
Sterilfilter 4,5, 0,2 µm	Schleicher und Schuell
TEMED	Applichem
Tetramethylbenzidin	Becton Dickinson
Trifluoressigsäure	Fluka
Trypsin	Promega
Tween 20	Serva
Zellkultur-Platten, 96Well	Greiner
Zip Tip Pipettenspitzen, C18	Millipore

3.1.4 Kits

BCA™ Protein Assay Kit Pierce Protein Research Products

BNP Fragment ELISA Kit Biomedica

3.1.5 Antikörper

Sekundäre Antikörper, Peroxidase-markiert:

AffiniPure Goat anti Human-IgG IgG (1:20.000)	Dianova
Mouse anti Human-IgG ₁ IgG (1:500)	Zymed [®] Laboratories
Mouse anti Human-IgG ₂ IgG (1:500)	Zymed [®] Laboratories
Mouse anti Human-IgG ₃ IgG (1:500)	Zymed [®] Laboratories
Mouse anti Human-IgG ₄ IgG (1:500)	Zymed [®] Laboratories
Proteasomen-AK	AG Prof. Kloetzel, Charité

3.2 Methoden

3.2.1 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA[™] Protein Assay Kit (Pierce) verwendet.

Alternativ wurde die Extinktion bei 280 nm im Spectrophotometer bestimmt. Die Extinktion von 1 wurde dabei 1 mg/ml gleichgesetzt.

3.2.1.2 Ethanolausfällung von Proteinen

Lösungen:

96% Ethanol, 70% Ethanol

Durchführung:

Die Proteinlösungen bekannter Konzentration wurden nach gewünschter Proteinmenge in Reaktionsgefäße einpipettiert. Es wurde jeweils das 2,5fache Volumen 96%iges Ethanol hinzugefügt. Nach Mischung der Proben wurden sie 30min bei -80°C tiefgefroren. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation bei 14.000rpm und 4°C. Das entstandene Pellet wurde mit 1ml eiskaltem 70%igem Ethanol und 10minütiger Zentrifugation bei 14.000rpm und 4°C gewaschen. Der Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Nach Abkippen des 70%igen Ethanols wurde das Protein in dem Reaktionsgefäß mit offenem Deckel bei 37°C getrocknet und dann bei -80°C gelagert.

3.2.1.3 Isolation von 20S Proteasom

Lösungen:

10x PBS:	1,4M NaCl, 27mM KCl, 65mM Na ₂ HPO ₄ , 15mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3
10 x TEA:	200mM Tris HCl, 10mM EDTA, 10mM NaN ₃ Azid, pH 7,2
TEAD-Puffer:	1x TEA, 1mM DTT
TEAD-Puffer 100:	1x TEAD, 100mM NaCl, filtriert
TEAD-Puffer 500:	1x TEAD, 500mM NaCl, filtriert
TEAD-Puffer A:	1x TEAD, 100mM NaCl, filtriert
TEAD-Puffer B:	1x TEAD, 1M NaCl, filtriert
Substratpuffer:	1x TEAD, 50µM Tyr-Substrat
Saccharose-10%:	10% w/v Saccharose in 1x TEAD-Puffer
Saccharose-40%:	40% w/v Saccharose in 1x TEAD-Puffer

Durchführung:

Die Erythrozytenkonzentrate (2 Einheiten) wurden mit 1x PBS gewaschen und anschließend 10min bei 5.000rpm zentrifugiert. Nach 3 Waschwiederholungen wurde das Pellet in dem 2-fachen Volumen TEAD-Puffer resuspendiert und zur Lyse mit 0,1% NP40 versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Erythrozytenmembranen durch Zentrifugation bei 10.000rpm und 4°C für 90min abgetrennt.

Der Überstand wurde über Nacht bei 4°C mit ca. 200ml äquilibrer DEAE Sephacel-Suspension inkubiert. Nach Einfüllen der Suspension in einen Büchner-Trichter wurde diese mit TEAD-Puffer 100 gewaschen, bis die optische Dichte des Durchflusses kleiner als 0,1 war. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden mit TEAD-Puffer 500 eluiert und in 10 Fraktionen à 50ml aufgefangen.

In 96 Well Mikrotiterplatten wurden jeweils 10µl der Fraktionen und 100µl Substratpuffer pro Well einpipettiert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Fluoreszenz der abgespaltenen AMC-Gruppe bei einer Emissions-Wellenlänge von 460nm (Anregung bei 390nm) im Fluorimeter gemessen und damit der Gehalt an aktivem Proteasom bestimmt. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt.

Zu dem Pool wurde auf Eis über 30min unter ständigem Rühren sehr langsam festes Ammoniumsulfat gegeben, bis die Konzentration 35% Sättigung betrug. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 16.000rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen

und das Pellet verworfen. Zu dem Überstand wurde auf Eis unter Rühren weiteres Ammoniumsulfat gegeben. Die final 75%gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurde für 20min bei 16.000rpm und 4°C zentrifugiert und das entstandene Pellet vorsichtig in TEAD-Puffer gelöst.

6 Gradienten wurden mit einem Gradientenmischer aus 10%igem und 40%igem Saccharosepuffer in Ultrazentrifugenröhrchen gegossen. Auf die Gradienten wurden vorsichtig jeweils 0,5ml der Probe pipettiert. In der Ultrazentrifuge Optima 80K mit dem Rotor SW40 wurden die Proben bei 40.000rpm und 4°C 16h zentrifugiert. Danach wurden die Gradienten in 0,6ml Fraktionen aliquotiert und es wurden wiederum die aktivsten Fraktionen durch einen weiteren Proteaseassay wie oben beschrieben bestimmt und gepoolt.

Die gepoolte Probe wurde in der ÄKTA FPLC auf eine äquilibrierte MonoQ-Säule (Anionenaustauscher) aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit TEAD-Puffer A wurden die Proteine durch einen linearen NaCl-Gradienten eluiert (3ml: 0-20% TEAD-Puffer B, 20ml: 20-35% TEAD-Puffer B, 3ml: 35-100% TEAD-Puffer B, 4ml: 100% TEAD-Puffer B) und in 1ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen um die Peaks in der UV-Messung wurden wiederum in einem Proteaseassay auf ihre proteasomale Aktivität getestet, die aktiven Fraktionen wurden gepoolt. Wie unter 3.2.1.1 beschrieben wurde die Konzentration der Probe durch die Messung bei 280 nm bestimmt. Durch eine SDS-PAGE (s. 3.2.1.4) und Anfärbung des Gels mit Coomassie wurde die Reinheit der Probe bestätigt. Das 20S Proteasom wurde durch eine Ethanolanfällung von dem Puffer separiert (s. 3.2.1.2) und bei -80°C gelagert.

3.2.1.4 Eindimensionale SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösungen:

Sammelgelpuffer:	1M Tris HCl pH 6.8
Trenngelpuffer:	1,5M Tris HCl pH 8.8
10x SDS-Laufpuffer:	250mM Tris, 2M Glycin, 35mM SDS
5x SDS Probenpuffer:	520mM SDS, 75mM Tris HCl pH 6,8, 5% w/v Bromphenolblau, 40% Glycerol, 10% β- Mercaptoethanol
Marker (Biolabs):	prestained protein marker, 11–17–26–34–43–55–72–95–130–170 kDa

Durchführung:

Die Proteine wurden in 15%igen Acrylamidgelen aufgetrennt.

Ansatz für 5 Gele, d= 0,75mm:

15%iges Trenngel:	15ml Acrylamidlösung, 7,5ml Trenngelpuffer, 7,5ml A. dest., 150µl 20% w/v SDS, 200µl 10% w/v APS, 10µl TEMED
5%iges Sammelgel:	2ml Acrylamidlösung, 1ml Sammelgelpuffer, 9ml A. dest., 60µl 20% w/v SDS, 60µl 10% w/v APS, 6µl TEMED

Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenpuffer versetzt, 5min bei 95°C denaturiert und 1min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die Gelelektrophorese wurde mit 70V in den ersten 15min begonnen und mit 120V fortgeführt, bis der 17kDa-Marker herausgelaufen war.

3.2.1.5 Zweidimensionale SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (2D SDS-PAGE)

Die 2D-Gelelektrophoresen wurden im Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Frau Dr. Ursula Zimny-Arndt) durchgeführt.

Lösungen:

Acrylamid-IEF-Lösung:	4M Arcylamid, 0,1M Bisacrylamid
Harnstoff-Probenpuffer:	9,4M Harnstoff, 2ml 10% NP40, 500µl Ampholine 3- 10, 0,5ml β-Mercaptoethanol, 150µl 20% w/v SDS ad 10ml mit A. dest.
Overlay:	9M Harnstoff, 250µl Ampholine 3-10 ad 10ml mit A. dest
Equilibrierungspuffer:	5ml Glycerol, 5ml β-Mercaptoethanol, 5,8ml 20% w/v SDS, 6,2ml 0,5M Tris pH 6,8 ad 50ml mit A. dest.
Molekulargewichtsstandard	Rainbow-Marker, 35, 31, 24, 17, 12, 8,5, 3,5kDa
10x SDS-Laufpuffer:	250mM Tris, 2M Glycin, 35mM SDS

Durchführung:

100µg des mit Ethanol ausgefällten Proteins (s. 3.2.1.2.) wurden in 100µl Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen und über Nacht gelöst und denaturiert.

IEF-Gel (1.Dimension): 0,66ml Acrylamid-IEF, 1ml 10% NP40, 1ml A. dest., 250µl
Ampholine 3-10, 14µl 10% w/v APS, 10µl TEMED

Der IEF-Gel-Ansatz wurde luftblasenfrei in Glasröhrchen gefüllt und mit 30µl Overlay beschichtet, die Polymerisation erfolgte über Nacht. Nach Abwaschen des Overlays mit A. dest. wurde je nach gewünschter Proteinmenge 20-25µl der Protein-Harnstoff-Probenpufferlösung auf das Gel pipettiert und diese mit 30µl Overlay überschichtet. Die Röhrchen wurden mit 0,01M Phosphorsäure aufgefüllt und in die Kammern eingespannt. Die obere Wanne wurde ebenfalls mit 0,01M Phosphorsäure, die untere mit 0,02M Natronlauge befüllt und die isoelektrische Fokussierung mit 400V 4h durchgeführt. Die Gele wurden anschließend 20min in Equilibrierungspuffer inkubiert.

Agarosegel: 2,5ml Glycerol, 2,9ml 20% w/v SDS, 3,2ml 0,5M Tris pH 6,8, 0,25g
 Agarose ad 22,5ml mit A. dest.

Das Agarosegel wurde aufgekocht und mit einer Spatelspitze Bromphenolblau versetzt. Es wurden 15%ige SDS-Gele wie unter 3.2.1.4. beschrieben angefertigt, auf denen die equilibrierten IEF-Gele luftfrei in Agarosegel eingebettet wurden. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x SDS-Laufpuffer 1h bei 100V, dann mit 1200Vh.

3.2.1.6 Anfärben der SDS-Gele

Lösungen:

Coomassiefärbelösung: 25% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,1% w/v Coomassie R250

Entfärbelösung: 25% Ethanol, 10% Essigsäure

Durchführung:

Die Gele wurden nach der SDS-PAGE ca. 2h in der Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Danach wurden sie über Nacht mit mehrmaligem Pufferwechsel in der Entfärbelösung entfärbt.

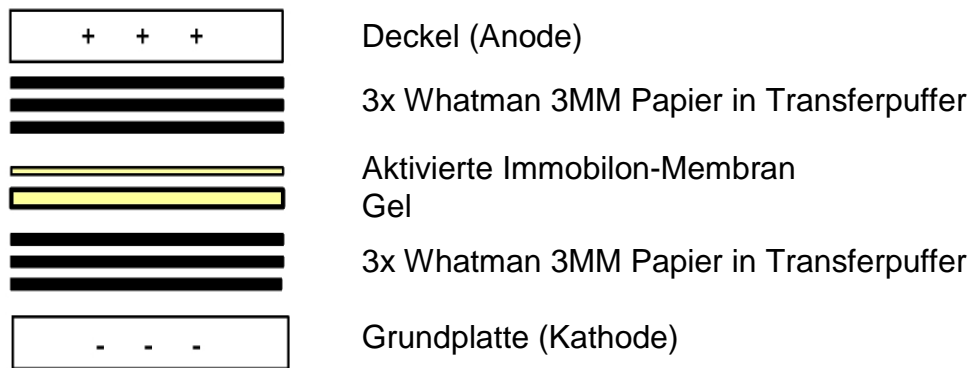
3.2.1.7 Elektrotransfer von Proteinen nach der SDS- PAGE auf Immobilon-Membran

Lösungen:

Transferpuffer: 27,7mM Tris, 187,5mM Glycin, 25% Methanol

Coomassiefärbelösung s. 3.2.1.6

Transfer-Aufbau (Semidry):



Durchführung:

Die Proteine wurden mit 400mA innerhalb 1h auf die Immobilon-Membran transferiert und mit Coomassie-Färbelösung dargestellt, so dass deren Lokalisation markiert werden konnte. Jede Membran wurde eingescannt, um später bei der Immunodetektion nicht nur eine Zuordnung der erkannten Untereinheiten zu der Molekulargröße, sondern auch zu dem charakteristischen Muster des aufgetrennten Proteasoms zu ermöglichen. Die Entfärbung erfolgte mit 50% Methanol.

3.2.1.8 Identifizierung von Antikörpern mittels Immunodetektion

Lösungen:

10x PBS entsprechend 3.2.1.3

Blockpuffer: 1x PBS, 1x Roti Block, 0,1% TWEEN-20

Inkubationspuffer: 1x PBS, 1x Roti Block

Waschpuffer: 1x PBS, 0,1% TWEEN-20

Prim. Antikörper: humanes Serum, entsprechende Verdünnung in Inkubationspuffer

Sek. Antikörper: HRP-markiertes Ziege anti Human-IgG IgG (1:20.000) und Maus anti Human-IgG₁, -IgG₂, -IgG₃ und -IgG₄ IgG (1:500) in Inkubationspuffer

ECL-Reagenz: 20ml 100mM Tris HCl pH 8,5, 4µl 90mM Coumarinsäure (in DMSO), 100µl 250mM Luminol (in DMSO), 20µl 30% H₂O₂

Durchführung:

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen über Nacht bei 4°C in Blockpuffer geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden sie in die *Deca-Probe Inkubationskammern* von Hoefler eingespannt, so dass durch 10 Rinnen in den Acrylplatten und eine Silikonabdichtung je 10 voneinander getrennte Kompartimente auf den Membranen entstanden. Es wurde zügig jeweils 1ml in Inkubationspuffer verdünntes Serum in jedes Kompartiment einpipettiert und 2h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Der erste Waschschrift nach Abgießen der Serumverdünnungen erfolgte mit Waschpuffer in den Kammern, danach wurden diese auseinandergebaut und die Membranen 2x10min, dann 3x5min gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen.

Die Identifizierung von Antikörpern aus humanen Seren mithilfe von zweidimensional aufgetrennten Proteinen (2D-SDS-PAGE) erfolgte durch Inkubation der Membranen in verdünnten Seren in einfachen Schälchen, da hier nur ein Serum mit der ganzen Membran getestet wurde. Danach wurden die Membranen ebenfalls 3x10min und 3x5min gewaschen.

Es folgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur und eine weitere Waschprozedur wie oben beschrieben. Nach einminütigem Schütteln der Membranen in ECL-Reagenz wurden diese luftblasenfrei mit Folie abgedeckt und die Fotofilme bei Rotlicht je nach Signalintensität für 1sec bis 10min aufgelegt.

3.2.1.9 Strippen gebundener Antikörper von Immobilon-Membranen

Lösungen:

10x PBS, Wasch- und Blockpuffer entsprechend 3.2.1.3 und 3.2.1.4

Stripping-Puffer: 6,25ml 1M Tris/HCl pH 6,7, 700µl β-Mercaptoethanol, 10ml
20% v/w SDS ad 100ml mit A. dest.

Durchführung:

Bereits zur Immunodetektion verwendete Membranen wurden 30min bei 60°C und danach weitere 30min bei Raumtemperatur mit Stripping-Puffer inkubiert. Nach gründlichem Abspülen des Puffers mit A. dest. wurden die Membranen 3x10min in

Waschpuffer geschüttelt. Nach erneuter Inkubation in Blockpuffer über Nacht konnten die Membranen ein zweites Mal verwendet werden.

3.2.1.10 Identifikation der Untereinheiten des 20S Proteasoms durch Massenspektroskopie

Lösungen:

Entfärbelösung: 200mM Ammoniumbikarbonat, 50v/v% Acetonitril

Inkubations- und Verdaupuffer: 50mM Ammoniumbikarbonat, 5v/v% Acetonitril

Trypsinstammlösung: 0,1µg/µl Trypsin in 50mM Essigsäure

Durchführung:

Nach der Auftrennung der Untereinheiten des 20S Proteasoms mittels 2D SDS-PAGE wurde das Gel mit Coomassie angefärbt und eingescannt, die einzelnen Spots wurden durchnummeriert. Um eine Proteinkontamination zu vermeiden, wurde die folgende Peptid-Sequenzierung mit Nitril-Handschuhen unter dem Abzug durchgeführt. Die prägnanten Spots wurden mit einer um ca. 1cm gekürzten blauen Pipettenspitze ausgestochen und in 0,5ml Reaktionsgefäße überführt. Es wurden jeweils 500µl Entfärbelösung zugegeben, für 30min bei 37°C inkubiert und wieder abgenommen. Die folgende Inkubation der entfärbten Gelstückchen zur Säuberung von Farbresten erfolgte mit jeweils 500µl Inkubations- und Verdaupuffer ebenfalls für 30min bei 37°C. Nach Abnahme des Puffers wurden die Proben 30min bei 30°C im Mikrokonzentrator getrocknet. Zu den fast trockenen Gelstückchen wurde jeweils 1µl Trypsinstammlösung gegeben und nach kurzer Einwirkzeit wurden zusätzlich 25µl Inkubations- und Verdaupuffer einpipettiert. Der Proteinverdau erfolgte bei 37°C über Nacht. Nach kurzer Zentrifugation bei 13.000rpm wurde der Überstand mit den generierten Peptiden abgenommen und jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 25µl 60% Acetonitril / 0,5% Trifluoressigsäure wurden zu den Gelstückchen gegeben, nach 10minütiger Inkubation wieder abgenommen und ebenfalls in das neue Reaktionsgefäß pipettiert. Die restlichen Peptide wurden durch Zugabe von 25µl 100%igem Acetonitril in 10minütiger Inkubation gelöst und mit dem Überstand zu den beiden vorherigen Überständen gefüllt. Die Proben (Überstand 1-3) wurden in 90min bei 45°C vollständig im Mikrokonzentrator getrocknet und über Nacht bei -20°C eingefroren.

Die getrockneten Proben wurden aufgetaut und in 2,5µl 0,1%iger Trifluoressigsäure gelöst. Zur Entsalzung der Proben folgte eine Zip Tip Elution. Die Zip Tips wurden durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren mit 70% Acetonitril /0,1% Trifluoressigsäure angefeuchtet, dann durch dreimaliges Spülen mit 0,1%iger Trifluoressigsäure equilibriert. Dann wurde das Peptidgemisch 20x in dem Zip Tip auf- und abpipettiert, um die Peptide in dem Zip Tip zu binden. Die Zip Tips wurden 2x mit 0,1%iger Trifluoressigsäure gewaschen. 0,75µl α-Cyanohydroxyzimtsäure wurden auf jeweils 3 Spots der MALDI Proben Platten gegeben und 5x mit dem vorbereiteten Zip Tip auf- und abpipettiert, um die gebundenen Peptide zu eluieren. Die folgende Auswertung der Proben im MALDI TOF / TOF Proteomics Analyser wurde freundlicherweise von Frau Dr. Katharina Janek durchgeführt.

3.2.1.11 Bestimmung von proteasomalen Autoantikörpern (PA) durch einen ELISA

Der ELISA zur Bestimmung der PA wurde im Rheumatologisch-Immunologischen Labor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité (Herr Dr. Egerer) durchgeführt.

Lösungen:

Carbonat-Puffer: 5mM NaHCO₃, 5mM Na₂CO₃, pH 9,6

Blockpuffer: 1x Roti Block

prim. Antikörper: humanes Serum, 1:100 verdünnt in Inkubationspuffer

sek. Antikörper: HRP-markiertes Ziege anti Human-IgG IgG

Waschpuffer wie unter 3.2.1.8 beschrieben.

Durchführung:

Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit 20S Proteasom in Carbonat-Puffer beschichtet. Verbleibende Bindungsstellen wurden mit Blockpuffer gesättigt. Von den verdünnten Serumproben (1:100) wurden 50µl pro Well aufgetragen und für 40min inkubiert. Nach dreimaliger Reinigung mit dem Waschpuffer wurde der HRP-markierte sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 hinzugegeben und für 30min belassen. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Platten wurde das HRP-Substrat Tetramethylbenzidin zugefügt, die Reaktion wurde nach 30min durch Zugabe von 1M

Schwefelsäure gestoppt. Die Messung des Farbstoffs erfolgte bei 450nm im Photometer.

3.2.1.12 Bestimmung der Nt-pro BNP-Konzentration

Zur Bestimmung der Nt-pro BNP-Konzentration wurde das BNP Fragment ELISA Kit (Biomedica) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.1.13 Bestimmung der Immunoglobulin-Konzentration

Es wurden die Spiegel der gesamt-IgG-, IgG₁-, IgG₂-, IgG₃- und IgG₄-Spiegel der Seren vor und teilweise nach der Immunadsorption durch das *Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité, Campus Virchow* bestimmt.

3.2.2 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dipl. Math. Christine Gericke durchgeführt.

Für die numerischen Ergebnisse wurden bei Normalverteilung der Mittelwert \pm Standardfehler, bei nicht-normalverteilten Ergebnissen der Median mit der 25. und 75. Perzentile angegeben. Die Ergebnisse für kategoriale Daten wurden als Häufigkeiten angegeben. Für den Vergleich zweier Gruppen mit unabhängigen Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test, bei Vergleichen zwischen verschiedenen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe wurde der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet. Die Auswertung von Unterschieden mit kategorischen Variablen wurde mithilfe des Exakten Tests nach Fisher durchgeführt. Von einer statistischen Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ ausgegangen.

4 Ergebnisse

4.1 Detektion Proteasomaler Autoantikörper mittels ELISA

Zu Beginn dieser Arbeit sollte die Hypothese, dass Proteasomale Autoantikörper (PA) bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) vermehrt auftreten, untersucht werden. Daher wurde mit den Seren der 90 DCM-Patienten der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald, die in die Studie eingeschlossen worden waren, und der 90 gesunden Kontrollprobanden im ersten Schritt ein ELISA zur Detektion von PA durchgeführt. Dies übernahm Herr Dr. K. Egerer aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité Berlin.

Der Cut off wurde als Mittelwert des PA-Titers der Kontrollprobanden plus der dreifachen Standardabweichung bei 26U/ml festgelegt. 30% der Patienten waren demnach PA-positiv, von den Kontrollprobanden lagen 3,4% über dem Cut off. Der Median der Antikörper-Konzentrationen betrug bei den Patienten 19,5U/ml (Range 13,9-28,6U/ml) und bei den Kontrollprobanden 15,5U/ml (Range 12,6-19,0U/ml), die Box Plots sind in der Abbildung 1 dargestellt. Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Patientencharakteristika.

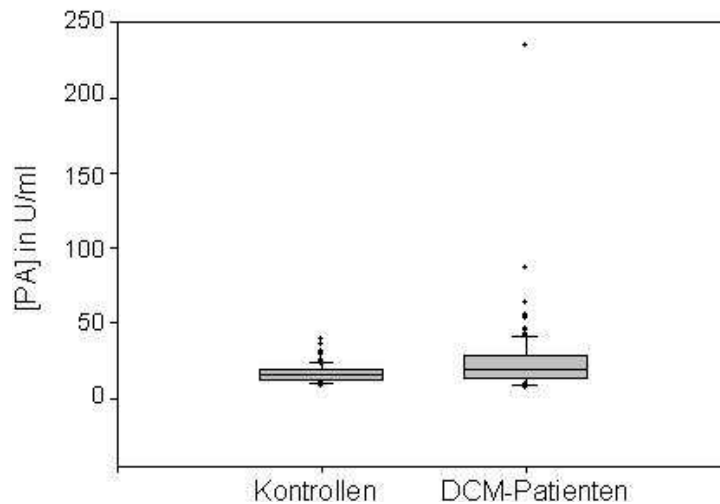


Abb. 1: PA-Titer im ELISA bei Kontrollen vs. Patienten. Über Nacht mit 20S Proteasom beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit 1:100 verdünntem Serum inkubiert. Die Detektion der PA erfolgte über einen HRP-markierten sekundären Antikörper, als Substrat diente Tetramethylbenzidin. Die Box Plots zeigen jeweils den Median, das obere und das untere Quartil sowie die Whisker. $p < 0,001$.

	Alle Patienten n = 90	PA positiv n = 27	PA negativ n = 63	Signifikanz (PA+ vs. PA-)
Alter (Jahre)*	51,1 ± 0,9	51,8 ± 1,4	50,8 ± 1,1	n.s.
Geschlecht m/ w (n)	69/ 21	18/ 9	51/ 12	n.s.
Krankheitsdauer (Mon.)*	42,5 ± 5,6	42,2 ± 8,7	42,6 ± 5,4	n.s.

Tab. 1: Patientencharakteristika. *Mittelwert ± Standardfehler. PA-positiv: [PA] ≥ 26U/ml, PA-negativ: [PA] < 26U/ml. Mon. = Monate

4.2 Eigenschaften der proteasomalen Autoantikörper

4.2.1 Untersuchung der im ELISA PA-positiven Patientenseren im Westernblot

Nachdem ein vermehrtes Auftreten von PA durch den ELISA bestätigt worden war, sollten diese Antikörper weiterführend untersucht werden. Daher wurden die 27 im ELISA PA-positiv getesteten Patientenseren im Westernblot beurteilt.

Die Westernblots wurden mit 15µg Proteasom pro SDS-PAGE durchgeführt. Auf einer Membran wurden 8 Patientenseren untersucht, zusätzlich wurde jeweils eine positiv- und eine negativ-Kontrolle mitgeführt. Die PA aus den Patientenseren banden an das denaturierte 20S Proteasom. Dabei wurden mehrere Untereinheiten erkannt, vorwiegend jedoch eine Bande bei ca. 29kDa, sowie in geringerer Häufigkeit bei ca. 27, 30 und 25kDa. Eine Auswahl der Filme zeigt die Abbildung 2.

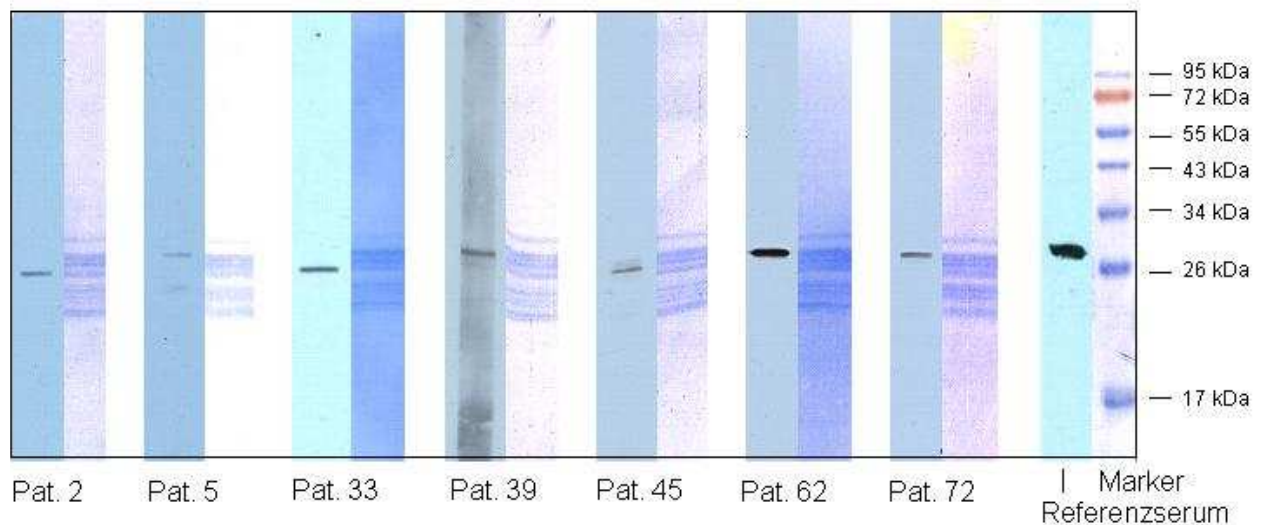


Abb. 2: Westernblots mit Patientenseren gegen das 20S Proteasom. 15µg aufgereinigtes 20S Proteasom pro Membran, Verdünnung der Seren 1:50, 2h Inkubation. Sek. Antikörper: HRP-markiertes Ziege anti Human-IgG IgG, Verdünnung 1:20.000, 1h Inkubation. ECL-Reagenz diente als Substrat der HRP. Auf jeder Membran wurde eine Auftragungsspur ohne primären Antikörper als negativ-Kontrolle mitgeführt sowie das Referenzserum, um eine Vergleichbarkeit verschiedener Filme miteinander zu gewährleisten. Für die Patienten sind links die Fotofilme und rechts die entsprechenden Coomassie-gefärbten Membranausschnitte, welche für die jeweilige Immunodetektion verwendet worden sind, dargestellt. Ganz rechts ist der Prestained Protein Marker (2µl) abgebildet. Die PA aus dem Serum von Patient 5, 39, 62 und 72 erkennen vorwiegend eine Untereinheit bei ca. 29kDa, von Patient 2, 33 und 45 bei ca. 26kDa.

4.2.2 Detektion der von proteasomalen Autoantikörpern (PA) präferentiell erkannten Untereinheiten

Die PA haben Proteasom-Banden bei 25, 27, 29 und 30kDa bevorzugt erkannt. Da in der eindimensionalen SDS-PAGE das 20S Proteasom jedoch nicht entsprechend seiner 14 verschiedenen Untereinheiten in 14 Banden aufgetrennt wird, konnten diese Banden vorerst nicht zugeordnet werden.

Das Proteasom wurde daher in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt (25µg Proteasom pro 2D SDS-PAGE). Ein Mastergel wurde mit Coomassie-Färbelösung eingefärbt und eingescannt. Danach wurden die einzelnen Spots auf dieser Vorlage durchnummeriert. Die Proteasom-Untereinheiten wurden aus dem Gel extrahiert und sequenziert. Die entstandenen für die jeweiligen Untereinheiten spezifischen Peptidgemische wurden von Frau Dr. Katharina Janek mittels Massenspektroskopie analysiert, wodurch die Zuordnung der einzelnen Untereinheiten zu den Spots des typischen Musters des zweidimensional aufgetrennten Proteasoms möglich war (siehe Abbildung 3).

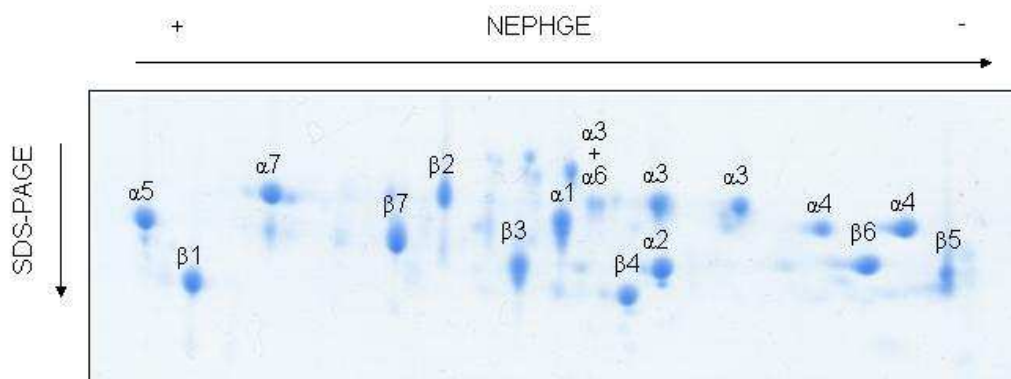


Abb. 3: 2D-Gelelektrophorese von 20S Proteasom, Mastergel. 25µg aufgereinigtes 20S Proteasom wurde nach der Molekulargröße (SDS-PAGE) und dem isoelektrischen Punkt (NEPHGE) aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Durch die massenspektroskopische Identifikation der Proteinspots konnte jeder Untereinheit ihre charakteristische Lokalisation in der 2D-SDS PAGE zugeordnet werden.

Es wurden weitere 2D-Gelelektrophoresen mit jeweils 25µg aufgereinigtem 20S Proteasom angefertigt, die nach Proteintransfer auf Immobilon-Membranen zur Immunodetektion mit repräsentativen Patientenseren verwendet wurden. Die Ergebnisse wurden mit den eindimensionalen SDS-PAGEs derselben Seren verglichen. Diejenigen Seren, die bei dem eindimensional aufgetrennten Proteasom die Bande bei ca. 29kDa erkannten, banden bei der zweidimensionalen Auftrennung an die Untereinheit $\alpha 3$. Entsprechend konnte der Bande bei ca. 26kDa die Untereinheit $\alpha 1$, der Bande bei ca. 30kDa die Untereinheit $\alpha 6$ und der Bande bei ca. 25kDa die Untereinheit $\beta 7$ zugeordnet werden. Die Abbildung 4 zeigt repräsentative Beispiele für die Zuordnung.

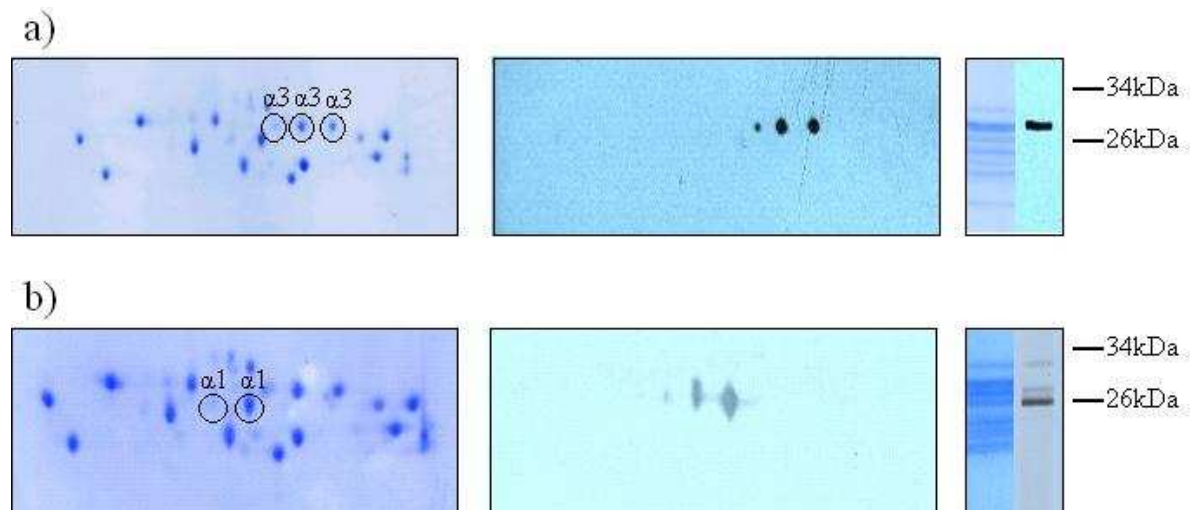


Abb. 4: Zuordnung der vorwiegend von PA erkannten Untereinheiten. Es wurde eine 2D SDS-PAGE mit 25µg aufgereinigtem 20S Proteasom pro Membran durchgeführt, nach dem Proteintransfer wurden die Membranen mit Patientenseren in einer Verdünnung von 1:1.500 2h inkubiert. Die gleichen Patientenseren wurden in einer Verdünnung von 1:50 mit Membranen aus einer 1D SDS-PAGE (15µg Proteasom pro Membran) inkubiert. Sekundärer Antikörper war in beiden Fällen HRP-markiertes anti Human-IgG IgG, 1:20.000 verdünnt. Links ist jeweils die Coomassie-gefärbte 2D-Membran gezeigt, daneben der zugehörige Fotofilm. Rechts sind Coomassie-Färbung und Fotofilm der entsprechenden 1D-PAGE dargestellt. **a)** Referenzserum, überwiegend von PA erkannte Bande bei ca. 29kDa, in der 2D-PAGE als $\alpha 3$ identifiziert. **b)** Patient 78, überwiegend von PA erkannte Bande bei ca. 26kDa, in der 2D PAGE als $\alpha 1$ identifiziert.

Demnach erkannten die PA aus den Patientenseren zum größten Teil die Untereinheit $\alpha 3$ (44,4%). Am zweithäufigsten war die Untereinheit $\alpha 1$ das Ziel der anti-proteasomalen Immunantwort (22,2%), an dritter Stelle stand die Untereinheit $\alpha 6$ (14,8%). Eine Untereinheit der inneren Proteasom-Ringe, $\beta 7$, wurde von 7,4% der Patientenseren erkannt. Bei 18,5% der im ELISA positiv auf PA getesteten Patientenseren waren im Westernblot viele verschiedene Banden, keine Banden oder eine Schwarzfärbung der gesamten Spur detektierbar. Die Abbildung 5 fasst die Ergebnisse zusammen.

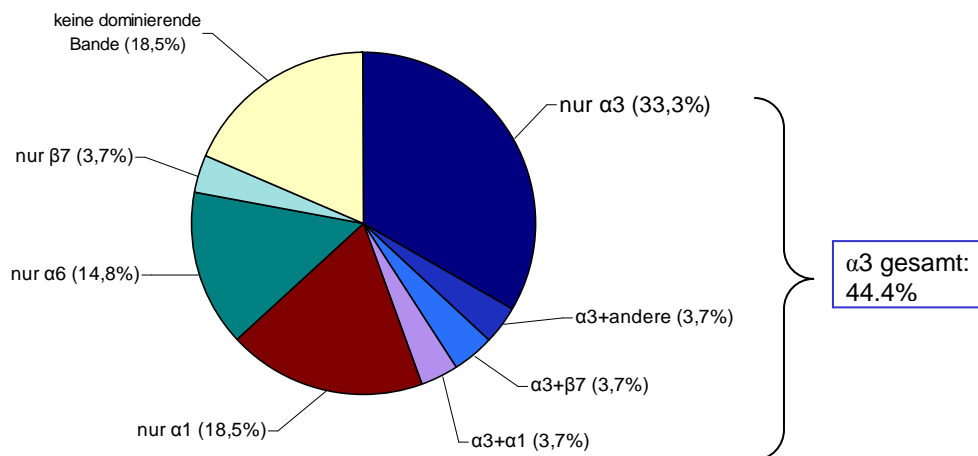


Abb. 5: Von PA vorwiegend erkannte Untereinheiten. Die 27 im ELISA positiv auf PA getesteten Patientenseren wurden im Westernblot untersucht, um die präferentiell von den PA erkannten Untereinheiten des 20S Proteasoms zu detektieren.

4.2.3 Zuordnung der proteasomalen Autoantikörper (PA) zu den Immunglobulin- (IgG-) Subklassen

In der Literatur wurde vermehrt die besondere Bedeutung von Antikörpern der IgG-Subklasse IgG₃ betont. Es sollte daher geprüft werden, welcher IgG-Subklasse die PA bei der DCM angehören. Zu diesem Zweck wurden weitere Westernblots durchgeführt, bei denen ebenfalls 15µg aufgereinigtes 20S Proteasom pro Membran eingesetzt und die Seren 1:50 verdünnt wurden. Auf einer Membran wurden in den *Deca-Probe*

Inkubationskammern von Hoefer 5 Spuren mit dem verdünnten Serum des gleichen Patienten inkubiert. Für die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen zerschnitten, und die 5 Streifen wurden mit 5 verschiedenen HRP-markierten Antikörpern in Schälchen inkubiert: Maus anti Human-IgG₁, -IgG₂, -IgG₃ und -IgG₄ IgG in einer Verdünnung von 1:500 und Ziege anti Human-IgG IgG 1:20.000 verdünnt. Die Membranabschnitte zwischen den einzelnen Kompartimenten der *Deca-Probe Inkubationskammern* dienten als Negativ-Kontrollen.

Auf diese Weise wurden jeweils selektiv nur die PA einer IgG-Subklasse HRP-markiert und auf den Foto-Filmen sichtbar gemacht. Die PA konnten in der großen Mehrzahl der Fälle der IgG₃-Subklasse und nur selten den Subklassen IgG₁ und IgG₂ zugeordnet werden (repräsentative Beispiele siehe Abbildung 6).

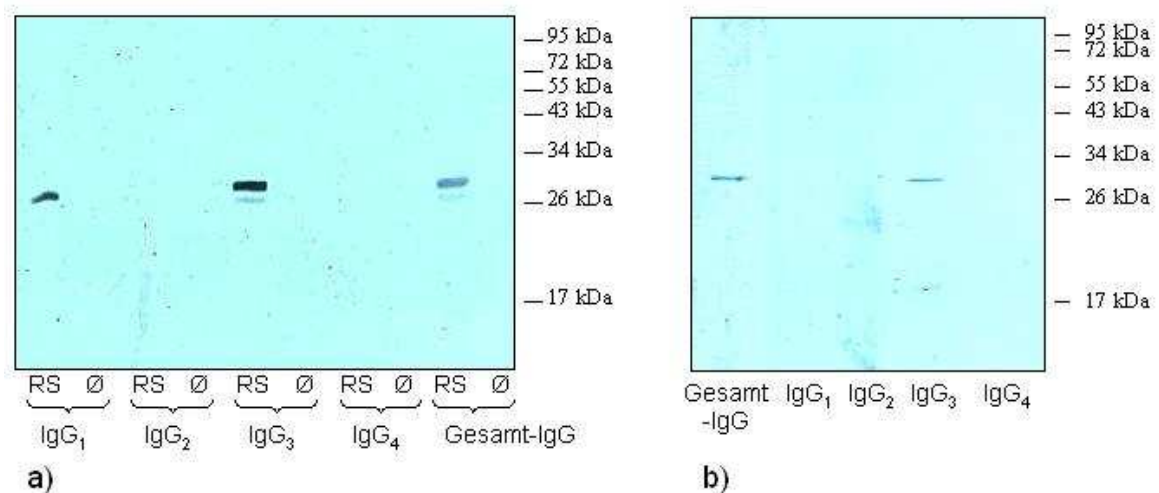


Abb. 6: Zuordnung der PA zu den IgG-Subklassen. Durchführung der SDS-PAGE und der Immunodetektion s. Abb. 2. Sekundäre Antikörper: Gesamt-IgG = HRP-markiertes Ziege anti Human-IgG IgG, Verdünnung 1:20.000. IgG₁ = HRP-markiertes Maus anti Human-IgG₁ IgG, Verdünnung 1:500, IgG₂ – IgG₄ entsprechend. a) RS = Referenzserum, Ø = kein Serum, d.h. negativ-Kontrolle. Das Referenzserum diente als primärer Antikörper, die PA daraus wurden von den sekundären Antikörpern gegen IgG₁ und IgG₃ erkannt. b) Das Serum von Patient 23 war primärer Antikörper, nur der sekundäre Antikörper gegen IgG₃ band an die PA.

Bei allen PA-positiven Patientenseren wurde folglich untersucht, ob die im ELISA detektierten PA der IgG₃-Subklasse angehören. Es wurden Westernblots durchgeführt, bei denen jeweils 2 Spuren mit dem gleichen Patientenserum inkubiert wurden. Als sekundärer Antikörper wurde bei der 1. Spur das Ziege anti Human-IgG IgG (1:20.000), bei der 2. Spur das Maus anti Human-IgG₃ IgG (1:500) verwendet. Auf den Fotofilmen wurden die Banden, die von den gleichen Seren stammten, anschließend miteinander verglichen. In 48,2% der Fälle ließen sich die PA auf diese Weise der Subklasse IgG₃ zuordnen, da die Banden beider sekundärer Antikörper bei dem jeweiligen Patienten übereinstimmten. Bei 44,4% der Patienten wurde keine Übereinstimmung gefunden. Bei 7,4% (2 Patienten) war keine Aussage möglich: In einem Fall waren bei beiden sekundären Antikörpern keine Banden sichtbar, im anderen Fall beide Streifen komplett schwarz. Eine repräsentative Auswahl der Filme zeigt die Abbildung 7, die Tabelle 2 fasst die Ergebnisse zusammen.

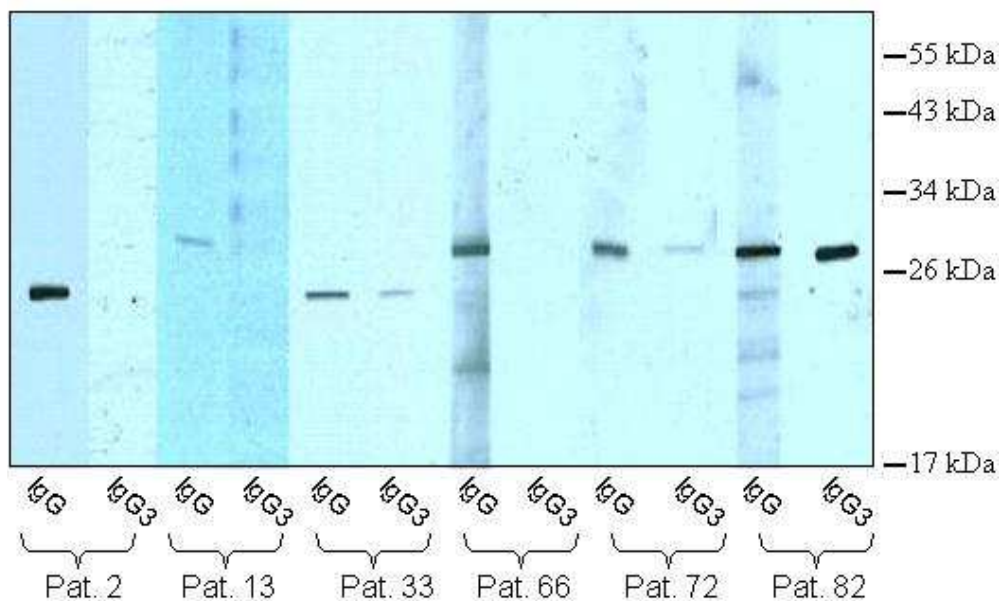


Abb. 7: Zuordnung der PA zu der IgG-Subklasse IgG₃. Durchführung der SDS-PAGE und der Immunodetektion s. Abb. 2. Sekundäre Antikörper: IgG = HRP-markiertes Ziege anti Human-IgG IgG, Verdünnung 1:20.000, IgG₃ = HRP-markiertes Maus anti Human-IgG₃ IgG, Verdünnung 1:500. Bei Patient 33, 72 und 82 erkennt der gegen humanes IgG₃ gerichtete sekundäre Antikörper die PA und zeigt die gleiche Bande wie der gegen alle Subklassen gerichtete anti Human-IgG Antikörper. Die PA aus den Seren von Patient 2, 13 und 66 gehören nicht der Subklasse IgG₃ an.

	Anzahl der Patienten	Prozentualer Anteil
PA gehören der Subklasse IgG ₃ an	13	48,2%
PA gehören nicht der Subklasse IgG ₃ an	12	44,4%
Keine Aussage möglich	2	7,4%

Tabelle 2: Zuordnung der PA zu der IgG-Subklasse IgG₃

4.3 Zusammenhang zwischen proteasomalen Autoantikörpern (PA) und kardialen Funktionsparametern sowie den Endomyokardbiopsie-(EMB-) Befunden

4.3.1 Nt-pro BNP im Zusammenhang mit den proteasomalen Autoantikörpern (PA)

Das Brain natriuretische Peptid (BNP) ist ein Hormon, das von den Endothelzellen der Ventrikel bei starker Dehnung freigesetzt wird. Das N-terminale Fragment des Proteins wird Nt-pro BNP genannt und ist ein etablierter Marker der Herzinsuffizienz⁽⁸⁰⁻⁸²⁾.

Um die Schwere der Herzinsuffizienz in unserem Patientenkollektiv zu objektivieren, wurde daher unter anderem die Nt-pro BNP-Konzentration bei den 90 DCM-Patienten mithilfe des *BNP Fragment ELISA Kits* von Biomedica bestimmt. Ebenfalls untersucht wurden 33 zufällig ausgewählte Kontrollprobanden. Verwendet wurden Serumproben, die vor der IA abgenommen worden sind. Der Cut off wurde bei dem Mittelwert des Nt-pro BNP-Titers der Kontrollprobanden plus der dreifachen Standardabweichung festgelegt (399,25 U/ml).

Die Nt-pro BNP-Konzentrationen der DCM-Patienten waren gegenüber den Werten der gesunden Kontrollprobanden deutlich erhöht ($727,7 \pm 59,2$ fmol/ml vs. $165,1 \pm 8,3$ fmol/ml). Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Nt-pro BNP-Werten und den PA-Titern der Patienten besteht. Dazu wurden die Patienten nach dem Cut off für PA bei 26U/ml in die Gruppen PA-positiv und PA-negativ unterteilt.

In der PA-positiven Gruppe lag der Nt-pro BNP-Titer bei 833 (489 – 1.200) fmol/ml, bei der PA-negativen Gruppe bei 491 (313 – 697) fmol/ml. Nach einem Mann-Whitney-U-

Test war die Erhöhung der Nt-pro BNP-Konzentrationen des PA-positiven Patientenkollektivs gegenüber denen des PA-negativen Kollektivs statistisch signifikant (siehe Abbildung 8).

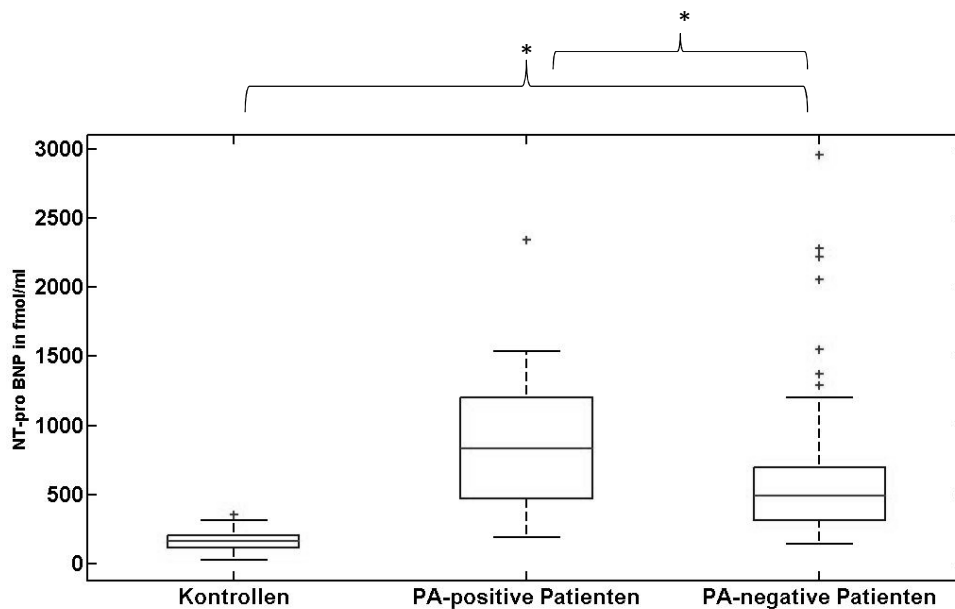


Abb. 8: Vergleich der Nt-pro BNP-Konzentrationen bei Kontrollen, PA-positiven und PA-negativen Patienten. PA-positiv: [PA] \geq 26U/ml, PA-negativ: [PA] < 26U/ml. Die Box Plots zeigen jeweils den Median, das obere und das untere Quartil sowie die Whisker. * $p < 0,05$

4.3.2 Zusammenhang zwischen linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) sowie linksventrikulärem enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) und den proteasomalen Autoantikörpern (PA)

Zwei weitere Parameter zur Objektivierung der kardialen Funktion stellen die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) und der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD) dar. Diese Daten wurden in der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald bestimmt, indem bei allen Patienten der Studie Echokardiographien durchgeführt und aufgezeichnet wurden. Die Aufzeichnungen wurden verblindet von Ärzten ausgewertet, die nicht an der Echokardiographie teilgenommen hatten.

Bei den PA-positiven Patienten war die durchschnittliche LVEF kleiner als bei den PA-negativen Patienten ($30,5 \pm 1,4\%$ vs. $33,6 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$). Der LVEDD war bei den PA-positiven Patienten in der Tendenz größer als bei den PA-negativen Patienten ($71,7 \pm 9,9\text{mm}$ vs. $68,9 \pm 9,3\text{mm}$), dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 9 dargestellt.

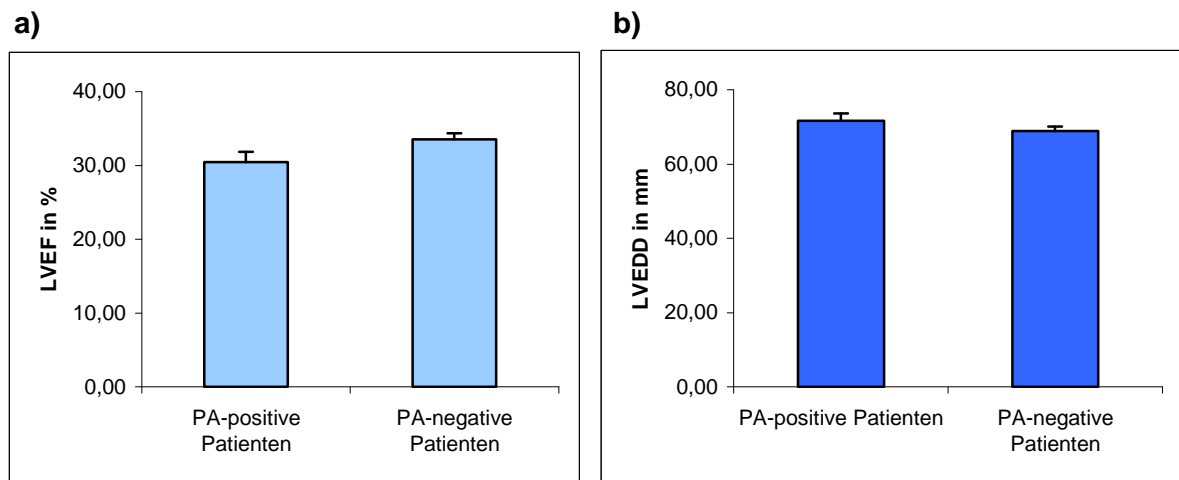


Abb. 9: Vergleich der LVEF und des LVEDD bei PA-positiven vs. PA-negativen Patienten. PA-positiv: $[PA] \geq 26\text{U/ml}$, PA-negativ: $[PA] < 26\text{U/ml}$. **a)** LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, $p < 0,05$. **b)** LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, n.s.

4.3.3 Detektion von viralem Genom in den Endomyokardbiopsien (EMB)

In der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald wurden bei 78 der 90 Patienten EMB entnommen, bei denen das Vorliegen von viralem Genom untersucht wurde [nach (⁷⁹)]. 12 Patienten lehnten eine EMB ab. Bei 31 der 78 Patienten (39,7%) wurde Virus-Genom in der Biopsie nachgewiesen, 47 Patienten (60,3%) waren Virus-negativ. Eine Auflistung der detektierten Viren zeigt die Tabelle 3.

Virus-Befund	Patienten (n=78)	Prozentualer Anteil
Virus-positiv	31	39,7%
Parvovirus B19 (PVB19)	14	17,9%
Humanes Herpesvirus 6 (HHV6)	9	11,5%
PVB19/HHV6	4	5,1%
Ebstein-Barr-Virus (EBV)	2	2,6%
Human Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)	1	1,3%
EBV/HHV6	1	1,3%
Virus-negativ	47	60,3%

Tab. 3: Virus-Befunde in Endomyokardbiopsien von 78 DCM-Patienten. 12 Patienten lehnten eine EMB ab (4 Patienten in der PA-positiven Gruppe, 8 Patienten in der PA-negativen Gruppe). Die prozentuale Berechnung bezieht sich auf die 78 stattgefundenen Biopsien.

Bei dem Vergleich der PA-Titer mit den Befunden der EMB wurde festgestellt, dass in dem Virus-positiven Patientenkollektiv 15 von 31 Patienten (48%) PA-positiv waren ($[PA] \geq 26U/ml$), während in dem Virus-negativen Kollektiv nur 8 von 47 Patienten (17%) über dem Cut off lagen (siehe Abbildung 10). Es fanden sich demnach deutlich mehr PA-positive Patienten unter den Virus-positiv als unter den Virus-negativ getesteten Patienten (Exakter Fisher-Test, $p < 0,001$).

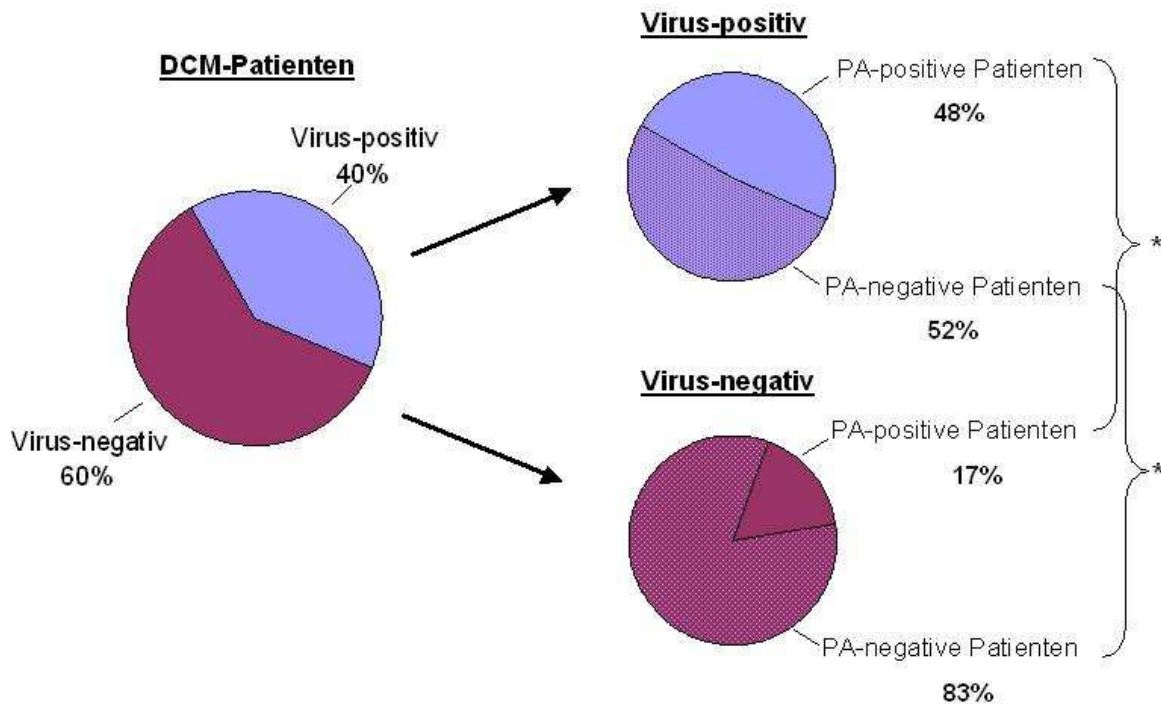


Abb. 10: Vergleich des Anteils PA-positiver und PA-negativer Patienten bei Virus-positiven und Virus-negativen Patienten. PA-positiv: [PA] \geq 26U/ml, PA-negativ: [PA] < 26U/ml * P < 0,001

4.4 Immunadsorption (IA) bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)

4.4.1 Elimination der proteasomalen Autoantikörper (PA) durch die Immunadsorption (IA)

Es ist bekannt, dass die IgG-Konzentration im Serum durch eine IA um ca. 87% reduziert wird (²⁹). Mithilfe des Protokolls zur effektiven Eliminierung der IgG₃-Fraktion ist insbesondere die Reduktion dieser Subklasse um ca. 65% möglich (³⁵).

Zunächst sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die PA im Rahmen der IA effektiv aus den Patientenseren eliminiert wurden. Daher wurden bei einem Teil der Patienten zusätzlich mittels ELISA die PA-Titer in den Serumproben nach dem 5. Tag der IA bestimmt. Hierzu wurden aus der PA-positiven und der PA-negativen Patientengruppe exemplarisch jeweils 12 Patienten für diese Untersuchung zufällig bestimmt. Diese Patienten zeigten vergleichbare Basisparameter wie das Gesamtkollektiv (siehe Tabelle 4).

Der ELISA zeigte, dass die PA in beiden untersuchten Kollektiven effektiv durch die IA eliminiert worden sind. Die PA in der PA-positiven Gruppe wurden um $85,8 \pm 2,1\%$ und in der PA-negativen Gruppe um $89,1 \pm 1,1\%$ reduziert (siehe Tabelle 4).

	PA positiv n = 12	PA negativ n = 12	Signifikanz
Alter (Jahre)*	$51,8 \pm 1,4$	$49,0 \pm 1,9$	n.s.
Geschlecht m/ w (n)	7/ 5	8/ 4	n.s.
Krankheitsdauer (Mon.) [#]	12,5 [6,5-58,0]	16,0 [7,3-74,3]	n.s.
[PA] Baseline [#] (U/ml)	34,2 [30,1-44,3]	12,7 [17,7-23,8]	p < 0,05
[PA] nach der IA [#] (U/ml)	4,4 [3,4-6,2]	2,0 [1,0-2,5]	p < 0,05

Tab. 4: Patientencharakteristika und Ergebnisse des ELISA auf PA der Patientenseren vor und nach der IA. *Mittelwert \pm Standardfehler, [#]Median [25.-75. Perzentile]. PA-positiv: [PA] \geq 26U/ml, PA-negativ: [PA] < 26U/ml.

Die Ergebnisse zur Elimination der PA sollten nun in den Kontext eingeordnet werden, wie die Antikörper in den Patientenseren insgesamt eliminiert worden sind. Dabei sollte insbesondere die Reduktion der IgG₃-Fraktion ermittelt werden, da die Ergebnisse der Westernblots gezeigt haben, dass die PA zu 48% dieser Subklasse angehören. Im *Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie* des Campus Charité Virchow wurden daher die Konzentrationen der gesamten Immunglobuline und der Subklassen IgG₁, IgG₂, IgG₃, und IgG₄ in den 12 PA-positiven Patientenseren bestimmt, bei denen auch die PA-Titer direkt nach der IA gemessen wurden.

Die Auswertung dieser Bestimmung zeigte, dass die Immunglobuline insgesamt um $90,7 \pm 1,8\%$ reduziert worden sind. Dabei wurden $62,6 \pm 4,4\%$ der IgG₃-Subklasse eliminiert, die weiteren Ergebnisse der Messung zeigt die Tabelle 5.

	IgG - gesamt	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄
Reduktion der Antikörper (%)	90,7 ± 1,8	94,6 ± 2,2	90,8 ± 1,8	62,6 ± 4,4	88,9 ± 3,6

Tab. 5: Reduktion der Immunglobuline durch die IA. Dargestellt ist der Mittelwert der Reduktion ± Standardfehler, berechnet nach den Ergebnissen der Messungen des *Zentralinstituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie* des Campus Charité Virchow. Die Bestimmung wurde bei den 12 PA-positiven Patienten durchgeführt, bei denen auch die PA-Titer direkt nach dem 5. Tag der IA gemessen wurden.

Die effektive Elimination der PA sollte im Westernblot exemplarisch bestätigt werden. Die Serumproben vom ersten (vor der IA) und letzten (nach der IA, vor der Immunglobulin-Substitution) Tag des IA-Zyklus wurden nebeneinander mit dem 20S Proteasom inkubiert. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Bandenintensität im Vergleich der Seren vor und nach jedem Zyklus, wie in der Abbildung 11 zu sehen ist.

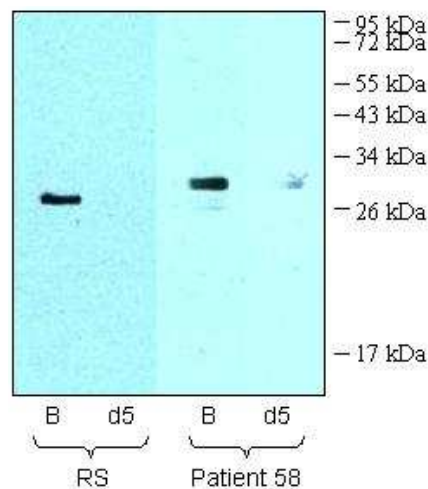


Abb. 11: Westernblots der Patientenserum vor der IA und nach dem letzten Tag der IA. Durchführung der SDS-PAGE und der Westernblots s. Abb. 2. Verdünnung der Seren 1:100. B = Baseline, Serumprobe vor IA-Beginn entnommen. d5 = Serum am 5. Tag des IA-Zyklus nach der IA entnommen. RS = Referenzserum. Die PA werden nach der IA nicht mehr (RS) bzw. deutlich vermindert (Patient 58) detektiert.

Nachdem bestätigt worden ist, dass die PA direkt nach der IA nur noch in sehr geringer Konzentration vorliegen, sollte getestet werden, ob die PA 3 bzw. 6 Monate nach der

IA wieder im Serum nachweisbar sind. Es wurden Westernblots mit den Seren der 27 PA-positiv getesteten Patienten durchgeführt, welche vor der IA und 3 bzw. 6 Monate danach entnommen wurden.

Die Westernblots der Patientenserum 3 und 6 Monate nach der IA zeigten in den meisten Fällen eine Antigenerkennung, deren Muster und Intensität weitestgehend identisch mit den Banden der jeweiligen Patienten vor der IA war. Eine repräsentative Auswahl der Filme zeigt die Abbildung 12.

Um die Beurteilung der Bandenintensität zu objektivieren, wurde eine densitometrische Auswertung durchgeführt. Die Stärken der PA-Banden vor der IA wurden ins Verhältnis zu den Bandenstärken der PA von den Zeitpunkten 3 bzw. 6 Monate nach der IA gesetzt. Die Auswertung zeigte, dass die Bandenintensität zum Zeitpunkt 3 Monate nach der IA durchschnittlich $109,1 \pm 6,3\%$ und zu dem Zeitpunkt 6 Monate nach der IA durchschnittlich $102,0 \pm 4,6\%$ betrug.

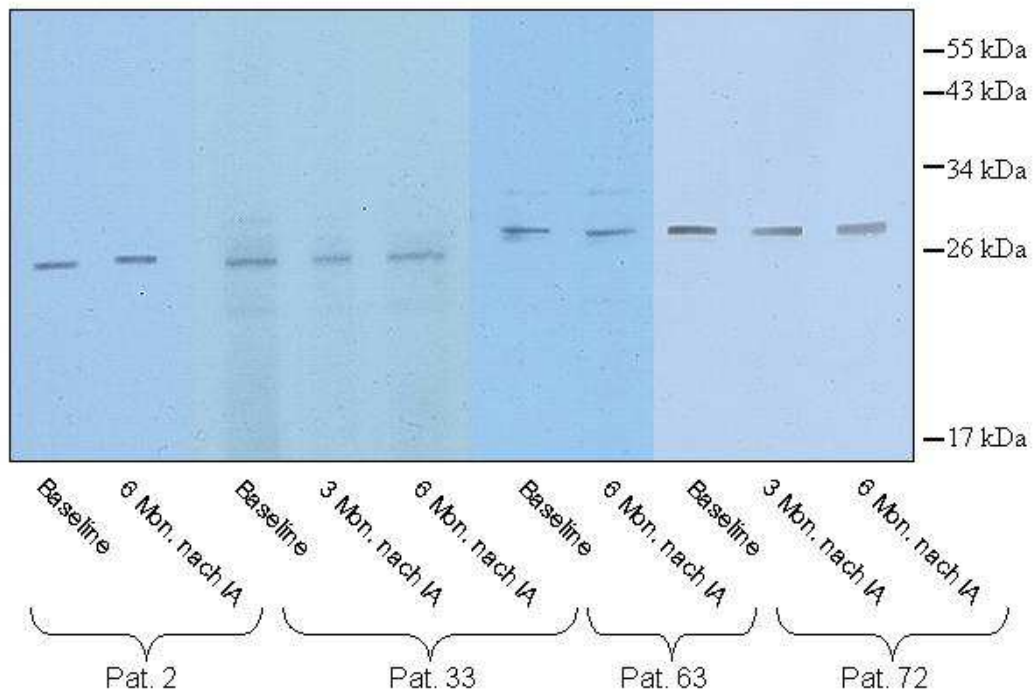


Abb. 12: Westernblots mit den Patientenseren vor und 3 bzw. 6 Mon. nach der IA, gesamt-IgG. Baseline = Probenentnahme vor der IA. Serumproben wurden vor der IA sowie 3 und 6 Monate nach der IA entnommen. Durchführung der SDS-PAGE und der Immunodetektion s. Abb. 2. Die Proben von verschiedenen Entnahmezeitpunkten der einzelnen Patienten wurden nebeneinander geführt. Es lagen nicht von allen Patienten Proben von 3 und 6 Mon. nach der IA vor, daher sind teilweise Versuche mit nur einem Follow-up-Zeitpunkt durchgeführt worden.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass 3 bzw. 6 Monate nach der IA wieder PA in den Seren nachweisbar waren, welche die gleichen Eigenschaften bezüglich der Antigenerkennung wie die bei der IA eliminierten PA besitzen. Nun sollte geprüft werden, ob diese Antikörper auch die gleiche Subklassen-Zusammensetzung zeigen und somit ebenfalls zum großen Teil der IgG₃-Fraktion angehören. Die oben beschriebenen Westernblots mit den Seren von den Zeitpunkten Baseline, 3 und 6 Monate nach der IA wurden daher mit dem sekundären anti Human-IgG₃ Antikörper wiederholt, die weiteren Versuchsparameter waren identisch. Es wurden nur die Patientenseren verwendet, bei denen die PA im obigen Versuch der Subklasse IgG₃ zugeordnet worden sind.

In diesen Westernblots waren die Bandenstärken zu den verschiedenen Zeitpunkten weitestgehend identisch, ebenso wie das Bandenmuster (siehe Abbildung 13). Somit

kann davon ausgegangen werden, dass die 3 bzw. 6 Monate nach der IA in den Seren nachweisbaren PA ebenfalls der IgG₃-Fraktion angehören.

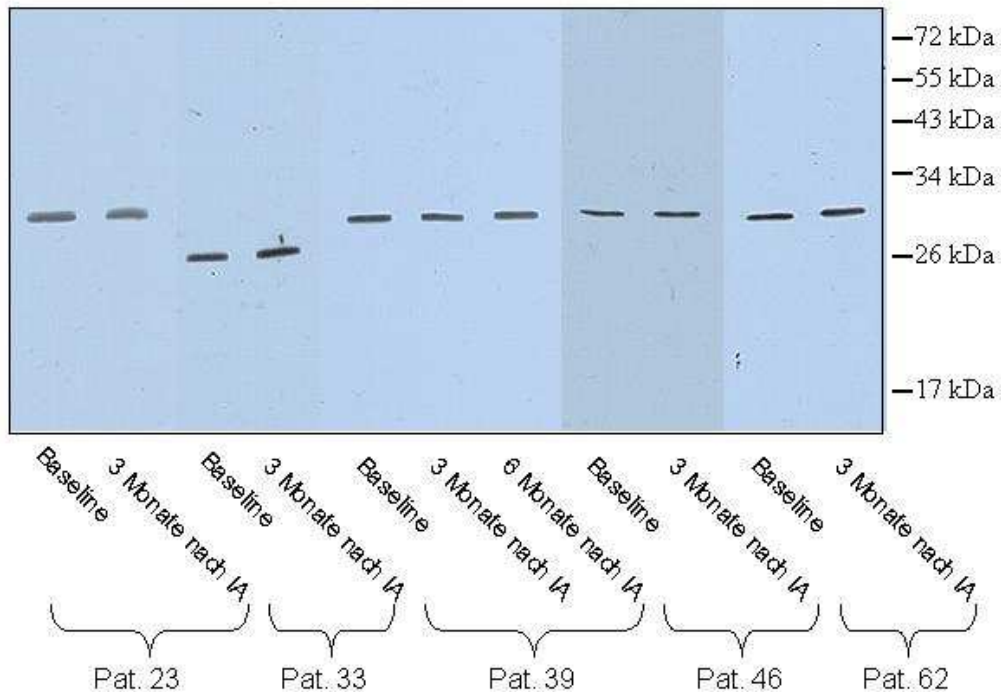


Abb. 13: Westernblots mit den Patientenseren vor und 3 bzw. 6 Mon. nach der IA, IgG₃. Durchführung der SDS-PAGE und der Immunodetektion s. Abb. 2. Sekundärer Antikörper: HRP-markiertes Maus anti Human-IgG₃ IgG, 1:500 verdünnt.

4.4.2 Verbesserung der kardialen Funktion nach der Immunadsorption (IA)

In einzelnen Pilotstudien wurde gezeigt, dass die kardiale Funktion bei der DCM durch eine IA verbessert werden kann^(30;31). Daher wurden Kontrollechokardiographien drei und sechs Monate nach der IA durchgeführt.

Die LVEF war im Gesamtkollektiv der 90 mit IA behandelten DCM-Patienten von $32,7 \pm 0,7\%$ auf $37,3 \pm 1,0\%$ nach drei Monaten ($p < 0,05$ vs. Baseline) und auf $38,6 \pm 0,9\%$ nach sechs Monaten ($p < 0,05$ vs. Baseline) erhöht.

Eine genauere Betrachtung der individuellen Daten der Patienten deutete jedoch auf unterschiedlich ausgeprägte Verbesserungen der LVEF in den verschiedenen Subpopulationen des Patientenkollektivs hin. Diejenigen Patienten, die vor der IA PA-positiv waren ($[PA] > 26U/ml$), zeigten einen geringeren Anstieg der LVEF (= $\Delta LVEF$) gegenüber dem Wert vor der IA (= $LVEF_{Baseline}$) als die PA-negative Gruppe (PA-positiv: $\Delta LVEF_{3mon} = 2,8 \pm 11\%$, $\Delta LVEF_{6mon} = 5,1 \pm 1,3\%$, PA-negativ: $\Delta LVEF_{3mon} = 5,2 \pm 1,0\%$, $\Delta LVEF_{6mon} = 6,5 \pm 1,1\%$, siehe Abbildung 14a). Die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

Weiterhin wurden die DCM-Patienten nach ihrer $LVEF_{Baseline}$ in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei der Cut off bei 33% (= Median der $LVEF_{Baseline}$) festgelegt wurde. Die Patienten, deren $LVEF_{Baseline}$ kleiner bzw. gleich 33% war, reagierten mit einem stärkeren Anstieg der LVEF auf die IA als die Gruppe, deren $LVEF_{Baseline}$ größer als 33% war ($LVEF_{Baseline} \leq 33\%$: $\Delta LVEF_{3mon} = 5,4 \pm 5,4\%$, $\Delta LVEF_{6mon} = 8,1 \pm 1,2\%$, $LVEF_{Baseline} > 33\%$: $\Delta LVEF_{3mon} = 3,5 \pm 1,1\%$, $\Delta LVEF_{6mon} = 3,8 \pm 1,1\%$, siehe Abbildung 14b). Der Unterschied der Verbesserung der LVEF nach 6 Monaten ist statistisch signifikant.

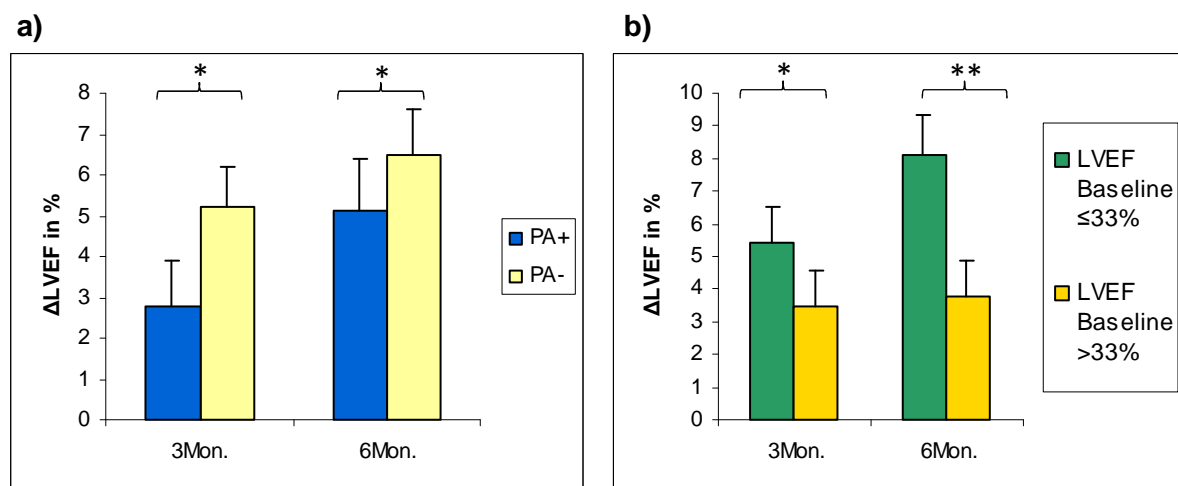


Abb. 14: Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler

a) Vergleich der $\Delta LVEF$ nach 3 Mon. und nach 6 Mon.: PA-positive vs. PA-negative Patienten. PA-positiv: $[PA] \geq 26U/ml$, PA-negativ: $[PA] < 26U/ml$. * n.s.

b) Vergleich der $\Delta LVEF$ nach 3 Mon. und nach 6 Mon.: $LVEF_{Baseline} \leq 33\%$ vs. $> 33\%$. $\Delta LVEF = LVEF_{Baseline} - LVEF_{3Mon.}$ bzw. $LVEF_{6Mon.}$. Der Median der $LVEF_{Baseline}$ beträgt 33%, daher wurde dieser Wert als Cut off verwendet. * n.s., ** $p < 0,05$

Noch deutlicher wurden die Differenzen, wenn diese beiden Baseline-Kriterien miteinander kombiniert wurden. So trat der größte Anstieg der LVEF bei der Subpopulation von Patienten auf, die vor der IA PA-negativ waren und deren $LVEF_{Baseline}$ kleiner oder gleich 33% war, während der geringste Anstieg bei der PA-positiven Gruppe mit einer LVEF größer als 33% stattfand ($LVEF_{Baseline} \leq 33\% / PA-$: $\Delta LVEF_{3Mon.} = 6,3 \pm 1,5\%$; $\Delta LVEF_{6Mon.} = 9,4 \pm 1,7\%$; $LVEF_{Baseline} > 33\% / PA+$: $\Delta LVEF_{3Mon.} = 1,6 \pm 2,0\%$, $\Delta LVEF_{6Mon.} = 3,1 \pm 2,2\%$; $p = 0,061$). Die Daten sind in der Abbildung 15 dargestellt.

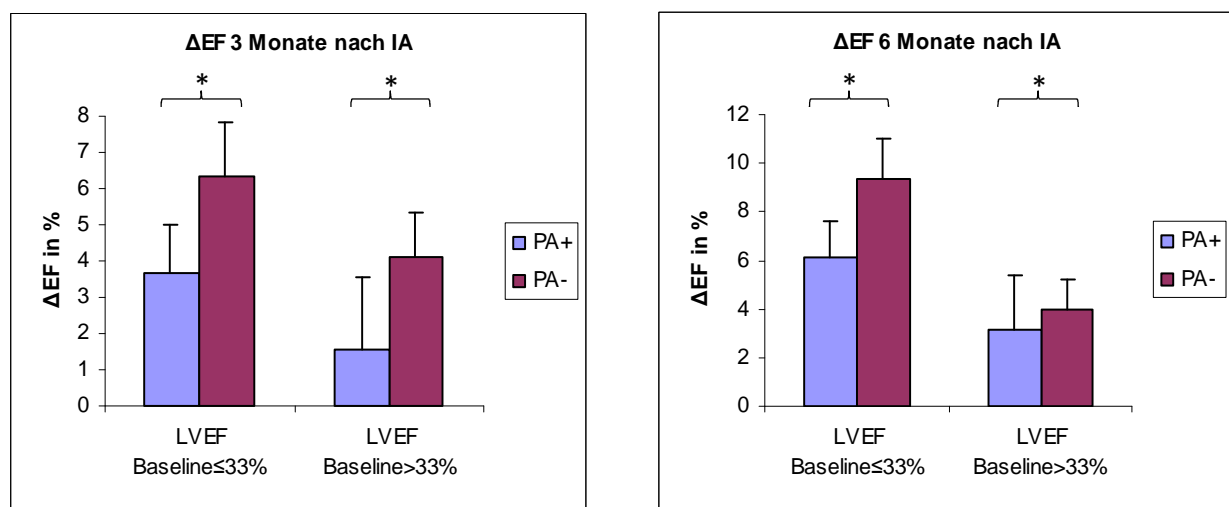


Abb. 15: Vergleich der Zunahme der LVEF nach IA zwischen den Subgruppen $LVEF_{Baseline} \leq 33\%$ / $LVEF_{Baseline} > 33\%$ und PA-positiv / PA-negativ. PA-positiv: $[PA] \geq 26U/ml$, PA-negativ: $[PA] < 26U/ml$. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler. Zu beiden Zeitpunkten ist die $\Delta LVEF$ in der Tendenz am größten, wenn die $LVEF_{Baseline} \leq 33\%$ und die PA negativ sind; die $\Delta LVEF$ ist am kleinsten, wenn die $LVEF_{Baseline} > 33\%$ und die PA positiv sind. * n.s.

Die Unterschiede im Anstieg der LVEF können an den Werten ausgemacht werden, sind jedoch statistisch nicht signifikant. Dies liegt möglicherweise an den teilweise niedrigen Patientenzahlen in den Gruppen. Wie oben beschrieben, ist die durchschnittliche LVEF bei PA-positiven Patienten signifikant niedriger als bei PA-negativen Patienten. Dementsprechend haben in der PA-positiven Gruppe nur ca. 33% der Patienten eine größere $LVEF_{Baseline}$ als 33%, so dass z.B. in der Gruppe PA-positiv / $LVEF_{Baseline} > 33\%$ nur 9 Patienten vorhanden sind. Des Weiteren konnten nicht bei

allen Patienten nach 3 und nach 6 Monaten Echokardiographien durchgeführt werden. Einen Überblick über die Gruppengrößen und die Anzahl der vorhandenen Werte für die LVEF zeigt die Tabelle 6.

	LVEF≤33% / PA+	LVEF≤33% / PA-	LVEF>33% / PA+	LVEF>33% / PA-
Anzahl Patienten	18	30	9	33
Anzahl LVEF-Werte nach 3Mon.	13	26	9	28
Anzahl LVEF-Werte nach 6Mon.	14	23	7	27

Tab. 6: Anzahl der in die Abb. 15 eingehenden Patienten und Werte für die LVEF nach 3 und 6 Monaten. PA-positiv: [PA] ≥ 26U/ml, PA-negativ: [PA] < 26U/ml.

5 Diskussion

5.1 Erhöhte Prävalenz der proteasomalen Autoantikörper (PA) bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)

In der Literatur wird postuliert, dass die Virusmyokarditis eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese der DCM spielt (^{5;83;84}), wobei eine autoimmune Reaktion als Bindeglied vermutet wird (⁵). Wie oben bereits beschrieben, kann die DCM nach Witebsky als Autoimmunkrankheit gewertet werden (²⁸). Ein wichtiges Merkmal der Autoimmunkrankheiten ist die deutlich erhöhte Prävalenz von verschiedenen Autoantikörpern. Bei einer Reihe von autoimmunen Bindegeweberkrankungen wurden Antikörper gegen das 20S Proteasom, einen intrazellulären proteolytischen Komplex, gefunden. Es war Ziel dieser Arbeit, das Vorkommen proteasomaler Autoantikörper (PA) bei der DCM zu überprüfen und diese bei vermehrtem Auftreten näher zu untersuchen.

Es wurden 90 an DCM erkrankte Patienten in die Studie eingeschlossen, als Kontrollen dienten 90 gesunde Kontrollprobanden. Durch einen ELISA wurden bei 30% der DCM-Patienten PA in den Seren nachgewiesen. Die Prävalenz der PA bei der DCM liegt somit in der gleichen Größenordnung wie bei anderen Erkrankungen, bei denen PA gefunden worden sind, z.B. 35 – 58% bei SLE (^{39;68}), 62% bei Myositis (⁶⁸), 39% bei primärem Sjögren-Syndrom (⁶⁹), 13% bei Multipler Sklerose (⁷⁰) und 28% bei der Psoriasis-Arthritis (⁷²).

Die PA erkannten in den meisten Fällen nur eine einzige Untereinheit des Proteasoms, während wenige Patientenserum PA enthielten, die gegen mehrere Untereinheiten gerichtet waren. Dabei war in 44% der Fälle die Untereinheit $\alpha 3$ (C9) das Ziel der anti-proteasomalen Immunität. Diese Beobachtung ist kongruent zu Ergebnissen von Feist et al., die bei Patienten mit SLE, Dermato- und Polymyositis ebenfalls die Untereinheit $\alpha 3$ (C9) als primäres Antigen der PA zeigten (⁶⁸).

Mit der Bindung von PA an das Proteasom beschäftigte sich auch die bereits in der Einleitung erwähnte Studie von Brychcy et al. (⁷⁶). Die Zugabe von PA hatte hier zwar keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität des isolierten 20S Proteasoms, hemmte

jedoch effektiv die Steigerung des Substratumsatzes durch PA28. Da PA28 an die α -Ringe des Proteasoms bindet, wurde von den Autoren vermutet, dass die PA vorwiegend an die α -Untereinheiten binden und somit die Anlagerung von PA28 behindern (⁷⁶). Die Annahme der Bindung der PA an α -Untereinheiten wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt.

In der Studie von Brychcy et al. sowie auch in dem ELISA der vorliegenden Arbeit banden die PA an natives Proteasom, während die Westernblots mit denaturiertem Proteasom angefertigt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit der PA-Bindung an natives und denaturiertes Proteasom wurde ein Kompetitions-Assay durchgeführt: PA-positive Patientenseren wurden vor der Verwendung als primäre Antikörper im Westernblot mit nativem Proteasom inkubiert. Die folgenden Westernblots zeigten keine Reaktion der Seren mit dem denaturierten Proteasom (Daten nicht gezeigt). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die gleichen PA, die ohne die Konkurrenz an denaturiertes Proteasom binden, während der Inkubation Komplexe mit dem nativen Proteasom eingegangen sind.

Weiterhin muss zur Identifikation der vorwiegend von PA erkannten Untereinheit angemerkt werden, dass die Bande, die bei der Auftrennung des 20S Proteasoms in der SDS-PAGE bei 29kDa entsteht, gegebenenfalls nicht nur von der Untereinheit $\alpha 3$ gebildet wird, sondern noch eine weitere Untereinheit beinhalten könnte. Die Versuche dieser Arbeit haben zwar stichprobenweise bestätigt, dass die Patientenseren, die in der eindimensionalen Gelelektrophorese die Untereinheit bei ca. 29kDa erkannten, in der zweidimensionalen Auftrennung an die Untereinheit $\alpha 3$ banden, dieser Beweis ist jedoch nicht für alle Seren geführt worden. Somit ist möglich, dass in Einzelfällen eine andere Untereinheit ähnlichen Molekulargewichts der Untereinheit $\alpha 3$ zugeordnet worden ist. Um die Ergebnisse zweifelsfrei zu bestätigen, könnte z.B. eine Immunkompetition mit den Patientenseren und einer rekombinanten $\alpha 3$ -Untereinheit durchgeführt werden.

Der ELISA und die Westernblots in dieser Arbeit wurden mit aus Erythrozyten gewonnenem 20S Proteasom durchgeführt. Um die Anwendbarkeit der Ergebnisse auf das kardiale Proteasom zu bestätigen, wurden vergleichende Westernblots mit

humanem kardialen Proteasom durchgeführt, welche die gleichen Ergebnisse erbrachten wie die Versuche mit dem Erythrozyten-Proteasom (Daten nicht gezeigt).

5.2 Einordnung der proteasomalen Autoantikörper (PA) in den klinischen Kontext

Zur Beurteilung der PA werden die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit den folgenden Fragen, die der Einordnung der PA in den klinischen Kontext dienen sollen, diskutiert:

1. Wodurch wird die Bildung der PA ausgelöst?
2. Sind PA pathogen?
3. Können PA als diagnostische oder prognostische Parameter dienen?

5.2.1 Produktion von proteasomalen Autoantikörpern durch eine virale Myokarditis

Die anti-proteasomale Immunantwort scheint relativ spezifisch gegen einzelne Untereinheiten des Proteasoms gerichtet zu sein. Es stellt sich die Frage, wodurch diese Immunantwort induziert wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten, in deren Endomyokardbiopsien virales Genom nachgewiesen wurde, signifikant häufiger PA aufwiesen als diejenigen, bei denen keine Viren gefunden wurden. Diese Beobachtung weist auf eine Verbindung zwischen der viralen Infektion des Myokards und der Entstehung von PA hin. Zwei Mechanismen, über die eine virale Infektion die PA-Produktion ausgelöst haben könnte, sind am wahrscheinlichsten: Entweder reagieren die im Laufe der Infektion gegen Virusbestandteile gebildeten Antikörper im Sinne von molekularem Mimikry mit dem 20S Proteasom kreuz, oder der Auslöser für die Antikörperproduktion war Proteasom, welches im Laufe der Infektion aus den Zellen freigesetzt wurde.

Die erstgenannte Möglichkeit ist zwar in der Literatur für andere Autoantikörper beschrieben (^{12;13}), für die PA aber aus zwei Gründen eher unwahrscheinlich. Erstens wurden in unserem Patientenkollektiv 4 verschiedene Viren in den

Endomyokardbiopsien detektiert, so dass es unwahrscheinlich ist, dass diese ein gemeinsames Epitop aufweisen, das in seiner Sequenz dem Proteasom entspricht. Dementsprechend wurde auch kein Anhalt auf einen Zusammenhang zwischen dem detektierten Virus-Typ und der präferentiell von den PA erkannten Untereinheit nachgewiesen (für eine signifikante Aussage sind die Gruppengrößen hier zu klein). Das zweite Gegenargument liefert eine durchgeführte Parvovirus B19-IgM- und -IgG-Serologie unserer Patienten. Das Parvovirus B19 war in Kongruenz mit der Literatur das am häufigsten in den EMB detektierte Virus (^{7;85}). Diejenigen Patientenserum, die Antikörper gegen das Parvovirus aufwiesen, waren jedoch nicht vermehrt PA-positiv (Daten nicht gezeigt). Somit ist eine Kreuzreaktivität von Antikörpern mit dem Parvovirus und dem Proteasom unwahrscheinlich.

Die zweitgenannte These, die eine PA-Produktion als Reaktion auf freigesetztes Proteasom beschreibt, scheint daher plausibler. Sie wird zudem durch die Annahme von Egerer et al. unterstützt, dass im Serum zirkulierendes Proteasom ein Trigger für die Produktion von PA sein könnte (⁸⁶). Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass die beiden Krankheitsentitäten mit den höchsten Titern von im Blut zirkulierendem Proteasom (SLE und autoimmune Myositis) in ihrer Studie diejenigen Erkrankungen waren, bei denen in ihrer früheren Studie auch die höchsten Spiegel der PA detektiert wurden (^{68;86}).

Eine Viruspersistenz kann eine chronische Inflammation auslösen, die entweder durch die antivirale Immunantwort oder durch Autoimmunität verursacht werden kann (⁵). Bei der DCM wurde in unterschiedlicher Prävalenz eine chronische Myokardinflammation beschrieben (^{9;87;88}). Der hieraus resultierende Zelluntergang könnte die Freisetzung des Proteasoms und somit die PA-Produktion bewirken. In unserem Patientenkollektiv waren die Titer des zirkulierenden Proteasoms jedoch bei den PA-negativen und PA-positiven Patienten normwertig (Daten nicht gezeigt). Somit bleibt fraglich, ob die PA mit dem zirkulierenden Proteasom interagieren und somit die Titer beeinflussen oder die fehlende Korrelation zwischen den PA- und Proteasom-Spiegeln gegen einen Zusammenhang spricht.

5.2.2 Pathogenität der proteasomalen Autoantikörper (PA)

Unter der Annahme, dass die PA infolge der Zelluntergangs-bedingten Freisetzung von Proteasom produziert werden, kann diskutiert werden, dass diese Autoantikörper als Epiphänomen ohne weitere funktionelle Bedeutung sind oder dass die PA im weiteren Verlauf der Erkrankung aktiv an der Pathogenese beteiligt sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass bestimmte Autoantikörper bei der Initiation oder Progression der DCM eine bedeutende Rolle spielen. Insbesondere weisen mehrere Studien auf die Pathogenität der Antikörper gegen den β 1-Adrenorezeptor hin ^(26;27). Es stellt sich die Frage, ob auch die PA pathogen sind. Im Folgenden sollen die Argumente für und gegen die mögliche Pathogenität der PA, insbesondere unter Beachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, gegeneinander abgewogen werden.

Die PA-positiven Patienten unserer Studie zeigten gegenüber der PA-negativen Gruppe einen höheren BNP-Wert und eine geringere LVEF. Diese Parameter sind etabliert zur Beurteilung der kardialen Funktion bei Herzinsuffizienz und erlauben daher eine klinische Einschätzung der Schwere der DCM ^(80-82;89). Somit war die Herzinsuffizienz bei den PA-positiven Patienten ausgeprägter als bei der PA-negativen Vergleichsgruppe. Dies könnte darauf hindeuten, dass die PA an der Genese oder Unterhaltung der DCM beteiligt sind. Ebenso ist es jedoch möglich, dass die PA bei stärkerer Schädigung des Herzens, z.B. aufgrund von Zelluntergang, vermehrt auftreten und keine pathogenetische Relevanz haben.

Ein Hinweis auf die mögliche Pathogenität der PA stellt das Ergebnis dar, dass 44% der PA der Subklasse IgG₃ angehören. Die Messungen der IgG-Subklassen in den Patientenseren ergaben, dass die IgG₃-Fraktion 6,7% der gesamten Immunglobuline ausmachte. Dieser Wert ist vereinbar mit Daten aus der Literatur, in welcher der prozentuale Anteil der IgG₃-Subklasse mit 5,0 – 8,4% angegeben wird ⁽⁹⁰⁾. Mit 44% ist der IgG₃-Anteil der PA somit deutlich erhöht im Vergleich zu den gesamten Immunglobulinen.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Antikörper der IgG₃-Subklasse eine besondere Rolle bei der Autoimmunität einnehmen. So konnte gezeigt werden, dass die IgG₃-Fraktion im Vergleich zu den weiteren IgG-Subklassen am potentesten an C1q

bindet und somit am effektivsten das Komplementsystem aktiviert (⁹¹). Staudt et al. haben gezeigt, dass die Verbesserung der kardialen Funktion durch eine IA-Therapie von der Effektivität der IgG₃-Elimination abhängt (³⁴). Dies deutet darauf hin, dass die IgG₃-Fraktion bedeutend an der Unterhaltung der kardialen Schädigung beteiligt ist. Da der Anteil dieser Fraktion bei den PA deutlich größer ist als bei der gesamten Antikörperpopulation, könnte dies auf eine Rolle der PA bei der antikardialen autoimmunen Reaktion hinweisen.

Es muss jedoch angemerkt werden, dass in dieser Arbeit nicht gezeigt wurde, dass die PA, die der IgG₃-Fraktion zugeordnet worden sind, ausschließlich dieser Subklasse angehören. Bei den Patienten, die auf alle 4 Subklassen getestet worden sind, war IgG₃ die deutlich vorherrschende Gruppe. Da für diese Subklasse wie oben beschrieben eine besondere Relevanz bezüglich der Autoimmunität postuliert wird, wurde die Untersuchung von allen PA-positiven Patientenseren auf die IgG₃-Fraktion beschränkt. Um sicher zu stellen, dass nicht in Einzelfällen PA der Subklasse IgG₃ zugeordnet worden sind, die eigentlich zusätzlich von einer anderen Fraktion gebildet werden, müssten die PA hinsichtlich aller 4 Subklassen untersucht werden.

Gegen eine mögliche pathogene Relevanz der PA spricht jedoch, dass das Proteasom ein intrazelluläres Protein ist und unklar ist, wie die PA ihre Antigene erreichen. In der Literatur wurde zwar wiederholt berichtet, dass Antikörper in die Zelle eindringen können (⁹²⁻⁹⁴). Die Mechanismen, mit denen die Antikörper in die Zellen eindringen, sind jedoch nicht bekannt. Es kann in Erwägung gezogen werden, dass geschädigte Kardiomyozyten ggf. eine erhöhte Membranpermeabilität haben und somit ein Eindringen von Antikörpern ermöglichen.

Eine Möglichkeit der biologischen Relevanz der PA ohne eine Penetration der Zellmembran wäre eine Kreuzreaktion der PA mit Proteinen der Zelloberfläche, die intrazelluläre Signalkaskaden auslösen könnten. Da das Proteasom jedoch eine sehr spezifische Sequenz hat, die keinem bisher bekannten Protein des Menschen ähnelt (⁹⁵), ist dies unwahrscheinlich. Diese Vermutung wurde durch Immunfluoreszenz-Experimente unserer Arbeitsgruppe bestätigt, die keine Bindung von affinitätsgereinigten humanen PA an die Zelloberfläche von Kardiomyozyten und Endothelzellen zeigten (⁹⁶). Eine weitere Möglichkeit der extrazellulären Reaktion der

PA mit intakten Zellen besteht durch die Existenz von in die Zellmembran integrierten Proteasomen, die bei Lymphozyten nachgewiesen wurden (⁹⁷). Auf diese Weise werden Anteile des Proteasoms extrazellulär exponiert. Es ist jedoch nicht bekannt, ob auch bei Kardiozyten Proteasomen in der Zellmembran existieren. Im Rahmen der bereits oben erwähnten Immunfluoreszenz- und FACS-Analysen konnten diese nicht dargestellt werden (⁹⁶). Weiterhin ist bisher nicht geklärt, inwiefern das Binden von PA an in die Zellmembran integriertes Proteasom eine Auswirkung auf die Zelle haben könnte.

Ein Beispiel, in dem die Immunantwort ein primär intrazelluläres Antigen in Kardiomyozyten erreichte, war die Induktion einer schweren Entzündung und Fibrose des Herzens durch die Immunisierung mit kardialem Troponin I bei Mäusen (⁹⁸). Durch diese Immunisierung wurde eine autoimmune Reaktion ausgelöst, die zu der Herzschädigung geführt hat. Die Autoren vermuten, dass diese Schädigung durch Binden der Autoantikörper und der autoreaktiven T-Zellen an auf der Oberfläche von ventrikulären Kardiomyozyten exprimiertes Troponin I ausgelöst wurde (⁹⁸). Hier könnten Parallelen zu einer eventuellen Schädigung durch PA liegen. Jedoch besteht ein bedeutender Unterschied in der Tatsache, dass das Proteasom im Gegensatz zum kardialen Troponin I ein ubiquitär vorkommendes Protein ist. Es ist daher unwahrscheinlich, dass eine anti-proteasomale Immunantwort eine so spezifische Erkrankung wie die DCM auslöst, ohne zugleich andere schwere Schäden zu verursachen.

In Übereinstimmung zu diesen Schlussfolgerungen stehen Experimente der oben genannten Studie, bei denen der Einfluss von affinitätsgereinigten humanen PA auf isolierte Kardiomyozyten untersucht wurde. Die PA bewirkten keine signifikante Veränderung der intrazellulären Kalziumströme oder der Kontraktilität der Kardiomyozyten. Ebenso war die Lebensfähigkeit humaner Kardiomyozyten nach Inkubation mit PA nicht relevant verändert (⁹⁶).

Ein weiteres Argument gegen die Pathogenität der PA wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Bestimmung der PA-Titer vor und nach einer IA erbracht. Die PA wurden durch die IA effektiv aus den Patientenseren eliminiert. Die Reduktion um $85,8 \pm 2,1\%$ bei den PA-positiven und $89,1 \pm 1,1\%$ bei den PA-negativen Patienten ist vergleichbar mit bekannten Werten der β 1-Adreneorezeptor-Antikörper-Eliminierung durch eine IA

[Reduktion um ca. 78% direkt nach der IA (²⁹)]. Die PA sind jedoch schon 3 Monate nach ihrer Elimination durch die IA wieder vollständig im Serum nachweisbar, während sich die kardiale Funktion zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu der Untersuchung vor der IA deutlich verbessert hat.

Durch die IA wurde die IgG₃-Fraktion um ca. 62% reduziert. Dies entspricht der von Staudt et al. beschriebenen IgG₃-Elimination von ca. 65% (³⁵). Die nach 3 und 6 Monaten erneut in den Seren nachgewiesenen PA gehörten jedoch wieder zum Großteil der IgG₃-Fraktion an. Weiterhin war das Bandenmuster der von den PA erkannten Proteasom-Untereinheiten vor und nach der IA bei den einzelnen Patienten identisch, variierte jedoch zwischen den Patienten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die nach der IA detektierten mit dem Proteasom reagierenden Antikörper nicht aus den substituierten Immunglobulinen stammen. Die wahrscheinlichste Ursache des Wiederkehrens der PA ist deren Nachproduktion.

6 Monate nach der IA sind die PA-Titer weiterhin nahezu unverändert, während die LVEF verbessert bleibt. Für die Antikörper gegen den β 1-Adrenorezeptor wurde hingegen gezeigt, dass sie nach der Elimination durch die IA auch 3 Monate bzw. 1 Jahr (³¹) und 3 Jahre später (⁹⁹) auf einem niedrigen Spiegel verbleiben.

Es stellt sich die Frage, warum die PA im Gegensatz zu den β 1-Autoantikörpern nachproduziert werden. Ein Grund, dass ein geringer Zelluntergang in besonderem Maße die Produktion von PA stimulieren könnte, liegt darin, dass das Proteasom mit ca. 740 kDa ein relativ großes Protein ist, das ca. 1% der zellulären Proteine ausmacht (⁴⁵). Möglicherweise ist daher das bei Zelluntergang freigesetzte Proteasom ein besonders starker Trigger für die Antikörperproduktion. Ein fortlaufender, geringfügiger Zelluntergang, z.B. durch eine virale Persistenz ausgelöst, wie bei 39,7% unserer Patienten nachgewiesen, könnte somit die Nachproduktion von PA durch B-Gedächtniszellen, nicht aber anderer Autoantikörper stimulieren.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit in Übereinstimmung mit den genannten Argumenten aus der Literatur gegen eine Pathogenität der PA.

5.2.3 Verwendung proteasomaler Autoantikörper (PA) als diagnostische oder prognostische Parameter

In dieser Arbeit sollte weiterhin überprüft werden, ob die PA als diagnostische oder prognostische Marker eingesetzt werden können.

Bei der Diagnosestellung der meisten Autoimmunkrankheiten spielt die Identifikation verschiedener Autoantikörper eine wichtige Rolle⁽³⁶⁾. Die Prävalenz von 30% der PA bei der DCM liegt in der Größenordnung anderer etablierter Marker, z.B. zeigen 25% der SLE-Patienten anti-Sm-Antikörper und 35% zeigen Antiphospholipid-Antikörper, wobei beide Antikörper zu den SLE-Kriterien des *American College of Rheumatology* gehören⁽³⁸⁾. Da die PA bei derart unterschiedlichen Erkrankungen gefunden werden, ist die Spezifität dieser Autoantikörper jedoch sehr gering.

In dieser Arbeit waren die PA mit einer schlechteren kardialen Funktion assoziiert. Dies legt den Einsatz der PA als Marker zur Beurteilung der Herzinsuffizienz nahe. Dieser Zusammenhang zwischen der Herzfunktion und den PA wurde jedoch durch die IA verändert. Während die Patienten mithilfe der IA eine anhaltende Verbesserung ihrer Herzinsuffizienz erfuhren, waren die PA-Titer 3 und 6 Monate nach deren Eliminierung nahezu identisch mit den jeweiligen Ausgangswerten. Somit änderte sich durch die Therapie zwar die kardiale Funktion, nicht jedoch die Konzentration der PA. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass sich die PA-Titer wahrscheinlich auch bei Verbesserungen der Herzfunktion anderen Ursprungs, z.B. durch eine medikamentöse Therapie, nicht (bzw. nicht innerhalb von 6 Monaten) entsprechend verändern werden. Daher scheinen die PA als humoraler Marker des Schweregrades der DCM nicht geeignet.

Die IA ist eine viel versprechende Therapie-Option der DCM, die die Herzinsuffizienz verbessern kann. Es handelt sich jedoch um ein teures und invasives Verfahren, das nicht bei allen Patienten den gleichen Therapieerfolg erzielt. Zum derzeitigen Standpunkt der Forschung ist jedoch nur wenig über prädiktive Faktoren, die den Erfolg der IA bei den einzelnen Patienten mit gesicherter DCM im Vorhinein abschätzen können, bekannt. Staudt et al. haben einen Einstieg in dieses Thema geleistet, indem sie zeigen konnten, dass der Fc γ -Rezeptor-Polymorphismus einen Einfluss auf den

Erfolg einer IA hat. Des Weiteren konnten sie feststellen, dass Patienten mit einer kürzeren Krankheitsdauer ebenso wie Patienten mit einer besonders eingeschränkten linksventrikulären Herzfunktion stärker von der IA profitierten (¹⁰⁰). In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, inwiefern sich PA als weitere prädiktive Marker für den Therapieerfolg einer IA eignen.

Es gab keinen Unterschied zwischen der Verbesserung der kardialen Funktion durch die IA bei PA-positiven und PA-negativen Patienten. Hier sind sicherlich weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv notwendig, denn es besteht die Tendenz, dass PA-negative Patienten stärker von der IA profitieren als die PA-positive Vergleichsgruppe. Im Gegensatz dazu stellte sich heraus, dass Patienten mit einer LVEF < 33% vor der IA deutlicher von der Therapie profitierten als Patienten mit einer LVEF > 33%.

Zur optimalen Beurteilung für den einzelnen Patienten ist es sinnvoll, mehrere prädiktive Faktoren zu kombinieren, um dadurch eine genauere Prognose erstellen zu können. Also wurde in dieser Arbeit die durch die IA bewirkte Verbesserung der LVEF in Abhängigkeit von der PA-Detektion und der LVEF vor der IA (LVEF_{Baseline}) beurteilt. Dabei zeigte sich, dass der größte Therapieerfolg bei der Patientengruppe zu verzeichnen war, die PA-negativ waren und eine LVEF_{Baseline} unter 33% aufwiesen. Entsprechend trat der geringste Therapieerfolg bei der PA-positiven Gruppe mit einer LVEF_{Baseline} über 33% auf. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant; die niedrige Gruppengröße insbesondere der letztgenannten Gruppe könnte hierzu beigetragen haben.

In der Literatur ist bisher nicht bekannt, wie der Zusammenhang einer niedrigeren LVEF oder das Fehlen von PA mit einer besseren Ansprechrate auf eine IA pathogenetisch erklärt werden könnte. Kühl et al. haben gezeigt, dass bei Patienten mit abgelaufener Myokarditis bzw. DCM und viraler Persistenz eine spontane Viruselimination mit einer Besserung der linksventrikulären Funktion assoziiert war. Die kardiale Verbesserung war auch in diesem klinischen Kontext bei den Patienten deutlicher ausgeprägt, deren kardiale Funktion zu Studienbeginn stärker eingeschränkt war (¹⁵). Es sind weitere Studien notwendig, um zu erklären, warum Patienten mit ausgeprägter Herzinsuffizienz

deutlicher von z.B. einer Immunadsorption oder Viruselimination profitieren als Vergleichsgruppen mit einer besseren LVEF.

Unabhängig von den pathogenetischen Hintergründen bleibt die Beobachtung, dass bei Kombination der Beurteilung der LVEF und der PA-Titer vor der IA vielleicht in Zukunft der Erfolg einer IA im Vorhinein genauer abgeschätzt werden kann. Hier sind weitere Studien mit größerer Patientenzahl erforderlich.

6 Zusammenfassung

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) kann über eine autoimmune Reaktion aus einer Virusmyokarditis hervorgehen. Bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten treten vermehrt Antikörper gegen das Proteasom (Proteasomale Autoantikörper, PA) auf. In der vorliegenden Arbeit wurden deren Prävalenz und Eigenschaften bei der DCM getestet. Zusätzlich wurde die Rolle der PA bei der Immunadsorption (IA), einer experimentellen Therapieoption der DCM, untersucht.

In die Studie wurden 90 DCM-Patienten und 90 gesunde Kontrollprobanden eingeschlossen. 30% der DCM-Patienten waren PA-positiv (Cut off = 26U/ml), während nur 3,4% der Kontrollprobanden PA aufwiesen. Die nähere Untersuchung der PA im Westernblot zeigte, dass diese in ca. 44% gegen die Untereinheit $\alpha 3$ gerichtet waren und zu ca. 48% der IgG₃-Subklasse angehörten. Der Vergleich der PA-Titer mit der kardialen Funktion zeigte, dass in der PA-positiven Patientengruppe der NT-pro BNP-Titer gegenüber der PA-negativen Gruppe erhöht und die LVEF in der PA-positiven Gruppe erniedrigt war. Die Assoziation der PA mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz könnte ebenso wie die vorwiegende Zugehörigkeit der PA zu der IgG₃-Subklasse auf eine pathogenetische Relevanz dieser Antikörper hinweisen.

Weiterhin lagen von den Patienten Endomyokardbiopsien (EMB) vor, welche zeigten, dass 48% der Virus-positiven und nur 17% der Virus-negativen DCM-Patienten PA aufwiesen. Dies deutet auf eine virale Beteiligung an der PA-Entstehung hin. Die Untersuchung der nach der IA gewonnenen Proben zeigte eine effektive Elimination der PA durch die IA und eine Restitution der PA-Titer nach 3 und 6 Monaten. Die Verbesserung der kardialen Funktion durch die IA hielt jedoch auch 6 Monate nach der IA weiter an. Dies spricht ebenso wie die intrazelluläre Lokalisation des Proteasoms gegen eine Pathogenität der PA.

Der Vergleich des IA-Erfolgs mit den PA-Titern zeigte die Tendenz einer besseren Ansprechrate der PA-negativen Patienten auf die IA, jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Somit eignen sich die PA nicht als unabhängige Prädiktionsparameter für die IA.

7 Literaturverzeichnis

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006;113:1807-1816.
2. Richardson P, McKenna W, Bristow M et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841-842.
3. Elliott P, Andersson B, Arbustini E et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2008;29:270-276.
4. Pankuweit S, Richter A, Ruppert V et al. [Classification, genetic predisposition and risk factors for the development of cardiomyopathies]. *Internist (Berl)*. 2008;49:441-447.
5. Mason JW. Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link. *Cardiovasc Res*. 2003;60:5-10.
6. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R et al. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation*. 2008;118:639-648.
7. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2005;111:887-893.
8. Parrillo JE, Aretz HT, Palacios I et al. The results of transvenous endomyocardial biopsy can frequently be used to diagnose myocardial diseases in patients with idiopathic heart failure. Endomyocardial biopsies in 100 consecutive patients revealed a substantial incidence of myocarditis. *Circulation*. 1984;69:93-101.
9. Shanes JG, Ghali J, Billingham ME et al. Interobserver variability in the pathologic interpretation of endomyocardial biopsy results. *Circulation*. 1987;75:401-405.
10. Noutsias M, Pauschinger M, Poller WC et al. Immunomodulatory treatment strategies in inflammatory cardiomyopathy: current status and future perspectives. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2004;2:37-51.
11. Mackay IR, Leskovsek NV, Rose NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun*. 2008;30:5-11.
12. Klingel K, Sauter M, Bock CT et al. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol*. 2004;193:101-107.

13. Gauntt CJ, Higdon AL, Arizpe HM et al. Epitopes shared between coxsackievirus B3 (CVB3) and normal heart tissue contribute to CVB3-induced murine myocarditis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993;68:129-134.
14. Maisch B, Richter A, Sandmoller A et al. Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI). *Herz*. 2005;30:535-544.
15. Kuhl U, Pauschinger M, Seeberg B et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation*. 2005;112:1965-1970.
16. Why HJ, Meany BT, Richardson PJ et al. Clinical and prognostic significance of detection of enteroviral RNA in the myocardium of patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1994;89:2582-2589.
17. Shioi T, Matsumori A, Sasayama S. Persistent expression of cytokine in the chronic stage of viral myocarditis in mice. *Circulation*. 1996;94:2930-2937.
18. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H et al. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J*. 1994;72:561-566.
19. Andreoletti L, Hober D, Becquart P et al. Experimental CVB3-induced chronic myocarditis in two murine strains: evidence of interrelationships between virus replication and myocardial damage in persistent cardiac infection. *J Med Virol*. 1997;52:206-214.
20. Huber M, Watson KA, Selinka HC et al. Cleavage of RasGAP and phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in the course of coxsackievirus B3 replication. *J Virol*. 1999;73:3587-3594.
21. Caforio AL, Grazzini M, Mann JM et al. Identification of alpha- and beta-cardiac myosin heavy chain isoforms as major autoantigens in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1992;85:1734-1742.
22. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 1989;64:97-103.
23. Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH et al. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1993;91:1964-1968.
24. Schulze K, Becker BF, Schauer R et al. Antibodies to ADP-ATP carrier--an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy--impair cardiac function. *Circulation*. 1990;81:959-969.
25. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F et al. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation*. 1994;89:2760-2767.
26. Matsui S, Fu ML, Katsuda S et al. Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:641-655.

27. Jahns R, Boivin V, Hein L et al. Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2004;113:1419-1429.
28. Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today.* 1993;14:426-430.
29. Dorffel WV, Felix SB, Wallukat G et al. Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1997;95:1994-1997.
30. Felix SB, Staudt A, Dorffel WV et al. Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1590-1598.
31. Muller J, Wallukat G, Dandel M et al. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2000;101:385-391.
32. Staudt A, Staudt Y, Dorr M et al. Potential role of humoral immunity in cardiac dysfunction of patients suffering from dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:829-836.
33. Felix SB, Staudt A, Landsberger M et al. Removal of cardiodepressant antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:646-652.
34. Staudt A, Bohm M, Knebel F et al. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 2002;106:2448-2453.
35. Staudt A, Dorr M, Staudt Y et al. Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy: results from protein A immunoadsorption. *Am Heart J.* 2005;150:729-736.
36. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1995;24:323-358.
37. Tan EM. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell.* 1991;67:841-842.
38. Herold G. Rheumatologie. Innere Medizin. Köln: 2005: 557-584.
39. Arribas J, Luz RM, Alvarez-Do FR et al. Autoantibodies against the multicatalytic proteinase in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 1991;173:423-427.
40. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:1015-1068.
41. Kloetzel PM. The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1695:225-233.
42. Lehner PJ, Cresswell P. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:59-67.

43. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:739-779.
44. Bochtler M, Ditzel L, Groll M et al. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1999;28:295-317.
45. Tanaka K, Ii K, Ichihara A et al. A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem.* 1986;261:15197-15203.
46. Groll M, Ditzel L, Lowe J et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 1997;386:463-471.
47. Groll M, Bajorek M, Kohler A et al. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol.* 2000;7:1062-1067.
48. Rechsteiner M, Hill CP. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* 2005;15:27-33.
49. Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J et al. Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem.* 2000;267:6221-6230.
50. Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell.* 1999;97:431-434.
51. Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL et al. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 1994;78:773-785.
52. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001;8:739-758.
53. Rock KL, Gramm C, Rothstein L et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994;78:761-771.
54. Yang Y, Waters JB, Fruh K et al. Proteasomes are regulated by interferon gamma: implications for antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:4928-4932.
55. Groettrup M, Kraft R, Kostka S et al. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol.* 1996;26:863-869.
56. Hisamatsu H, Shimbara N, Saito Y et al. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J Exp Med.* 1996;183:1807-1816.
57. Kesmir C, van N, V, de Boer RJ et al. Bioinformatic analysis of functional differences between the immunoproteasome and the constitutive proteasome. *Immunogenetics.* 2003;55:437-449.

58. Eleuteri AM, Kohanski RA, Cardozo C et al. Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *J Biol Chem.* 1997;272:11824-11831.
59. Stohwasser R, Standera S, Peters I et al. Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits. *Eur J Immunol.* 1997;27:1182-1187.
60. Khan S, van den BM, Schwarz K et al. Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol.* 2001;167:6859-6868.
61. Powell SR. The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291:H1-H19.
62. Weekes J, Morrison K, Mullen A et al. Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics.* 2003;3:208-216.
63. Willis MS, Patterson C. Into the heart: the emerging role of the ubiquitin-proteasome system. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;41:567-579.
64. Young GW, Wang Y, Ping P. Understanding proteasome assembly and regulation: importance to cardiovascular medicine. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18:93-98.
65. Patterson C, Ike C, Willis PW et al. The bitter end: the ubiquitin-proteasome system and cardiac dysfunction. *Circulation.* 2007;115:1456-1463.
66. Campbell B, Adams J, Shin YK et al. Cardioprotective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:467-476.
67. Pye J, Ardeshirpour F, McCain A et al. Proteasome inhibition ablates activation of NF-kappa B in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H919-H926.
68. Feist E, Dorner T, Kuckelkorn U et al. 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;184:1313-1318.
69. Feist E, Kuckelkorn U, Dorner T et al. Autoantibodies in primary Sjogren's syndrome are directed against proteasomal subunits of the alpha and beta type. *Arthritis Rheum.* 1999;42:697-702.
70. Thuy-Tien H, Haugen M, Aarseth J et al. Proteasome antibodies in patients with cancer or multiple sclerosis. *Scand J Immunol.* 2008;67:400-403.
71. Mayo I, Arribas J, Villoslada P et al. The proteasome is a major autoantigen in multiple sclerosis. *Brain.* 2002;125:2658-2667.

72. Colmegna I, Sainz B, Jr., Citera G et al. Anti-20S proteasome antibodies in psoriatic arthritis. *J Rheumatol*. 2008;35:674-676.
73. Kordonouri O, Meyer K, Egerer K et al. Prevalence of 20S proteasome, anti-nuclear and thyroid antibodies in young patients at onset of type 1 diabetes mellitus and the risk of autoimmune thyroiditis. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2004;17:975-981.
74. Storstein A, Knudsen A, Vedeler CA. Proteasome antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroimmunol*. 2005;165:172-178.
75. Feist E, Dorner T, Kuckelkorn U et al. Diagnostic importance of anti-proteasome antibodies. *Int Arch Allergy Immunol*. 2000;123:92-97.
76. Brychcy M, Kuckelkorn U, Hausdorf G et al. Anti-20S proteasome autoantibodies inhibit proteasome stimulation by proteasome activator PA28. *Arthritis Rheum*. 2006;54:2175-2183.
77. Knockaert DC. Cardiac involvement in systemic inflammatory diseases. *Eur Heart J*. 2007;28:1797-1804.
78. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1987;1:3-14.
79. Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC et al. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation*. 2006;114:1581-1590.
80. Hammerer-Lercher A, Neubauer E, Muller S et al. Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. *Clin Chim Acta*. 2001;310:193-197.
81. Kruger S, Hoffmann R, Graf J et al. [Brain natriuretic Peptide. Diagnostic and prognostic value in chronic heart failure]. *Med Klin (Munich)*. 2003;98:562-567.
82. Selvais PL, Donckier JE, Robert A et al. Cardiac natriuretic peptides for diagnosis and risk stratification in heart failure: influences of left ventricular dysfunction and coronary artery disease on cardiac hormonal activation. *Eur J Clin Invest*. 1998;28:636-642.
83. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation*. 1999;99:1091-1100.
84. Wessely R, Klingel K, Santana LF et al. Transgenic expression of replication-restricted enteroviral genomes in heart muscle induces defective excitation-contraction coupling and dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1998;102:1444-1453.
85. Kandolf R. [Virus etiology of inflammatory cardiomyopathy]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2004;129:2187-2192.

86. Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE et al. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol.* 2002;29:2045-2052.
87. Kuhl U, Noutsias M, Seeberg B et al. Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy. *Heart.* 1996;75:295-300.
88. Noutsias M, Seeberg B, Schultheiss HP et al. Expression of cell adhesion molecules in dilated cardiomyopathy: evidence for endothelial activation in inflammatory cardiomyopathy. *Circulation.* 1999;99:2124-2131.
89. Ahmad S, Otaal PS, Rai TS et al. Circulating proinflammatory cytokines and N-terminal pro-brain natriuretic peptide significantly decrease with recovery of left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 2009;324:139-145.
90. Hamilton RG. Human IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin Chem.* 1987;33:1707-1725.
91. Bruggemann M, Williams GT, Bindon CI et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med.* 1987;166:1351-1361.
92. Deng SX, Hanson E, Sanz I. In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *Int Immunol.* 2000;12:415-423.
93. Alarcon-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature.* 1978;271:67-69.
94. Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol.* 1997;159:2033-2041.
95. Monaco JJ, Nandi D. The genetics of proteasomes and antigen processing. *Annu Rev Genet.* 1995;29:729-754.
96. Voigt A, Trimpert C, Bartel K et al. Lack of evidence for a pathogenic role of proteasome-directed autoimmunity in dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:557-567.
97. Bureau JP, Olink-Coux M, Brouard N et al. Characterization of prosomes in human lymphocyte subpopulations and their presence as surface antigens. *Exp Cell Res.* 1997;231:50-60.
98. Goser S, Andrassy M, Buss SJ et al. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation.* 2006;114:1693-1702.
99. Dorffel WV, Wallukat G, Dorffel Y et al. Immunoabsorption in idiopathic dilated cardiomyopathy, a 3-year follow-up. *Int J Cardiol.* 2004;97:529-534.

100. Staudt A, Herda LR, Trimpert C et al. Fcγ-receptor IIa polymorphism and the role of immunoadsorption in cardiac dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87:452-458.

8 Anhänge

8.1 Publikationsliste

1. Bartel K, Egerer K, Klingel K, Staudt A, Gericke C, Stangl K, Kuckelkorn U, Kloetzel P, Voigt A. The prevalence of circulating 20S proteasomes and the role of anti-proteasomal antibodies in congestive heart failure. European Students' Conference 2007.
2. Voigt A, Bartel K, Egerer K, Trimpert C, Feist E, Gericke C, Kandolf R, Klingel K, Kuckelkorn U, Stangl K, Felix SB, Baumann G, Kloetzel PM, Staudt A. Humoral anti-proteasomal autoimmunity in dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:9-18.
3. Voigt A, Trimpert C, Bartel K, Egerer K, Kuckelkorn U, Feist E, Gericke C, Klingel K, Kandolf R, Felix SB, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl K, Staudt A. Lack of evidence for a pathogenic role of proteasome-directed autoimmunity in dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:557-567.

8.2 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei dem Projektleiter Herrn Prof. Dr. Stangl (Charité Campus Mitte, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie) bedanken, der mir diese Arbeit ermöglicht hat. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Antje Voigt (Charité Campus Mitte, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie), die meine Arbeit betreut hat. Ihr ist nicht nur die spannende Aufgabenstellung zu verdanken, sie hat mich auch ins wissenschaftliche Arbeiten eingeführt und stand mir stets hilfsbereit zur Seite.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kloetzel (Charité, Institut für Biochemie) bedanken, der mir einen Arbeitsplatz in seinen Laboren zur Verfügung gestellt hat. Auf diese Weise konnte ich im direkten Umfeld seiner Arbeitsgruppe arbeiten und von deren herausragendem Wissen über das Proteasom sowie den nötigen technischen Voraussetzungen profitieren. Hervorheben möchte ich hier besonders Frau Dr. Ulrike Kuckelkorn (Charité, Institut für Biochemie), die beständig wertvolle Anregungen sowohl zur Theorie als auch zur Praxis beigesteuert hat. Besonders möchte ich mich auch bei Frau Ilse Drung für die vielen Tipps und Tricks und die freundliche Atmosphäre, die sie im Labor verbreitet hat, bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Alexander Staudt (Helios Kliniken Schwerin, Klinik für Kardiologie und Angiologie) und Frau Christiane Trimpert (Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Klinik für Innere Medizin B) die die Patienten in die Studie eingeschlossen, die klinischen Daten erhoben, die Immunadsorption durchgeführt und die Serumproben akquiriert haben. Ebenso bedanke ich mich für die Durchführung des ELISA auf Proteasomale Autoantikörper bei Herrn Dr. Karl Egerer (Charité Campus Mitte, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie) und bei Frau Dr. Ursula Zimny-Arndt (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie) für die Anfertigung der hervorragenden 2D-Gele. Frau Dipl. Math. Gericke (Charité, Institut für Medizinische Biometrie) bin ich sehr dankbar für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen. Alexander Rabe und Frau Dr. Katharina Janek (Charité, Institut für Biochemie) danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Massenspektroskopie.

Der Charité bin ich sehr dankbar für die Forschungsstipendien, die mir gewährt wurden.

8.3 Lebenslauf

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

8.4 Erklärung

„Ich, Katrin Bartel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Proteasomale Autoantikörper in der Dilatativen Kardiomyopathie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

20.10.2010

Datum

Unterschrift