
Aus dem Charité Zentrum 11- Klinik für Kardiologie und Pulmologie der Medizinischen
Fakultät der Charité – Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION
**Entwicklung eines Autoantikörper-Multiplex-ELISA's
zur Diagnostik von Kardiomyopathien**

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

von
Gustav Hauck
aus New York

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract	2
2 EINLEITUNG	4
2.1 Herzmuskelerkrankungen (Kardiomyopathien)	4
2.1.1 Häufigkeit und Ursachen.....	5
2.2 Diagnostik der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)	6
2.3 Pathogenese der autoimmunologischen DCM.....	7
2.4 Myokardiale Antikörper	8
2.4.1 Mitochondriale Autoantigene.....	9
2.4.2 Oberflächenrezeptorautoantikörper	9
2.4.3 Sarkolemm-Autoantikörper (Kardiales Myosin/Troponin)	10
2.4.4 Nachweismethoden kardialer Autoantikörper	11
2.5 Zielsetzung	12
3 MATERIAL UND METHODEN	13
3.1 Material	13
3.1.1 Untersuchungsmaterial, Patientenkollektiv, klinische Daten	13
3.1.2 Kardiale Antigene	14
3.1.3 Fängerantikörper.....	15
3.1.4 Chemikalien	16
3.1.5 Lösungen	16
3.1.6 Puffer.....	16
3.1.7 Puffer.....	17
3.1.8 Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien	17
3.1.9 Software	18
3.2 Immunfluoreszenz auf Affenherzmuskeln (Fa. Euroimmun).....	19
3.3 Einzel-ELISA für β1-adrenerge Rezeptoren (Fa. CellTrend)	21
3.4 Entwicklung des Single- und Multiplex-ELISA	22

3.4.1	Proteinkopplungsreaktion	22
3.4.2	Immunisierung Kaninchen.....	26
3.4.3	Singleplex-ELISA	26
3.4.4	Multiplex-ELISA.....	26
3.5	Western Blot	30
3.6	Statistische Verfahren	31
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Immunfluoreszenz auf Affenherzmuskeln (Fa. Euroimmun).....	32
4.2	Einzel-ELISA auf β1-adrenergen Rezeptor-Antikörper (Fa. CellTrend) ..	34
4.3	Beginn Aufbau der Methode: Singleplex-ELISA	36
4.3.1	Kalibrierung des Bio-Plex Suspension-Array-Systems.....	37
4.3.2	Aufbau des Singleplex-ELISA mit immunisierten Kaninchenseren ..	38
4.3.3	Etablierung mit humanen Seren	45
4.4	Multiplex-ELISA	51
4.4.1	Resultatvergleich zwischen Single- und Multiplex-Assay.....	51
4.4.2	Kontinuitätsmessung der ausgewählten Patientenproben	53
4.4.3	Messung der ausgewählten Patientenseren im Multiplex (Acht Antigene)	55
4.5	Diagnostische Anwendung in Multiplex-ELISA	58
4.5.1	Messung Patientendaten	60
4.5.2	Aufspaltung der Virusgruppe.....	67
4.5.3	Vergleich der Ergebnisse mit kommerziellem ELISA	72
4.6	Klinische Korrelation Patientendaten CellTrend und Multiplex-ELISA .	73
5	DISKUSSION	75
5.1	Übersicht über die Arbeit	75
5.2	Aufbau des Multiplex ELISA's	75
5.3	Multiplex-ELISA und Vergleich mit der Literatur.....	79
5.4	Messungen von humanen Testseren	80
5.5	Vergleichsmessungen von humanen Testseren.....	82
5.6	Autoantikörper gegen den β1-adrenergen Rezeptor (Einzel-ELISA- und Multiplex-ELISA-Messung)	83
5.7	Autoantikörper gegen Adenin-Nucleotid-Translokase, kardiales Myosin, kardiales Troponin	84

5.8 Beantwortung der Fragestellung	90
Quellenverzeichnis	XCII
Eidesstattliche Erklärung	CIII
Lebenslauf	CIV
Danksagung	CVI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese einer DCM.....	7
Abbildung 2: Bindungsreaktion der Beads mit einem Protein.....	22
Abbildung 3: Bio-Plex Suspension Array	27
Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopie nach Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne (Humanserum 4593)	34
Abbildung 5: ELISA für AK gegen β 1-adrenerger Rezeptor (Fa. Celltrend)	35
Abbildung 6: Vergleich der Kalibrierung "High" und "Low".....	37
Abbildung 7: Vergleich der Kaninchenseren (1 und 2).....	39
Abbildung 8: Westernblot der immunisierten Kaninchenseren	41
Abbildung 9: Abweichung bei der Dreifachbestimmung (Kaninchenseren)	43
Abbildung 10: Vergleich der Verdünnungsmittel bei Kaninchenseren.....	45
Abbildung 11: Negative Reaktion bei humanen Seren.....	46
Abbildung 12: Vergleich der Verdünnungsmittel (humane Seren)	48
Abbildung 13: Standardabweichungen zwischen Doppelbestimmungen FängerAK/Sa-Pe	50
Abbildung 14: Vergleich Multi- mit Singleplex (Pat 4621)	52
Abbildung 15: Vergleich Multi- mit Singleplex (Pat. 4680)	53
Abbildung 16: Messung Multiplex-Assay über die Zeit	54
Abbildung 17: Durchschnittswerte des Patienten 4593 im Multiplex-ELISA mit acht Autoantikörpern	55
Abbildung 18: Durchschnittswerte des Patienten 4680 im Multiplex-ELISA mit acht Autoantikörpern	56
Abbildung 19: Korrelation ARA (Verdünnungen 1 zu 200 u. 1 zu 400)	58
Abbildung 20: Kontrollen Gesamtübersicht mit SD	59
Abbildung 21: Messwerte von Autoantikörpern gegen ANT 2 bei Verdünnung 1 zu 200	61
Abbildung 22: CMA 2, Verdünnung 1 zu 200	62
Abbildung 23: CTA1, Verdünnung 1 zu 200	64
Abbildung 24: CTA1, Verdünnung 1 zu 200 mit Schwellwert	64
Abbildung 25: CTA1, 1 zu 200 nur positive Werte	65
Abbildung 26: Darstellung COX A und B im Vergleich, CTA2	69

Abbildung 27: Vergleich der Gruppe Cox A und B mit DCM, MCa und Kontrollen (exemplarisch CTA1)	70
Abbildung 28: Korrelation β -1AR AK CellTrend zu Multiplex (Verd. 1 zu 200)	72
Abbildung 29: β -1AR (ARA) Gruppen Multiplex, 1 zu 200.....	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosen und Anzahl der Patientenkohorte	14
Tabelle 2: Peptidsequenzen der getesteten kardialen Autoantigene	15
Tabelle 3: Ergebnisse Referenzpatienten Euroimmun	33
Tabelle 4: Ergebniszusammenfassung für die einzelnen klinischen Gruppen (CellTrend).....	36
Tabelle 5: Resultat der SD (Einstellung "High" und "Low")	38
Tabelle 6: Resultat SD Kaninchenserum	40
Tabelle 7: Ergebnisse Kaninchenserum in unterschiedlichen Verdünnungen	42
Tabelle 8: Beispiel für eine Tabelle	44
Tabelle 9: Versuchsanordnungen: negative“ Reaktion	47
Tabelle 10: Unterschiedliche Verdünnungsmittel humanes Serum ANT2	48
Tabelle 11: Unterschiedliche Verdünnungsmittel humanes Serum ARA1	49
Tabelle 12: Fängerantikörper/Streptavidin-PE, Standardabweichungen in %	50
Tabelle 13: Ergebnisse Vergleich Multi- und Singleplex (Pat 4621)	51
Tabelle 14: Ergebnisse Vergleich Multi- und Singleplex (Pat 4680)	52
Tabelle 15: Standardabweichung Messergebnisse (Pat 4593)	56
Tabelle 16: Standardabweichung Messergebnisse (Pat 4680)	57
Tabelle 17: Median und Standardabweichung der Kontrollgruppe	59
Tabelle 18: Klinische und PCR-Diagnosen der vier Untersuchungsgruppen	60
Tabelle 19: p-Werte des Kruskal-Wallis-Testes für die Autoantikörper- Konzentrationen	62
Tabelle 20: Positive Autoantikörper in Prozent für die vier Untersuchungsgruppen	66
Tabelle 21: Messwerte Autoantikörper von coxsakiepositiven Patienten zur 1. Biopsie (Cox A) und Nachfolgebiopsie (Cox B)	67
Tabelle 22: Vergleich der p-Werte 5 Gruppen gegen 4 Gruppen. bei weiterer Aufspaltung der Virus-Gruppe	71
Tabelle 23: Vergleich der Anteil der positiven Patienten (Einzel-ELISA (Fa. Celltrend) gegen Multiplex-ELISA)	73

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige Zytotoxizität (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
ADP	Adenosindiphosphat
ADV	Aleutian-Disease-Virus
AK	Antikörper
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
ARA	β 1- adrenerger Rezeptor- Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
CBF	Charité Campus Benjamin Franklin
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität (Complement Dependent Cytotoxicity)
CMA	Antikörper gegen kardiales Myosin
Cox	Coxsackievirus
CTA	Kardiale Troponinantikörper
CVB3	Coxsackievirus B3
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DCMi	Inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
EDC	N-(3-Diethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide Hydrochloride
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESC	European Society of Cardiology
Fa.	Firma
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
gek.	gekoppelt
HF	Herzinsuffizienz (Heart Failure, HF)
HHV	Humanes Herpesvirus
HMA	Positivkontrolle gegen Querstreifung (Euroimmun), human
Hrsg.	Herausgeber
IKDT	Institut Kardiale Diagnostik und Therapie
Inf.	Infektion
Kan.	Kaninchen

LPS	nested-(RT)-PCR Nested - (Reverse Transkriptase) - polymerase chain reaction
Ø	nicht vorhanden
Pat.	Patient
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	polymerase chain reaction
RIA	Radioimmunassays
S-NHS	N- Hydroxysulfosuccinimide Sodium Salt
SCD	plötzlicher Herztod (Sudden Cardiac Death)
SD	Standardabweichung
Tbl	Tabelle
u.a.	unter anderem

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Zusammenfassung

Bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) sollen in ca. 50 % kardiale Autoantikörper pathogenetisch von Bedeutung sein. Die Diagnose erfolgt durch eine Endomyokardbiopsie. Für den serologischen Nachweis gibt es zurzeit nur wenige Einzel-ELISA-Methoden. Ziel dieser Arbeit war es, einen Multiplex-ELISA zu entwickeln, der mehrere Autoantikörper bei Patienten mit DCM detektieren und quantifizieren kann.

Es wurden für fünf in der Literatur als kardiale Autoantigene bekannte Proteine (Adenin-Nucleotid-Translokase, β 1-adrenerger Rezeptor, kardiales Myosin und kardiales Troponin insgesamt acht Peptide (10-29 Aminosäuren lang) ausgewählt. Diese Antigene wurden in einem Kopplungsverfahren an verschiedenfarbige fluoreszenz-markierte Mikropartikel (Beads) gebunden, die später eine Zuordnung zum untersuchten Analyten zulassen. In Patientenserum vorhandene Autoantikörper sollen an die Peptide binden, werden mit einem Zweitantikörper markiert und durch eine durchflusszytometrisches Verfahren (Luminex-Technologie) vermessen. Im ersten Schritt wurden die jeweiligen Einzelnachweise entwickelt und optimiert. Später wurde dieser Einzeltest zu einem multiparametrischen Test vereint, welche dann die parallele Messung von acht Autoantikörpern in Patientenserum ermöglicht.

Mit diesem Multiplex-Test wurden dann Serum von 78 myokardbiopsisch eindeutig charakterisierten Patienten aus vier Untersuchungsgruppen untersucht: DCM, akute Myokarditis (MCA), Myokardkrankungen mit positivem Virusnachweis und definierte Kontrollen (ohne Virus, ohne Entzündung). Die Fluoreszenzwerte der Autoantikörper-Tests wurden zu den klinischen Angaben korreliert. Die Standardisierung der Methode war bei optimierten Verdünnungen der Humanserum und der genutzten Agenzien möglich. Die Inter- und Intraassay-Varianz betrug ca. 10%. Die Korrelation zum einzig verfügbaren kommerziellen Einzel-ELISA für den β 1-adrenergen Autoantikörper war hochsignifikant. Ebenfalls korrelierten einige der Autoantikörperkonzentrationen zu biopsischen Diagnosen.

Der Antikörper gegen den beta1-adrenergen Rezeptor konnten bei 48 % der DCM-Patienten nachgewiesen werden, in der Virusgruppe betrug der Anteil sogar 49 %. Aber auch 33 % der MCA-Patienten waren positiv. Somit hat sich eine vorrangige Repräsentanz dieses Autoantikörpers bei diesen Krankheitsgruppen gezeigt. Einige Patienten der DCM

und besonders der Virusgruppe (überwiegend Coxsackievirus) wiesen hohe Antikörperspiegel für eine Sequenz von kardialem Myosin auf. Bemerkenswerterweise waren bei der MCa-Autoantikörper gegen mehrere Peptide (Adenin-Nukleosin-Translokase, kardiales Myosin, kardiales Troponin) praktisch nicht nachweisbar.

In dieser Arbeit wurde erstmalig ein multiparametrischer ELISA für Autoimmunantikörper bei Kardiomyopathie entwickelt. Es wurden kurze Peptidbereiche des Gesamtproteins als myokardiale Antigene gewählt. Daher war es nur möglich, Autoantikörper in den vorliegenden Humanseren gegen diese definierten Peptide zu detektieren. Somit sind Aussagen über andere Autoantikörper gegen diese Strukturproteine nicht möglich. Zusätzlich gibt es keine weiteren Vergleichsmöglichkeiten zu der angewandten Methode und der Ergebnisse. Der hier dargestellte Multiplex-ELISA stellt ein wichtiges Element zur zukünftigen Diagnostik kardialer Autoimmunerkrankungen dar.

1.2 Abstract

In the pathogenesis of dilated cardiomyopathy (DCM) cardiac autoantibodies are described as relevant in about 50 percent. The current diagnosis of DCM patients is performed by endomyocardial biopsy (EMB). For autoantibodies, only ELISA methods for single peptides are existing. Aim of this study was to develop a Multiplex ELISA which was able to detect multiple autoantibodies in sera of DCM patients.

For five in the literature described proteins known as cardiac autoantigens (adenine nucleotide translocase, beta-1 adrenergic receptor, cardiac myosin and cardiac troponin) in total eight peptides (with the length of 10 to 29 amino acids) have been chosen. These antigens have been coupled to different-coloured fluorescence-labelled microparticles (beads) which admit later an allocation to the analyt. In patient sera, existing antibodies should bind to the peptides, are marked with a second antibody and measured by a flow cytometry method (Luminex technology). In the first step the respective individual analyses were developed and optimized. Later, this single test was combined into a multiparametric test, which then allows the parallel measurement of eight autoantibodies in patient sera.

With this multiplex test then sera were examined from 78 by myocardial biopsy clearly characterized patients of four study groups: DCM, acute myocarditis (MCa), myocardial

Abstract

diseases with positive virus detection and defined controls (without virus, without inflammation). Fluorescence values of autoantibody tests were correlated to clinical data.

Standardisation of the method was possible with optimized dilutions of human sera and used agents. Inter- and intra-assay variance was approximately 10 %. The correlation to the only available commercial single ELISA for beta1-adrenergic autoantibody was highly significant. Also, correlated some of the antibody concentrations to the EMB diagnoses. β 1-adrenergic autoantibodies were identified in 48 % in DCM patients, proportion in the virus group was 49 %. In the group with MCa 33 % of sera were positive. Several patients of the DCM group and especially of the virus group (mostly coxsackie virus) featured high levels for cardiac myosin autoantibodies. Remarkably, the acute myocarditis autoantibodies against several peptides (adenosine nucleotide translocase, cardiac myosin, cardiac troponin) were virtually undetectable.

In this study for the first time a multiparametric ELISA for autoimmune antibodies in cardiomyopathy has been developed. There were short peptide sequences of total proteins selected as myocardial antigens. Therefore, it was only possible to detect autoantibodies to these defined peptides.

The multiplex ELISA shown here represents an important element for future diagnosis of cardiac autoimmune diseases.

2 EINLEITUNG

2.1 Herzmuskelerkrankungen (Kardiomyopathien)

Myokarditiden sind entzündliche Erkrankungen des Herzmuskels mit vielfältigen infektiösen und nichtinfektiösen Ursachen, die in jedem Lebensalter auftreten können. Immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen führten zu einem besseren Verständnis der multifaktoriellen Genese der Erkrankung und zu verbesserten Therapien (Kühl 2012, Lassner 2013, Tschöpe 2015). Bei auffälliger Klinik werden zunächst eine Echokardiographie (Ultraschall) bzw. ein Kardio-MRT (Magnetresonanztomographie) durchgeführt. Wenn Zeichen einer Kardiomyopathie zu finden sind, wird eine invasive Diagnostik (Herzmuskelbiopsie) empfohlen (Cooper 2007, Caforio 2013). Neueste MRT-Bildgebungsverfahren können zwar Gewebetypen genauer differenzieren und somit entzündliche Myokardveränderungen besser darstellen, sind jedoch nicht ausreichend, wenn spezifische Erreger oder fokale entzündliche Prozesse eine Rolle spielen (Schultheiss 1990, 2011). Die Klinik für Kardiologie und Pulmologie im Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin, unter der Leitung von Prof. Dr. Heinz-Peter Schultheiss, arbeitet seit 1995 auch intensiv zur Biopsiediagnostik bei Herzmuskelerkrankungen. Durch die Diagnostik an ca. 300-500 Patienten/Jahr verfügt die Klinik über eines der größten Material- und Datensammlungen von Herzmuskelbiopsaten plus Serumproben von Patienten mit Kardiomyopathien weltweit. Das Institut Kardiale Diagnostik und Therapie (IKDT) führt in Zusammenarbeit mit der Charité die Routinediagnostik von Herzmuskelbiopsien durch. Das IKDT ist das einzige klinische Labor in Deutschland, welches durch das College of American Pathologist (CAP) akkreditiert wurde, um nach den stringenten Richtlinien der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) Herzmuskelbiopsien unter Standardbedingungen zu analysieren (IKDT 2016). Es verfügt somit über modernste Technik zur Diagnostik. Nur unter dieser Voraussetzung konnte diese experimentelle Arbeit zur Entwicklung eines neuen nicht-invasiven Diagnoseparameters in Angriff genommen werden.

2.1.1 Häufigkeit und Ursachen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Westeuropa. Laut Daten der European Society of Cardiology (ESC) leiden 27 Millionen Menschen in Nordamerika (15 Mio.) und Westeuropa (12 Mio.) an Herzmuskelerkrankungen, bei denen es sich in circa 15% (Europa) um eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) handelt (Lassner 2013). Die DCM tritt am häufigsten bei Patienten zwischen 20 und 40 Jahren auf (Kühl 2005). Sie gilt als eine wichtige Ursache für den plötzlichen Herztod (Sudden Cardiac Death, SCD), führt häufig zur Herzinsuffizienz (Heart Failure, HF) und stellt eine der Hauptindikationen für die Herztransplantation dar (Lakdawal 2013). Lange galt ein großer Teil der DCM als idiopathisch, jedoch ist in den letzten fünfzehn Jahren durch Virusgenomuntersuchungen an Myokardbiopsien nachgewiesen worden, dass die Erkrankung in über 50% virusassoziiert ist (Kühl, 2005). Neben der direkten entzündlichen Wirkung im Sinne einer Myokarditis, scheinen kardiotope Viren zusätzlich autoimmunologische Prozesse im Myokard zu triggern (Bottazzo 1986, Rose 1991). Somit kann eine akute Virusmyokarditis, trotz späterer Viruselimination, Vorläufer einer entzündlichen DCM sein. Zirkulierende kardiale Autoantikörper gegen verschiedene Antigene, wurden bei Patienten mit Myokarditis oder DCM häufiger als bei Nichterkrankten nachgewiesen (Schultheiss 1983, 1985, 1990, Lauer 1994, Dörner 2005, Lappé 2011). Zusätzlich zur Virusassoziation konnte ein Zusammenhang zwischen DCM und einer positiven Familienanamnese für Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden (Limas 1991, Maisch 2005). Während die Infektion im akuten Stadium eine größere Rolle spielt, nimmt in chronischen Stadien die Entzündung durch Autoimmunphänomene offensichtlich zu. Die Diagnostik derartiger Immunphänomene ist wünschenswert, da sich daraus frühzeitige Therapiekonsequenzen ergeben. Diese könnten die oft irreversible Schädigung des Myokards begrenzen und die Herzfunktion verbessern (Frustraci 2009). Nach einer Studie zur therapeutischen Wirksamkeit einer Immunoabsorption bei Patienten mit DCM konnte eine Besserung der Ejektionsfraktion (EF) um 10 % nachgewiesen werden, was wiederum auf eine Beteiligung von autoimmunen Antikörpern hinweist (Felix 2000, Timpert 2010).

2.2 Diagnostik der dilatativen Kardiomyopathie (DCM)

Die Diagnose erfolgt entsprechend den Empfehlungen der Working Group der ESC und der American Heart Association (Cooper 2007, Caforio 2013) differentialdiagnostisch histologisch, virologisch und immunhistochemisch anhand von Herzmuskelbiopsien. Je nach Entzündungsgrad (Dallas-Kriterien 1986) handelt es sich zunächst um eine akute Myokarditis, die bei Persistenz in eine chronische Myokarditis bzw. bei deutlicher Herzmuskelschädigung in eine inflammatorische DCM (DCMi) übergehen kann. Bei der persistierenden Myokarditis sind lymphozytäre Infiltrate und Ödem weiterhin nachweisbar (Maisch 2005).

Es gibt verschiedene Verfahren, Myokarditiden nachzuweisen. Die reine Histologie der Herzmuskelbiopsien wird eher für die Diagnostik einer akuten Myokarditis eingesetzt (Aretz 1987), ist jedoch für den eindeutigen Nachweis dieser wenig aussagekräftig. Um einen klinischen Verlauf genauer darzustellen zu können, muss zusätzlich eine Immunhistochemie durchgeführt werden, die eine deutlich höhere Signifikanz und Genauigkeit in der Diagnostik hat (Kühl 1995, Kindermann 2008). Bei der viralen DCMi oder Virusmyokarditis sind definitionsgemäß > 14 Lymphozyten/mm² Biopsat oder vorhandene Entzündungszellen (peripher $> 2,5$ Zellen, CD45R0 > 40) nachweisbar (Maisch 2005, Caforio 2013).

Der Nachweis kardiotroper Viren erfolgt mittels nested-(RT)-PCR. Es können Virusgenome u.a. von Adeno(ADV)-, Coxsackie(CV)-, Erythrovirus (Parvo-B19 (PVB19)), Epstein Barr-Virus(EBV) - oder humanem Herpes-Virus Typ 6 (HHV 6) vorhanden sein (Kühl 2005a, 2008; Caforio 2007, 2013). Die Klassifikationen erfolgen nach akuter und chronischer Form sowie viraler und (auto)immunologischer Genese. Bei den akuten Verlaufsformen werden vor allem CVB3 und ADV nachgewiesen, während bei chronischen Verlaufsformen PVB-19 und HHV-6 nachgewiesen werden können (Kühl 2005 b). Jedoch gibt es auch häufig Übergangsformen zwischen der differentialdiagnostisch unterschiedenen dilatativen Kardiomyopathie, chronischen Myokarditis, (auto)-immunologischen Kardiomyopathie und viruspositiven Kardiomyopathie (Schultheiss 2005).

Durch die Untersuchung von Biopsien, Immunhistologie sowie molekularer Virologie kann zurzeit zu ca. 70 % eine Einschätzung der Pathogenese erfolgen und eine umfassende Diagnose gestellt werden. Unter den übrigen 30 %, die weiterhin als sog. idiopathische

Kardiomyopathien klassifiziert werden, könnten sich in Zukunft möglicherweise z.B. genetischen Ursachen und/oder Autoimmunerkrankungen diagnostizieren lassen. Bisher wenig beachtet und routinemäßig kaum durchgeführt ist der immunologische Nachweis von Serumautoantikörpern mittels ELISA bei DCM.

2.3 Pathogenese der autoimmunologischen DCM

In der nachfolgenden Abbildung 1 sind schematisch die Kaskade und die verschiedenen Entwicklungsmöglichkeiten einer viral induzierten Herzmuskelerkrankung aufgezeigt. Der Schweregrad der Entzündung und die Aktivität des Virus bestimmen den Phänotyp der Herzmuskelentzündung. Autoimmune Phänomene sind eher nach starker Myokardentzündung oder Viruspersistenz möglich.

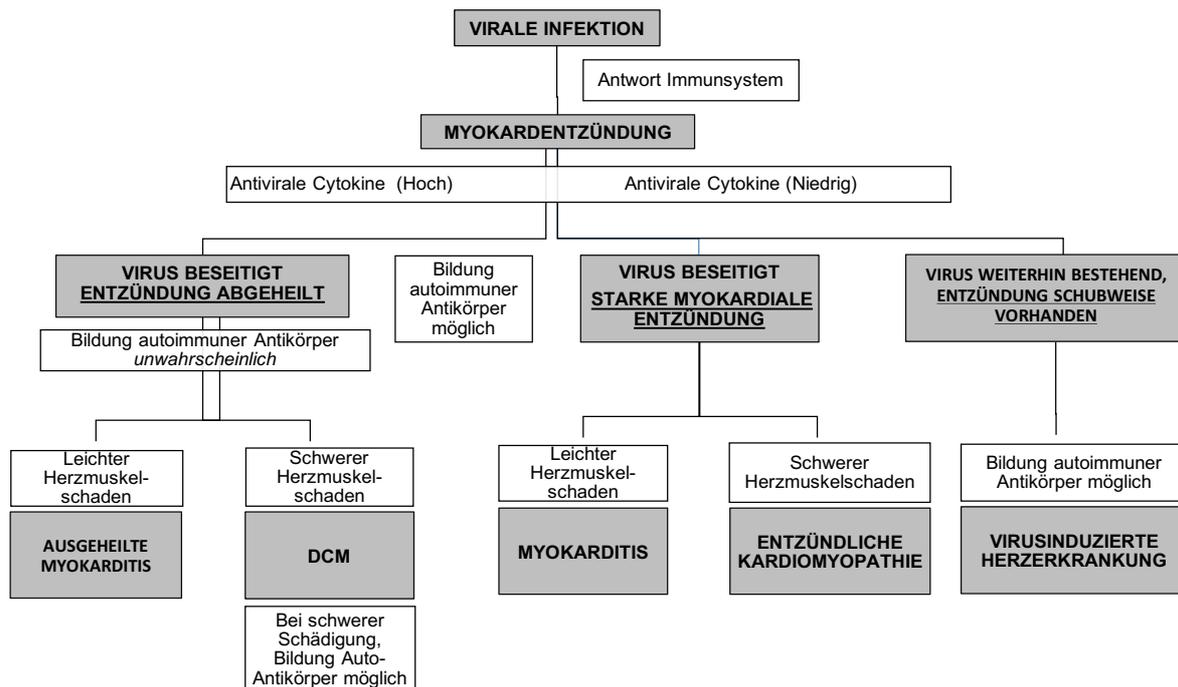


Abbildung 1: Pathogenese einer DCM

Quelle: IKDT intern, 2010,

Nach der akuten Phase der Myokarditis heilt diese entweder ohne oder mit einer Myokardschädigung aus (DCM). Besteht jedoch postinfektiös oder auch ohne vorhergehende

Infektion die Entzündung fort (chronische Myokarditis oder entzündliche Kardiomyopathie), können Autoantikörper als Ursache des autoimmunologisch getriggerten anhaltenden Entzündungsprozesses identifiziert werden (Schwimmbeck 2004). Aus tierexperimentellen Studien ist das Auslösen einer Autoimmunreaktion gegen die kardiale Isoform von Myosin nach Coxsackie-B3 (CB3) - Infektionen bekannt, wenn eine genetische Disposition zu einer entsprechenden Cytokinreaktion vorliegt (BALB/c-Maus). Eine Autoimmunmyokarditis konnte bei genetisch autoimmunologisch resistenten B10A-Mäusen ausgelöst werden, wenn zum CVB3 Lipopolysaccharide (LPS) als Koadjuvans hinzugefügt wurden. Durch diese Kombination konnten Myokardschädigungen hervorgerufen werden. Wahrscheinlich werden durch das Adjuvans eine größere Menge proinflammatorische Zytokine Interleukin (IL-1) ausgeschüttet. Auch ohne Virus, nur mit Myosin als Antigen und zwei Adjuvantien (IL-1 und LPS) konnte eine Myokarditis bei dazu nicht prädisponierten Mäusen ausgelöst werden (Fairweather 2004). Neben Zytokinen wurden Mastzellen eine Schlüsselrolle in der Auslösung von Autoimmunerkrankungen nach Virusinfektionen zugesprochen. Diese regulieren nicht nur Haupthistokompatibilitätskomplexe MHC-Klasse-II Moleküle hoch, sondern auch kostimulierende Moleküle wie B7-1/2 und den Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) (Fairweather 2004, Rose 2007).

2.4 Myokardiale Antikörper

Bei autoimmunen Kardiomyopathien wurden verschiedene Autoantikörper sowohl biopsisch am Myokard als auch im Serum identifiziert. Es wurden Autoantikörper gegen Myokardbestandteile, u.a. gegen Myosin, nachgewiesen (Kaya 2008). Ein Zusammenhang von Autoantikörpern gegen diese myokardialen Strukturen und negativer linksventrikulärer Inotropie wurde bei Patienten mit chronischer Myokarditis bzw. DCM festgestellt (Lauer 2000).

Langjährige Forschung hat über Tiermodelle zur Identifikation einiger kardialer Proteinbestandteile beim Menschen geführt, die als Autoantigen dienen und über komplexe immunologische Mechanismen zur Gewebeschädigung und damit zur Verschlechterung der Herzfunktion beitragen (Schwimmbeck 1991, Kaya 2008). Diese Antikörper richten sich u.a. gegen Bestandteile der Mitochondrien (z.B. ANT), des Sarkolemm (Actin, Myo-

sin, Tropomyosin, Troponin I) (Cunningham 1986, De Scheerder 1991) oder Oberflächenrezeptoren (Beta1-adrenerge Rezeptoren) (Limas 1991, Mobini 1999). Nach neueren Untersuchungen sollen Beta (1 und 2) -adrenerge Rezeptorautoantikörper eine prognostische Bedeutung bei der DCM haben (Dauner 2010).

2.4.1 Mitochondriale Autoantigene

Das Mitochondrium ist für die Energiegewinnung der Zellen über die Oxydation von Glucose und Fettsäuren zu Adenosintriphosphat (ATP) zuständig (Rehm und Hammar 2005). Die Adeninnukleotidtranslokase (ANT, Isoform 1) hat eine wichtige Rolle in der Regulation im oxydativen Zellstoffwechsel, da es als mitochondriales Protein der ATP-Bereitstellung dient. Es erleichtert den Übertritt über die innere mitochondriale Membran von Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP) (Sharer 2005). Bereits 1985 konnte Schultheiss die autoantigene Funktion von ANT bei Patienten mit kongestiven Kardiomyopathien aufzeigen. Schulze berichtete 1990 über eine ADP-ATP Carrierhemmung bei Herzfunktionsstörungen. In Immunoblots wurden signifikant häufiger Autoantikörper gegen ANT1 bei Patienten mit DCM gegenüber gesunden Kontrollen nachgewiesen. Diese waren vorwiegend gegen die Regionen 234 bis 247 des Proteins gerichtet (Aab-ANT 234-243) (Manchado 2002).

Schwimmbeck (1991) stellte bei viraler Genese der DCM die Übereinstimmung von Coxsackievirus B3(CVB3)-Epitopen und ANT-Sequenzen fest. Mit seiner Arbeitsgruppe konnte er darstellen, dass zwischen den CVB3-Anteilen 1218-1228 mit der Sequenz „RIEPVCLLLH“ und den ANT-Residuen 27-36 mit der Sequenz „PIERVKLLLQ“ sechs Aminosäuren übereinstimmen, welche als Antigene fungieren könnten.

2.4.2 Oberflächenrezeptorautoantikörper

Der β 1-adrenerge Rezeptor kommt in hoher Dichte an Herzmuskelzellen vor und dient der Steigerung der Chronotropie und Inotropie des Herzens. Vermittelndes Hormon sind Adrenalin bzw. Noradrenalin (Deetjen, 2005). Der humane beta1-adrenerge Rezeptor ist als Angriffspunkt für Autoantikörper bei Herzerkrankungen bekannt. Verschiedene Epitope auf der extrazellulären Domäne des Rezeptors sind beteiligt. Im Tierversuch zeigten Antikörper gegen die erste und zweite extrazelluläre Schleife eine nicht kompetitive Hemmung, während Antikörper gegen die N-terminale Domäne die Bindung nicht

blockierten. Diese H26R-197-222-Region mit antigener Eigenschaft entspricht auch der Lokalisation von humanen Antirezeptorautoantikörpern, die zu kardialen Funktionsstörungen führten (Sequenz: HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR) (Mobini, 1999).

2.4.3 Sarkolemm-Autoantikörper (Kardiales Myosin/Troponin)

Myosin ist im Herzmuskel als Filament bündelartig angeordnet und trägt an ihren Enden Myosinköpfchen, die für die Muskelkontraktion eine essentielle Rolle spielen (Brockfeld 2008). Cunningham untersuchte 1986 und 1989 die Kreuzreaktivität von kardialen Myosin- B- und T-Zellepitopen zum Protein M5 der Streptokokken (PepM5). Dabei wurden Aminosäuresequenzen identifiziert, die für die myosinspezifischen Antikörper verantwortlich waren. Die Epitope befanden sich innerhalb der 14 Residuen im Carboxyterminus des PepM5. Auf der schweren Kette der Alpha-Isoform des Myosins wurden die Epitope my α (334-351) als Auslöser einer T-zellabhängigen Myokarditis (Smith, 1991) von Niermeyer und Mitarbeitern (1995) identifiziert. Diese 15 Aminosäuren (DSAFDVLSFTAEE-KAGVYK) nur der Alpha-, nicht der Beta-Isoform können als Autoantigen an MHC-Moleküle ankoppeln und autoimmunologische herzmuskelspezifische Schädigungen hervorrufen.

Eine mögliche molekulare Ähnlichkeit und somit Kreuzreaktivität vermuteten Beisel und Mitarbeiter (1991) zwischen viralen Bestandteilen von Coxsackie B4 und der schweren Kette des kardialen Alphamyosins. Dabei konnten das Epitop 1632 bis 1647 identifiziert werden mit der Aminosäuresequenz: HANRMAAEAQKQVKSL. Troponin liegt im Herzmuskel in drei Untereinheiten vor (T, I, C), die in Verbindung mit Aktin zu einem dünnen Filament werden, und somit als Gegenspieler zum dicken Myosinfilament bei der Muskelkontraktion dienen (Brockfeld 2008). Obwohl bei Patienten mit DCM erhöhte Titer an zirkulierenden Antikörpern gegen kardiales Troponin-1 (cTn1) nachgewiesen werden konnten, ist der Zusammenhang zur Zellschädigung und Auswirkungen auf den Kalziumtransport nicht eindeutig nachgewiesen worden (Shmilovich 2007). Auch korrelierte der Nachweis von Troponin-Autoantikörpern nicht mit einer zellulären Immunantwort (Lappé 2011). Im Tiermodell konnten u.a. histologisch Entzündungsreaktionen und Fibrose nachgewiesen werden, wenn mit spezifischen T-Zellen (monoklonale anti-cTn1 Antikörper) mit den Troponin I-Peptidresiduen 105 bis 122 (Peptid 9, VDKVDEERYDVEAKVTKN)

und 131 bis 148 (Peptid 11, QKIYDLRGKFKRPTLRRV) immunisiert wurde. Das Troponin-Peptid 9 als Hauptoption macht ungefähr 80 % und das Peptid 11 ca. 20 % (Minorepitop) der pathologischen Reaktion aus (Kaya 2008).

2.4.4 Nachweismethoden kardialer Autoantikörper

Obwohl es über 30 bekannte Autoantikörper gibt, sind zurzeit nur wenige Einzelnachweise von einigen Autoantikörpern für spezifische kardiale Autoantikörper kommerziell verfügbar (z.B. von der Firma CellTrend). Methoden wie Immunfluoreszenz, Radioimmunassays (RIA), Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS), Immunblotting, Immunpräzipitation, komplementabhängige Zytotoxizität (Complement Dependent Cytotoxicity, CDC) und antikörperabhängige Zytotoxizität (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC) kommen in der DCM-Forschung zum Einsatz. Eine Routinemethode der autoimmunologischen Diagnostik bei Kardiomyopathien existiert jedoch noch nicht.

Autoantikörper können mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Immunoblot, Immunfluoreszenz u.a. nachgewiesen werden (Belizna 2006, Lassner 2013). Bisher werden diese jedoch nur als Einzelnachweise durchgeführt. Eine Methode zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Autoantikörper findet aktuell noch keine Verwendung in der Routinediagnostik. Eine besondere diagnostische Herausforderung stellt bei den wenig erforschten autoimmunen Kardiomyopathien der Nachweis herzspezifischer Autoantikörper im Serum und eine klinische Korrelation dar.

Ferner fehlen Referenzwerte (Normwerte) für den Einsatz von Antikörpermessungen zur klinischen Verlaufskontrolle der DCM. Es ist bisher noch unklar, welche Autoantikörperkonzentrationen überhaupt eine klinisch-pathologische Bedeutung haben. Eine Studie von Felix und Mitarbeitern (2000, 2015) bei Patienten mit DCM ergab, dass zirkulierende kardiale Autoantikörper bei der Verschlechterung einer kardialen Dysfunktion eine Rolle spielen. Daher führte die Immunoabsorption bei Myokarditis zur Verbesserung der Herzleistung und Verminderung der Herzentzündung (Felix 2015). Es fehlen also sowohl Methoden zur Quantifizierung von einzelnen Autoantikörpern als auch Tests, in denen mehrere relevante Antikörper gleichzeitig gemessen werden können. Zu dieser Methodenentwicklung sollen die geplanten Experimente beitragen.

2.5 Zielsetzung

Es sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Lässt sich eine zuverlässige, reproduzierbare Methode entwickeln, die mehrere kardiale Autoantikörper in Seren von Patienten mit DCM determiniert und quantifiziert?
- Sind die Messungen für alle ausgewählten Parameter gleichermaßen möglich?
- Lassen sich verschiedene relevante kardiale Autoantikörper in einem Testansatz (Multiplex-Assay) zusammenfassen?
- Lässt sich mit Hilfe dieser Methode ein klinisch-serologischer Parameter zur Charakterisierung eines klinischen Verlaufs einer DCM oder Myokarditis standardisiert testen?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Untersuchungsmaterial, Patientenkollektiv, klinische Daten

Die Untersuchung erfolgte an eingefrorenen Seren von Patienten, die wegen verschiedener kardialer Erkrankungen in der Klinik für Kardiologie und Pulmologie am Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin klinisch untersucht wurden und bei denen zusätzlich Myokardbiopsien durchgeführt worden waren. Die an der Untersuchung teilnehmenden Patienten hatten ihr Einverständnis zur Durchführung von Serumuntersuchungen gegeben. Diese Seren wurden sowohl für die Methoden der Firma Euroimmun- bzw. CellTrend als auch das hier neu entwickelte Single- bzw. Multiplexverfahren genutzt. Die Seren wurden im Rahmen klinischer Studien (z.B. SFB Transregio) zu Forschungszwecken genutzt.

Patientendaten und –diagnosen.

Es handelte sich um tiefgefrorene Seren (-80°C) von 78 Patienten (60 männlich, 18 weiblich) im Alter von 21 bis 78, im Durchschnitt 50 Jahren. Bei den Patienten wurden folgende Diagnosen anhand von virologisch und histologisch untersuchten Herzmuskelbiopsien gestellt (78 Diagnosen): akute Myokarditis (n=9, entzündungspositive Pat.), dilatative Kardiomyopathie (n=21, DCM (EF<50%)) und virusinduzierte Herzerkrankung, die weder eine dilatative Kardiomyopathie noch eine akute Myokarditis war, und einen positiven Virusnachweis aufwies (n = 42, Virusgruppe). Der Altersdurchschnitt und die Geschlechterverteilung waren in den Gruppen in etwa gleich. Diese Serumproben stammen aus Rückstellproben der Diagnostik der Charité. Aufgrund einer klinisch-kardiologischen Indikation waren Herzmuskelbiopsien durchgeführt worden, gleichzeitig wurden Serumproben zur weiteren Diagnostik entnommen und ein Teil dieses Serums zu Forschungszwecken asserviert. Als Kontrollgruppe wurden die Seren derjenigen Patienten gewählt, bei denen weder in der Biopsie-Diagnostik noch in den übrigen klinischen und serologischen Untersuchungen pathologische Veränderungen festgestellt worden waren.

Die Virusgruppe setzt sich aus Patienten zusammen, bei denen im Myokard Viren nachgewiesen wurden. Die weitere Unterteilung der Virus-Gruppe nach vier unterschiedlichen Virustypen ist unten aufgeführt. Im Einzelnen handelte es sich um Coxsackieviren A (n=17, kardiologische Erstmanifestation) und B (n=15, Verlaufskontrolle), um Adenoviren (n=5) sowie Parvoviren (n=5).

Tabelle 1: Diagnosen und Anzahl der Patientenkohorte

Einteilung	Anzahl
Gruppe (gesamt)	n=78
Myokarditis	9
DCM	21
Virus	Gesamt = 42
-COX A	17
-COX B	15
-ADV	5
-PVB19	5
Kontrolle	6

Anmerkung. (Gesamt n=78) Patienten aufgeteilt in einzelne klinische Gruppen

3.1.2 Kardiale Antigene

Es wurden acht kardiale Autoantigene (jeweils Teilsequenzen) ausgewählt, für welche eine funktionelle Bedeutung beschrieben war. Die Peptide wurden von der Firma Biosynthan GmbH in Pulverform hergestellt und geliefert. Die Peptidsequenzen wurden der Literatur entnommen. Die Seren wurden auf die folgenden (siehe Tabelle 2) acht verschiedenen Autoantikörper gegen Peptidsequenzen myokardialer Proteine (Antigene) getestet: Von den fünf unterschiedlichen Antigenen sind bei Myosin drei und Troponin zwei verschiedene Sequenzabschnitte benutzt worden, sodass jedes Serum auf acht Sequenzen untersucht wurde (siehe Tabelle 2).

Im Verlauf sind weitere Materialbestandteile der Arbeit aufgeführt.

Aminosäuresequenzen.

Die kardialen Proteine, deren Autoantikörper untersucht wurden, die Erstautoren und Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Peptidsequenzen der getesteten kardialen Autoantigene

Protein	Literatur	Region	Sequenz	Anzahl AS	Name
Adenin-Nucleotid-Translokase 1	Manchado 2002	V AA 234—243	RRRMMMQRGR	10	ANT1
Adenin-Nucleotid-Translokase 2	Schwimbeck 1991	ANT residues 27-36	PIERVKLLQ	10	ANT2
Humaner β 1-adrenerger Rezeptor	Mobini 1999	H26R (197-222)	HWWRAESDE-ARRCYND-PKCCDFVTNR	26	ARA1
Kardiales Myosin	Cunningham 2002		ALEEAESLEHEEG-KILRAQLEFNQIKAE	29	CMA1
Kardiales Myosin	Donerneyer 1995	334-352 murine Isoform a	DSAFDVLSTAEKAGVYK	20	CMA2
Kardiales Myosin	Beisel 1991	1632-1647 human Isoform a	HAN-RMAAEAQQQVKS	15	CMA3
Kardiales Troponin	Kaya 2008	Peptide: 9 Incidence: 80% (4/5) Severity: 1,4 (3-1-0-2-1)	VDKVD EERYD VEAQVTKN	18	CTA1
Kardiales Troponin	Kaya 2008	Peptide: 11 Incidence: 20% (1/5) Severity: 0,2 (1-0-0-0-0)	QKIYD LRGKF KRPTLRRV	18	CTA2

Anmerkung. Acht in der Literatur beschriebene charakteristische Peptidsequenzen von myokardialen Proteinen. In der letzten Spalte findet sich die für diese Arbeit genutzte interne Bezeichnung

3.1.3 Fängerantikörper

Single-/Multiplex (Human).

Anti-Human IgG (Fc gamma- specific) Biotin

Bioscience®

Kanchan – Fängerantikörper.

Mouse Anti-Rabbit IgG (H+L), Biotin Conjugated

ImmunoPur (Prod. No. 31824)

3.1.4 Chemikalien

Single-/Multiplex (Human & Kaninchen).

Sheath Fluid	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Human Serum Sample Diluent	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Human Serum Standard Diluent	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Streptavidin-R-Phycoerythrin (5 mM sodium Azide)	Invitrogen USA
S-NHS N- Hydroxysulfosuccinimide Sodium Salt	Aldrich Chemistry
EDC N-(3-Diethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide Hydrochloride	Fluka Analytical

3.1.5 Lösungen

Single-/Multiplex (Human & Kaninchen).

Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS, 1% BSA, pH 7.4 (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1% BSA) Sodium Azide 0.05% Azide 500 mg
Sample Diluent	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Standard Diluent	Bio-Rad Laboratories, Inc.

3.1.6 Puffer

Single-/Multiplex (Human & Kaninchen).

Alle Puffer wurden filtersterilisiert und bei 4°C gelagert.

Aktivierungspuffer (Activation Buffer): 0.1 M NaH₂PO₄, pH 6.2

Natriumphosphatpuffer: NaH₂PO₄ (Sodium phosphate monobasic, anhydrous) 0.1 M
NaH₂PO₄ 3g
5 N NaOH ~ 40 Tropfen

Material

Kopplungspuffer (Coupling Buffer):	0.05 M MES, pH 5. MES (2[N-Morpholino] ethane-sulfonic acid) 0.05 M MES 2.44 g, 5 N NaOH ~ 5 Tropfen
Waschpuffer (Wash Buffer):	PBS, 0.05% TWEEN® 20, pH 7.4 138 mM NaCl 2.7 mM KCl 0.05% TWEEN
Blockierungspuffer/Aufbewahrungspuffer (PBS-TBN Blocking/Storage Buffer):	PBS, 0.1% BSA, 0.02% TWEEN-20, 0.05% Azide, pH 7.4
Versuchspuffer (Assay Buffer):	PBS, 1% BSA, pH 7.4 138 mM NaCl 2.7 mM KCl 1% BSA

3.1.7 Puffer

Extern durchgeführter Western Blot nach Standard- Prozedere und entsprechend genutzten Materialien.

Single-/Multiplex (Human & Kaninchen).

Bio-Plex COOH Beads 1,25 x 10 ⁷ Beads/ml	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Bio-Plex Calibration Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Bio-Plex Validation Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc.

3.1.8 Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien

Single-/Multiplex (Human & Kaninchen).

Bio-Plex Suspension Array System	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Bio-Rad Vacuum Pumpe	Bio-Rad Laboratories, Inc.

Material

Vortexer MS2 Minishaker	IKA- GmbH
Zentrifuge Microfuge 16	Beckmann Coulter
Rüttler Heidolph Titramax 101	Heidolph Instruments
Filterplatten (96 Well) Multiscreen HTS Filter Plates,	Millipore
Filterplatten (96 Well, Bio-Plex)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Pipette	Eppendorf
Multipette	Eppendorf
Pipettenspitzen	Biozym Diagnostik GmbH

3.1.9 Software

Textverarbeitung:	Word 2011, Microsoft
Datenverwaltung:	Excel 2011, Microsoft
Bio-Plex Suspension Array System Operator	Bio-Plex Manager Software
Grafik	Excel 2013, Microsoft
Statistik	GraphPad Prism 4 und 6

Methoden

Da es keine routinemäßig anwendbare Methode zum Nachweis von Autoantikörpern bei Kardiomyopathien mittels eines Multiplex-ELISA's gab, wurde zur Vorauswahl von Testseren eine Immunfluoreszenz an Herzgewebe von Affenherzen (Fa. Euroimmun) geprüft. Es wurden insgesamt acht Humansenen für die Entwicklung der Multiplex-ELISA Methode verwendet. Zusätzlich wurde der zum Zeitpunkt der Arbeit einzig kommerziell erhältliche ELISA zur Messung von Autoantikörpern der Firma CellTrend GmbH für beta-1-adrenerger Rezeptorautoantikörper an weiteren 78 Humansenen im Verlauf angewendet. Zunächst wurden die Messungen als Einzel-ELISA (Single-Plex) für die acht ausgewählten Autoantigene/ etabliert. Dieses erfolgte nur mit einer Testung auf einen Autoantikörper pro Well der 96-Well Platte (Single-Plex). Als Testsystem und zur Optimierung aller Einzelschritte des Diagnostikverfahrens, wurde ein auf kardiales Troponin (CTA 1) immu-

nisiertes Kaninchenserum benutzt. Nach Beendigung der Eichung und Prüfung der Genauigkeit der Methode wurde von den in der Vorauswahl selektierten humanen Serumproben die Testphase als Singleplex weitergeführt.

Der ELISA für den β 1-adrenergen Rezeptorautoantikörper wurde mit dem beta-1-adrenergen Rezeptorautoantikörper der Methode der Fa. CellTrend verglichen. Nachdem stabile reproduzierbare Ergebnisse vorlagen, wurde die finale Methode als Multiplextest etabliert. Mit der entwickelten Multiplex-Methode wurden schließlich 78 Patientenseren untersucht. Darüber hinaus wurden die Gesamtergebnisse des Multiplex mit den klinischen Diagnosen der 78 Patienten verglichen.

3.2 Immunfluoreszenz auf Affenherzmuskeln (Fa. Euroimmun)

Bei dem Testansatz der Firma Euroimmun handelte es sich um auf Mikroskopierobjektträgern aufgespannte Schnitte von Affenherzmuskelgewebe, an denen Serumautoantikörper an bestimmte Herzmuskelbestandteile binden sollten. Diese wurden dann mithilfe einer Immunfluoreszenzreaktion mittels Mikroskop nachgewiesen.

Die Grundidee des Tests besteht in der Annahme, dass Affenmuskulatur vergleichbare Proteine wie humane Muskulatur enthalten und somit humane Autoantikörper binden. Je Reaktionsfeld des Reagenzträgers, wurden 25 μ l der verdünnten Serumprobe pipettiert (z.B. 1:10, 1:100). Vor Beginn der Inkubation wurden alle Proben des gesamten Testansatzes aufgetragen. Die Objektträger wurden in die Aussparung des Reagenzträgers gelegt. Dabei tauchten die Biochips in die Tropfen (verdünntes Serum) ein und die Reaktionen wurden gestartet. Der Tropfenkontakt wurde überprüft und es wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Tropfen nicht verlaufen. 30 Minuten lang wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden mit PBS-Tween abgespült und unmittelbar danach in eine Küvette mit PBS-Tween für fünf Minuten auf einen Rotationsschüttler gestellt. Je Feld des (inzwischen gereinigten) Reagenzträgers wurden 20 μ l des markierten Antiserums pipettiert. Alle Tropfen des gesamten Testansatzes wurden aufgetragen, bevor weiter inkubiert wurde. Das markierte Antiserum wurde vor der Entnahme des benötigten Aliquots mit der Pipette gemischt. Das Antiserum wurde während der Inkubation mit der verdünnten Probe auf separate Reagenzträger getropft. Die Objektträger wurden

einzelnen aus der Küvette entnommen, dann jeweils innerhalb von fünf Sekunden Rückseite und Unterkante mit einem Papiertuch abgetrocknet und wieder so in die Aussparungen des Reagenzträgers gelegt, dass die Biochips in die Tropfen eintauchten. Der Tropfenkontakt wurde überprüft und anschließend für 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden mit einem Schwall PBS-Tween abgespült und unmittelbar danach in eine Küvette mit PBS-Tween für fünf Minuten auf einen Rotationschüttler gestellt. Zur Gegenfärbung wurden 10 Tropfen Evans-Blau pro 150 ml PBS-Tween in die Küvette gegeben. Das Eindeckmedium wurde auf das Deckglas getropft, maximal 10 µl je Feld. Es wurde eine Styroporeindeckhilfe verwendet. Die Objektträger wurden aus der Küvette genommen, die Rückseite und alle vier Kanten wurden mit einem Papiertuch abgetrocknet und mit den Biochips nach unten auf das betroffene Deckglas gelegt. Unmittelbar darauf wurde überprüft, ob das Deckglas in der Aussparung des Objektträgers eingerastet war, und andernfalls der Sitz korrigiert. Die Fluoreszenz wurde im Fluoreszenzmikroskop beurteilt (Euroimmun 2016).

Im Folgenden sind die Materialien der in dieser Messmethode (Fa. Euroimmun) verwendeten Produkte aufgeführt.

Peptide mit Aminolinker.

Flourescein-markiertes anti-Human-IgG (Ziege)	Euroimmun AG
Positive Kontrolle gegen Querstreifung (HMA), human	Euroimmun AG
Negative Kontrolle: Autoantikörper-negativ, human	Euroimmun AG

Chemikalien.

Salz für PBS ph 7,2	Euroimmun AG
Tween 20	Euroimmun AG

Geräte und sonstige Verbrauchsmaterialien.

Objektträger, bestückt mit je 5 Biochips, beschichtet mit Gefrierschnitten von Affenherzmuskeln	Euroimmun AG
Eindeckmedium	Euroimmun AG

Deckgläser (62 x 23 mm)	Euroimmun AG
Pipette	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop mit Kamera	Leica DM RE, Leica DC 300f
Pipettenspitzen	Biozym Diagnostik GmbH

3.3 Einzel-ELISA für β 1-adrenerge Rezeptoren (Fa. CellTrend)

Benutzt wurde ein kommerziell erhältlicher Einzel ELISA-Test, der Autoantikörper gegen β 1-adrenerge Rezeptoren nachweist. Getestet wurden dieselben 78 Humanseren, die später mit der in dieser Arbeit weiterentwickelten Multiplex Methode gemessen wurde. Die Methode der Fa. CellTrend wurde als Vergleichsmethode extern durchgeführt. Der Hauptunterschied zwischen den Methoden bestand darin, dass die Firma CellTrend das gesamte Molekül des Autoantiköpers nutzte, im Gegensatz zu den Teilsequenzen in der Multiplex-ELISA Methode, und dass nur ein Autoantikörper, im Gegensatz zu acht Autoantikörpern gleichzeitig gemessen wurde.

Testprinzip

An der Mikrotiterplatte ist das komplette Protein des β 1-adrenergen Rezeptors gebunden. Während der Inkubation werden die in den Proben vorhandenen anti-Rezeptor-Antikörper an der Platte immobilisiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt mit einem anti-human-IgG-Sekundärantikörper, der mit Peroxidase markiert ist. In der folgenden enzymatischen Substratreaktion bildet sich ein farbiges Produkt, dessen Farbintensität proportional der Konzentration und/oder Avidität der anti- β 1- adrenergen Rezeptor-Antikörper ist (CellTrend Produktinformation, 2012).

Testdurchführung

100 μ l der Proben/Standards/Kontrollen wurden für 120 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach folgt ein Waschschrift. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 100 μ l anti-human-IgG, Peroxidase-markiert für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Danach erfolgt ein erneuter Waschschrift. In Anschluss erfolgt für 20 Minuten bei Raumtemperatur die Substratinkubation (100 μ l/well). Schließlich wurde die Stopplösung zugesetzt (100 μ l/well) und bei

450 nm (optional gegen Referenzwellenlänge) gemessen (CellTrend Produktinformation, 2012).

3.4 Entwicklung des Single- und Multiplex-ELISA

Im Anschluss an die Testung des β 1-adrenergen Rezeptors (Fa. CellTrend), erfolgte die Vorbereitung der eigenen Multiplexmessung. Dazu mussten zunächst die Antigensequenzen an die fluoreszierenden Beads gekoppelt werden. Die Proteinkopplungsreaktion ist der erste Schritt und Teil der Etablierung der Methode in dieser Arbeit. Im Weiteren erfolgte die Messung zunächst als Singleplex-, später als Multiplexversuch.

Während im Sandwich-ELISA der Fa. CellTrend der Nachweis von lediglich einem Antikörper möglich ist, können im Multiplex-System (Luminex-Technologie) mehrere Autoantikörper parallel gemessen werden. Um die verschiedenen Autoantikörper in einem Spektralfarben unterscheiden zu können, werden diese an speziell markierte Moleküle (Beads) gekoppelt. Diese konnten im Verlauf mittels des BioPlex Systems analysiert und eingeteilt werden (siehe 2.2.5). Hier erfolgte vor Durchführung eines Single- bzw. Multiplex-ELISA eine Proteinkopplungsreaktion.

3.4.1 Proteinkopplungsreaktion

Die Proteinkopplungsreaktion wurde für jeden der acht benutzten Autoantikörper durchgeführt. Dieser Schritt unterschied sich methodisch nicht in der Vorbereitung des Single- bzw. Multiplex-ELISA's. Die Peptide (in Falle dieser Arbeit Antigenteilsequenzen) werden über eine Schiffsche Base-Reaktion mit der Carboxylgruppe der Beads kovalent aneinandergebunden.

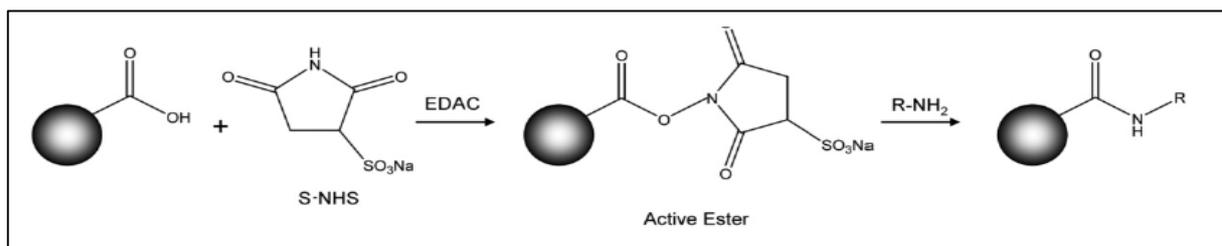


Abbildung 2: Bindungsreaktion der Beads mit einem Protein

Anmerkung. (Bio-Rad Broschüre Internet) R= unterschiedlicher Rest der Peptide (Antigene)

Herstellung der Proteinlösung

Vor der Anwendung wurden alle im Weiteren beschriebenen Puffer auf Raumtemperatur gebracht. Die Beads wurden vor Lichteinstrahlung geschützt, indem die Versuchsröhrchen während der Durchführung des Versuches in Aluminiumfolie eingewickelt wurden. Das tiefgekühlte (-20°) Ethyl-Dimethylaminopropyl Carbodiimide (EDC) und das N- Hydroxysulfosuccinimide Sodium Salt (S-NHS) wurden eine Stunde vor der Nutzung in ein Trockengefäß bei Raumtemperatur gelegt. Die Behältnisse von EDC und S-NHS wurden nach fünfmaliger Benutzung verworfen.

Proteinkopplungsreaktion

Zunächst wurden die Beads (1.25×10^7) für die Proteinkopplungsreaktion auf mittlerer Geschwindigkeit für 30 Sekunden gevortext. Dabei musste beachtet werden, dass die COOH-Beads vollständig resuspendiert als einzelne monodisperse Partikel vorliegen. Falls noch mit bloßem Auge erkennbare Beadaggregationen vorlagen, wurden weitere Male für 30 Sekunden gevortext. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis keine Verklumpungen mehr zu sehen waren.

Beadniederschlag

Für eine einfache Kopplungsreaktion wurden 100 µl monodisperse COOH- Beads ($1,25 \times 66$) in Reagenzröhrchen überführt. Danach wurden die Beads bei 14000 x g Umdrehungen für 4 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand von dem Beadniederschlag entnommen. Da der Beadniederschlag schlecht einzusehen war, wurden die Reagenzröhrchen markiert, um zu sehen, wo sich der Niederschlag befand. Um Aufwirbelungen des Niederschlags zu vermeiden, wurde das Reagenzröhrchen so gedreht, dass der Niederschlag unten lag, so dass der Überstand entlang der oberen Wand des schräggehaltenen Reagenzröhrchens abpipettiert werden konnte.

Beadwaschpuffer

Anschließend wurden 100 µl des Beadwaschpuffers hinzugegeben. Danach wurde das Reagenzröhrchen für 10 Sekunden gevortext. Im Anschluss daran wurde das Reagenzröhrchen für 4 Minuten bei 14000 x g Umdrehungen zentrifugiert, und vorsichtig der Überstand nach oben genannter Technik entnommen.

Beadaktivierungspuffer

Im Folgenden wurden der Beadniederschlag mit 80 µl Aktivierungspuffer resuspendiert und 30 Sekunden gevortext.

EDC und S-NHS

Anschließend wurden EDC (50 mg/ml) und S-NHS (50 mg/ml) in Beadaktivierungspuffer kurz vor seiner Nutzung vorbereitet. Es wurden 10 µl der 50 mg/ml EDC Lösung und sofort danach 10 µl 50 mg/ml S-NHS Lösung zu den Beads hinzugegeben und bei hoher Geschwindigkeit für 30 Sekunden gevortext. Im Anschluss daran wurde das Reaktionsgefäß in Aluminium eingewickelt und das Gemisch bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Rüttlers für 20 Minuten geschüttelt. Es wurde darauf geachtet, dass die Beads während dieses Aktivierungsschrittes in der Suspension blieben.

PBS

Nach dem Aktivierungsschritt wurden 150 µl phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffert Saline) PBS (pH 7,4) hinzugegeben und bei hoher Geschwindigkeit gevortext und dann für 4 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Aktivierte Beads

Die aktivierten Beads wurden mit 100 µl PBS (pH 7,4) versetzt und für 30 Sekunden bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext.

Herstellung der Proteine

Die Peptide wurden von der Firma Biosynthan hergestellt und lagen in Pulverform bei 20° gekühlt vor. Um 10 µg für die Kopplungsreaktion extrahieren zu können, wurde 1 mg des Proteins in 1 ml PBS gelöst.

Proteinkopplung

10 µg der Proteinprobe wurden zu den aktivierten Beads hinzugegeben und mit PBS (pH 7,4) auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Die Reagenzröhrchen wurden in Aluminiumfolie eingewickelt, und die Beads wurden mit Hilfe eines Rüttlers über Nacht bei 4°C geschüttelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Beads während dieses Konjugationsschrittes in der Suspension blieben.

Zentrifugierung der Beads

Im nächsten Schritt wurden die gekoppelten Beads bei 14000 x g für 4 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen.

Waschen der Beads mit PBS

Schließlich wurden die Beads mit 500 µl PBS (pH 7,4) gewaschen. Dann wurden die gekoppelten Beads bei 14000 x g für 4 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen.

Resuspendierung mit „Blocking“-Puffer.

Danach wurden die gekoppelten Beads mit 250 µl „Blocking“-Puffer resuspendiert und bei mittlerer Geschwindigkeit für 15 Sekunden gevortext. Die Reagenzröhrchen wurden in Aluminiumfolie eingewickelt und mit Hilfe eines Rüttlers für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt.

Zentrifugierung und Entfernung des Überstandes

Im Anschluss wurden die gekoppelten Beads wiederum bei 14000 x g für 4 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt.

„Storage“-Puffer

Die gekoppelten Beads wurden mit 500 µl „Storage“ Puffer gewaschen und bei 16000 x g für 6 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand wiederum abpipettiert und verworfen.

Resuspendierung und Lagerung

Im letzten Schritt wurden die gekoppelten Beads in 150 µl „Storage“-Puffer resuspendiert. Die gekoppelten Beads wurden in Aluminiumfolie eingewickelt bei 4°C gelagert.

Haltbarkeit der gekoppelten Beads

Es hat sich herausgestellt, dass die gekoppelten Beads höchstens ein bis zwei Monate haltbar waren, auch wenn sie vor Lichteinstrahlung geschützt bei 4°C gelagert wurden.

3.4.2 Immunisierung Kaninchen

Die Immunisierung und Gewinnung des Serums wurde extern durch die Firma Open Biosystems durchgeführt. Es wurden zwei Kaninchen auf kardiales Troponin (CTA1, human) nach kommerziellem Standardprotokoll der Firma immunisiert. Hergestellt wurden zwei immunisierte Kaninchenserum, mit welchen die Methode dieser Arbeit weiter aufgebaut und optimiert wurde.

3.4.3 Singleplex-ELISA

Das Herstellerprotokoll der Fa. Bio-Rad Basis für alle Single- bzw. Multiplexversuche genommen. Die Singleplex- Methode wurde zunächst zur Eichung und zur Testung der Methode durchgeführt, um reproduzierbare und stabile Ergebnisse zu erhalten. Darüber hinaus unterschied sie sich nur in einem Punkt von der im Folgenden beschriebenen Multiplex-Methode: Der Unterschied bestand darin, dass bei der ELISA-Reaktion nur ein an Beads gekoppeltes Antigen pro Well verwendet wird. Daher wird im Folgenden nur die Multiplexmethode finale Methode mit mehreren Beads pro Well) beschrieben.

3.4.4 Multiplex-ELISA

Das Bio-Plex Suspension Array System der Firma Bio-Rad erkennt mithilfe von zwei Lasern die in 100 verschiedene Farben (Spektral Farben) kodierten Beads (siehe Abbildung 3). Diese spezielle Farbe wurde vorher durch ein individuelles Mischungsverhältnis zweier Fluoreszenzen hergestellt und in die oben genannten Farben eingeteilt (xMAP Technology). Da diese Beads wiederum an Antigene gekoppelt wurden, kann das Gerät die Fluoreszenzreaktion, wenn eine stattgefunden hatte, einem bestimmten Bead (=Farbe=Antigen) zuordnen. Somit kann auch jedem Bead mit daran gekoppeltem Antigen eine Fluoreszenzreaktion zugeordnet werden (Bio-Plex Broschüre).

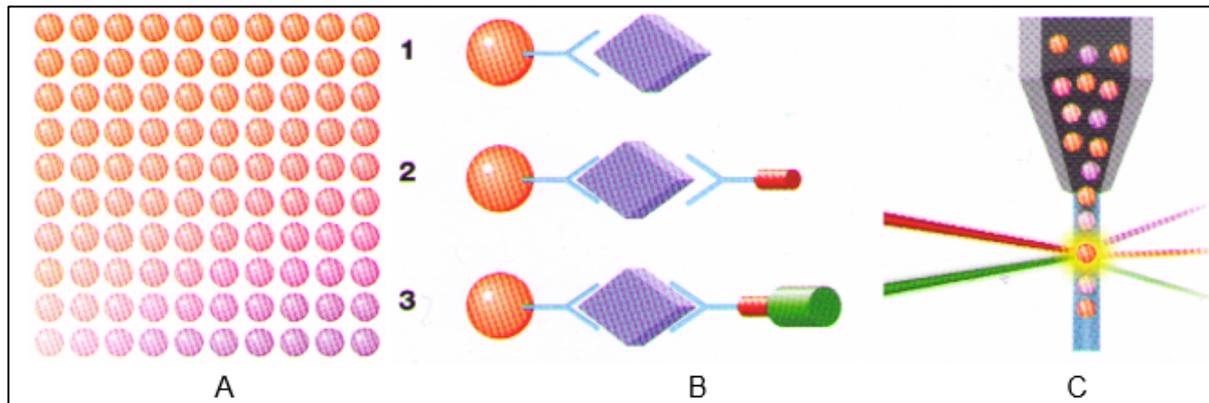


Abbildung 3: Bio-Plex Suspension Array

Anmerkung. A: Spektralfarbenraster der 100 verschiedenen Beads (xMAP Technologie) B: Sandwich ELISA; oben Bead (links) mit gekoppeltem Protein, Mitte: mit Detektionsantikörper, unten: mit Fluoreszenzreaktion durch Streptavidin-Phycoerythrin. C: Detektionslaser des Bio-Plex Systems. (Quelle: Bio-Plex Broschüre)

Diese Fluoreszenz wird als Fluoreszenzeinheit gemessen, die in den stattgefundenen Versuchen bis maximal 24000 ging. Die Festlegung eines Minimums an Fluoreszenzeinheit wurde im Verlauf dieser Arbeit festgelegt. Das im Folgenden beschriebene Protokoll ist das Endprotokoll nach allen Versuchen. Jeder neue Abschnitt stellt einen Versuchsschritt dar. Die Methode wurde sowohl mit Kaninchenserum zur Eichung als auch mit Humansenen durchgeführt.

Herstellung einer „Beadarbeitslösung“

Um zu gewährleisten, dass die Beads gleichmäßig in den einzelnen Reaktionswells verteilt waren, wurde eine Arbeitslösung hergestellt. Bevor die Messungen an der Arbeitslösung gemacht wurden, wurde das Gerät eine Stunde vor Benutzung eingeschaltet und ein Mal pro Woche auf der Option „High“ kalibriert, um größte Messgenauigkeit zu gewährleisten.

Verdünnung des Beadkonzentrates

Im ersten Schritt wurden die konzentrierten gekoppelten Beads mindestens eine Minute lang bei hoher Geschwindigkeit gevortext. 40 µl dieser Beads wurden auf 1960 µl Storage Puffer gegeben. Das neue Gemisch wurde wiederum auf hoher Geschwindigkeit für 15 Sekunden gevortext.

Vorbereitung der 96-Well-Platte

Für die Messung wurden die einzelnen Wells einer 96-Well-Platte mit 100 µl Assay-Puffer befeuchtet und der Puffer durch Vakuumfiltration wieder entfernt. Um eine Vermischung der einzelnen Wells zu vermeiden, wurde im Anschluss die 96-Well-Platte mit einem Papiertuch abgetrocknet.

In jedes Well wurden zunächst 90 µl Assay-Puffer gefolgt von 10 µl der Arbeitslösung eingefüllt und für eine Minute bei hoher Geschwindigkeit auf dem Rüttler geschüttelt.

Herstellung der adäquaten Konzentration der Suspension

Nun wurde die Beadanzahl in dem Bio-Plex- Suspensions- Array- System gemessen, die einen Zielwert zwischen 200 und 300 Beads pro Well (entsprechend 10 µl Arbeitslösung) erreichen sollte. Bei zu niedriger Konzentration wurde von den konzentrierten Beads entsprechend berechnete Mengen mehr zur Arbeitslösung hinzugegeben, bei zu hoher Konzentration entsprechend mit Storage-Puffer verdünnt.

Die im Folgenden beschriebene Methode stammt aus dem Instruktionshandbuch der Firma Bio-Rad und wurde mit einigen Abwandlungen übernommen.

Doppelbestimmung der Proben

Die Beads für die Messung wurden aus der Arbeitslösung entnommen (10 µl Arbeitslösung enthalten ca. 200-300 Beads) und die Proben wurden in Doppelbestimmung getestet.

Präparation der 96-Well Platte

Jedes benötigte Well der 96- Well Platte wurde mit 100 µl Assay-Puffer angefeuchtet. Danach wurde durch Vakuumfiltration der Puffer entfernt, und der Boden der 96-Well Platte wurde mit einem Papiertuch getrocknet.

Verteilung der Arbeitslösung

Die vorbereitete Arbeitslösung wurde immer gut gevortext (40 Sek.). Jeweils 10 µl von den verschiedenen vorgekoppelten Beadarbeitslösungen wurden in ein Well geben. Es wurde darauf geachtet, dass mindestens 50 µl Flüssigkeit in jedem Well enthalten waren.

Falls weniger als fünf Beadarbeitslösungen benutzt wurden, wurde der Rest mit Assay-Puffer auffüllen. Danach wurde der Inhalt durch Vakuumfiltration entfernt.

Präparation der 96-Well-Platte

Im Anschluss daran wurden 100 µl Waschpuffer in jedes Well geben und mit Vakuumfiltration entfernt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde wiederum die Unterseite der 96-Well-Platte mit einem Papiertuch abtrocknet um Vermengungen unter den einzelnen Wells zu vermeiden. Die Platte wurde ab diesem Schritt auf einem der mitgelieferten Plattenhalterungen beim Pipettieren etc. abgestellt.

Vorbereitung der Serumproben

Die Serumproben wurden vor dem Versuch aufgetaut und auf 1:200 und 1:400, mit humanem Standard-Diluent verdünnt. 50 µl des frisch vorverdünnten Serums wurden in jedes Well geben. Die Pipettenspitze wurde nach jeder Patientenserumsverdünnung gewechselt. Die Platte wurde dann mit einem Abdichtungsfilm (mitgeliefertes Sealing-Tape) zugeklebt und in Aluminiumfolie eingewickelt. Diese verschlossene 96-Well-Platte wurde auf dem Rüttler für zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Geschwindigkeit lief auf 1100 rpm für dreißig Sekunden und wurde dann für die restliche Zeit auf 300 rpm eingestellt.

Inkubation bei 4°C

Danach wurde die Platte in Aluminiumfolie und mit Abdichtungsfilm bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Waschpufferbehandlung

Am nächsten Tag wurde die Platte 30 Sekunden lang auf 300 rpm gerüttelt. Anschließend wurde sie dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen (wie bereits beschrieben).

Hinzugeben von Detektionsantikörpern

Der Detektionsantikörper wurde kurz gevortext, und mit Detection-Antibody-Diluent auf 1:400 verdünnt. Von dem verdünnten Detektionsantikörper wurden 25 µl in jedes Well gegeben. Die Platte wurde dann mit einem neuen Abdichtungsfilm zugeklebt werden und schließlich in Aluminiumfolie eingewickelt.

Inkubation für 30 Minuten

Die verschlossene 96-Well-Platte wurde nun auf dem Rüttler für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Geschwindigkeit lief für dreißig Sekunden auf 1100 rpm und wurde dann für die restliche Zeit auf 300 rpm eingestellt.

Danach wurden die Wells der Platte dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen (wie bereits beschrieben).

Streptavidin-PE

Das Streptavidin-PE wurde kurz auf hoher Geschwindigkeit gevortext, und mit Assay-Puffer auf 1:400 verdünnt. Von dem verdünnten SAPE wurden 50 µl in jedes Well gegeben. Die Platte wurde wiederum mit einem neuen Abdichtungsfilm zugeklebt werden und dann in Aluminiumfolie eingewickelt. Die verschlossene 96-Well-Platte wurde nun auf dem Rüttler für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Geschwindigkeit lief für dreißig Sekunden auf 1100 rpm und wurde dann für die restliche Zeit auf 300 rpm eingestellt. Danach wurden die Wells der Platte dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen (wie bereits beschrieben).

Assay-Puffer/Messung

Zum Schluss wurden 125 µl Assay-Puffer in jedes Well hereingeben. Die Platte wurde nun mit einem neuen Abdichtungsfilm (mitgeliefertem Sealing-Tape) zugeklebt. War die Platte zuvor ausgelaufen, wurde nach dem Abtrocknen und vor dem Einfüllen des Assay-Puffers die Platte mit einem zusätzlichen Sealing-Tape von unten zugeklebt.

Diese verschlossene 96-Well-Platte wurde auf dem Rüttler für vier Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Geschwindigkeit wurde zunächst auf 1100 rpm für dreißig Sekunden eingestellt und dann für die restliche Zeit auf 600 rpm. Zuletzt wurde der Abdichtungsfilm entfernt und die Messung bei dem eine Stunde zuvor eingeschalteten Bio-Plex Suspension Array System gestartet.

3.5 Western Blot

Durch die AG Dörner (Charité Berlin) wurde extern nach Standardprotokoll ein Western Blot zur Bestimmung der der Reaktivität und Spezifität der immunisierten Kaninchen gegen CTA1 durchgeführt. Beim Western Blot werden Proteine in eine Elektrophorese aufgegeben und danach auf eine Trägermembran übertragen (blotting) und anschließend

durch verschiedene Reaktionen nachgewiesen. Die Übertragung wird nach Gelelektrophorese (NuPage 4-12%-Gel) durchgeführt. Das Proteingemisch im Serum wird nach Größe und Ladung in Proteinbanden aufgetrennt. Hier lassen sich nach Proteintransfer die Mengen in den verschiedenen Proteinen des Gels nachweisen. Die Markierung der Eiweiße erfolgte durch Chemilumineszenz. Diese wurden via ECL im Luminescent-Image Analyser/FujiFilm LAS-4000 detektiert. (Renart 1979).

3.6 Statistische Verfahren

Zur statistischen Analyse wurde die Software GraphPad Prism 4 und 6 verwendet. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Auf Grund der nicht normal verteilten Datensätze wurden nicht-parametrische Tests zur Analyse herangezogen. Um die Normalverteilung zu testen, wurden zwei statistische Verfahren angewendet. Nach den Berechnungen mittels Shapiro-Wilk und D'Agostino-Pearson sind die Patientendaten nicht normal verteilt. Für die Korrelationsanalysen wurde der Spearman- Korrelationskoeffizient benutzt. Für die Gruppenvergleiche wurde der Kruskal-Wallis-Test mit einer Dunns-Post-Hoc-Analyse angewendet. Ein Probabilitätswert $P < 0,05$ wurde in allen verwendeten Testverfahren als statistisch signifikant eingestuft. Die Standardabweichung in den Ergebnissen wurde mittels der in der Excel-Formatvorlage enthaltenem Standardabweichungs-Tool berechnet.

Allein für die Fallzahlanalyse der positiven Titer wurde zur Berechnung Fischer's Exact- bzw. Chi-Square-Test genutzt.

4 ERGEBNISSE

Es wurden zunächst acht Seren ausgewählt, bei denen ein großes Probenvolumen an Serum vorlag, um eine ausreichende Menge über die gesamte Dauer dieser Arbeit zu gewährleisten. Die Seren waren Patienten in der Klinik für Kardiologie und Pulmologie im Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin entnommen worden und zu Diagnostik- und Forschungszwecken in dem Institut für kardiale Diagnostik und Therapie (IKDT) weiter analysiert worden. Hier fanden auch alle im Weiteren beschriebenen Methoden und Versuchsreihen statt. Die Patientenserum wurden mit einer IKDT-internen Patientenummer versehen. Zunächst wurden Patientenserum mit bereits etablierten Testverfahren, mittels zwei kommerziell erhältlicher Verfahren der Fa. Euroimmun und Fa. CellTrend untersucht. Im Anschluss wurde die Ergebnisse zu den Ergebnissen der Multiplex - Methode korreliert.

4.1 Immunfluoreszenz auf Affenherzmuskeln (Fa. Euroimmun)

Die durch die Firma Euroimmun genutzte Methode ist ein Suchtest für Antikörper gegen myokardiale Bestandteile (einzelne Zellbestandteile: siehe Tabelle 3). Acht vorselektierte Patientenserum wurden auf Autoantikörper gegen Gewebestandteile getestet. Eine Positiv- und Negativkontrolle wurde bei den Versuchen mitgeführt. Die Methode dazu ist ausführlich im Kapitel 2 des Methodenteils beschrieben. Als Ergebnis zeigte sich in der 1:10 Verdünnung, dass drei Patientenserum positiv reagierten. Ein Patientenserum zeigte den Nachweis von Antikörpern gegen Zellkerne (4593), ein weiteres gegen Zytoplasma (4632) und ein drittes deutlich positiv gegen Glanzstreifen (4680). Fünf Seren zeigten keine Reaktion mit den Affenherzmuskeln.

Tabelle 3: Ergebnisse Referenzpatienten Euroimmun

Patienten Nr.	Zellkerne	Zytoplasma	Querstreifung	Binde- gewebe	Glanz- streifen
Neg Kontrolle	–	–	–	–	–
Pos Kontrolle	++	++	++	++	++
4593	+	–	–	–	–
4602	–	–	–	–	–
4613	–	–	–	–	–
4614	–	–	–	–	–
4621	–	–	–	–	–
4632	–	+	–	–	–
4665	–	–	–	–	–
4680	–	–	–	–	++

Anmerkung. Die getesteten Patienten und ihre Fluoreszenzreaktion auf Anteile der Herzmuskelzelle. + steht für Fluoreszenzreaktion; – für keine Reaktion. Die Reaktion wurde per Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen (Serumverdünnung 1:10).

Bei einer Verdünnung von 1:100 gab es keinen Fluoreszenznachweis mehr. Die acht getesteten Humanseren wurden primär zum Aufbau des Multiplex-ELISA als Referenzproben genutzt. Ergebnisse konnten mit denen des Multiplex-ELISA im Verlauf verglichen werden.

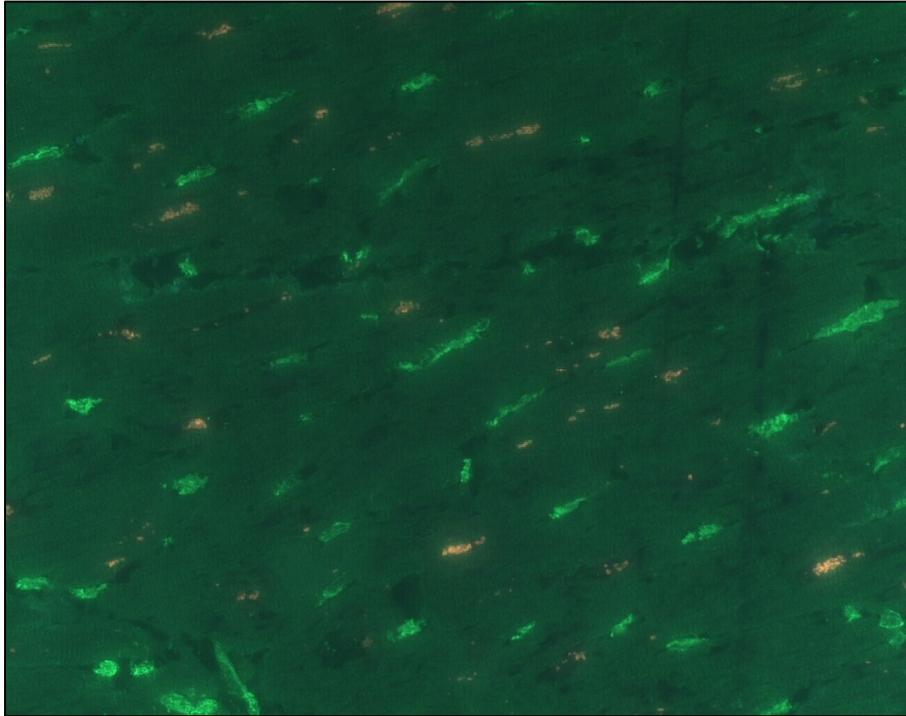


Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopie nach Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne (Humanserum 4593)

Quelle: IKDT, 2010, Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung 4 zeigt die Darstellung und Nachweismethode eines fluoreszenzmarkieren Affenherzmuskels nach Inkubation mit Humanserum.

4.2 Einzel-ELISA auf β 1-adrenergen Rezeptor-Antikörper (Fa. CellTrend)

Zum Zeitpunkt der Arbeit war ein einziger kommerzieller Einzel-Assay (ELISA) gegen einen kardialen Autoantikörper (β 1-adrenergen Rezeptor-Antikörper) verfügbar. Hier wurden 78 Patientenseren (andere als die acht Humanseren der Vorversuche) auf den β 1-adrenergen Rezeptor-Antikörper getestet. Diese Ergebnisse wurden im Verlauf als Vergleichsmöglichkeit zu den Endergebnissen des zu etablierenden Multiplex-ELISA herangezogen. Die Versuche mit dem kommerziellen Kit wurden extern durchgeführt. In diesem Einzel-ELISA (Fa. CellTrend), wurde nach eigens angelegter Skalierung (von 0 bis 40) der Durchschnittswert der Doppelbestimmung ab Einheit 17 als positiv gewertet (Standard des kommerziellen ELISA). Die 78 Humanseren wurden bereits vor Testung

klinisch und mittels Biopsie - Diagnostik in verschiedene Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 4). Die detaillierten klinischen Angaben sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

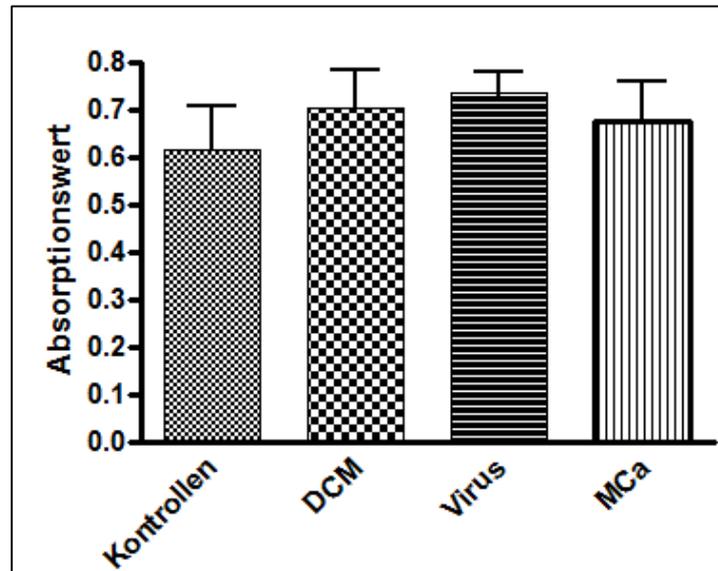


Abbildung 5: ELISA für AK gegen β 1-adrenerger Rezeptor (Fa. Celltrend)

Anmerkung. Der β 1-adrenerger Rezeptor (β 1-AR) (getestet von der Firma CellTrend). Aufgeführt sind hier die klinischen Gruppen mit den durchschnittlichen Fluoreszenzwerten nach der Fa. CellTrend (incl. Standardabweichung). Die Skalierung wurde zu Zwecken der Übersichtlichkeit in andere Fluoreszenzeinheiten umgewandelt.

Wie in der Abbildung 5 zu sehen ist, ergaben die reinen Messwerte keine großen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Auch in den statistischen Verfahren zeigten sich keine Signifikanzen ($p=0,097$). Die weitere Aufspaltung der Virusgruppe nach unterschiedlichen Virustypen zeigte ebenfalls keinerlei Signifikanzen ($p=0,351$). Die gleichen Seren wurden später mit dem Multiplex-ELISA gemessen. Die Standardabweichung (SD) betrug zwischen 28,57 und 33,33 %.

Im Ergebnis zeigten 14 der 78 Humansenen einem erhöhten β 1-adrenergen Rezeptorautoantikörpertiter. Dieses entspricht 18 % der gemessenen Patienten. Für die einzelnen Gruppen ergab sich die folgende Verteilung.

Tabelle 4 zeigt die Anzahl positiver Proben für die einzelnen klinischen Gruppen (CellTrend) und Gesamtergebnisse des kommerziellen ELISA (CellTrend) mit den Messdaten der 78 Patienten. Die einzelnen Messwerte wurden den Gruppen nach den bereits vorher

gestellten klinischen Diagnosen zugeordnet. Ab dem Wert von 17 (interne CellTrend-Einheit) waren die humanen Seren als positive Titer definiert worden. (Gesamt P-Wert, $p=0,581$)

Tabelle 4: Ergebniszusammenfassung für die einzelnen klinischen Gruppen (CellTrend)

Gruppen	Anzahl positive Titer (Humanseren)	Anteil an der klinischen Gruppe
Kontrollen (gesunde Patienten)	0	0 %
DCM	4	19 %
Virus	9	22 %
MCA	1	11 %

Gesamtergebnisse des kommerziellen ELISA (CellTrend) mit den Messdaten der 78 Patienten. Die einzelnen Messwerte wurden den Gruppen nach den vorher gestellten klinischen Diagnosen zugeordnet. Ab dem Wert von 17 (interne CellTrend Einheit) waren die Humanseren als positive Titer definiert worden. (Gesamt P-Wert, $p=0,581$)

In der Virusgruppe, und bei Patienten mit DCM, war der Anteil der hochtitrigen Humanseren am höchsten. In der Kontrollgruppe ergaben sich erwartungsgemäß keine erhöhten Titer. In der Gruppe mit akuter Myokarditis waren die Werte am niedrigsten. Allerdings sind die Gruppenunterschiede nicht signifikant ($p=0,581$). Auch eine weitere Aufspaltung der Virusgruppe in seine Untergruppen (Virusgruppe in Coxsackiegruppen) zeigte ebenfalls keine signifikanten Werte. Die statistische Korrelation ist zum Ende des Ergebnisteils auch im Vergleich zu den Ergebnissen des Multiplex-ELISA aufgeführt. Im Folgenden wird zunächst der Gruppenvergleich der Einzel-ELISA Methode (Firma CellTrend) dargestellt.

4.3 Beginn Aufbau der Methode: Singleplex-ELISA

Nachdem zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur ein kommerzieller Test verfügbar war, der Autoantikörper bei Herzmuskelerkrankungen nachweisen konnte, musste mit der Entwicklung eines eigenen Assays begonnen werden. Die Methode wurde zunächst als Singleplex- (Einzelnachweismethode) Assay, später dann als Multiplex-Assay durchgeführt. Hierzu wurden acht Humanseren mit großem Probenvolumen ausgewählt (Vorversuchsserie), die bereits in der Euroimmunmethode verwendet wurden (Vergleichsergebnis

siehe 3.1.). Für jedes der acht Autoantigene (ARA1, ANT 1 u. 2, CMA 1,2,3 und CTA 1 u. 2) wurden als erstes der Einzeltest (Einzel - ELISA, Singleplex) entwickelt. Zunächst mussten viele einzelne Parameter der Methode eingestellt und getestet werden, die im Folgenden aufgeführt sind. Der Aufbau der Methode fand ausschließlich an acht Referenzpatienten statt. Zum Schluss wurden die 78 Patientenserum gemessen und die jeweiligen Ergebnisse mit dem kommerziellen Kit der CellTrend-Methode verglichen.

4.3.1 Kalibrierung des Bio-Plex Suspension-Array-Systems

Das Array-System für die Bio-Plex-Suspension wurde mit der Einstellung „High“ oder „Low“ -kalibriert. Da aber nicht bekannt war, inwiefern sich die Einstellungsänderung auf Sensitivität des Tests auswirkt, wurden bei einem Patientenserum Messungen in einer Verdünnung von 1:200 in Doppelbestimmung mit verschiedenen Autoantikörpern sowohl in einer High- als auch Low-Kalibrierung durchgeführt. Das Ergebnis zeigte einen sechsfach höheren Fluoreszenzwert mit der Kalibrierung „High“ im Vergleich zur Kalibrierung „Low“ (vgl. Abbildung 6).

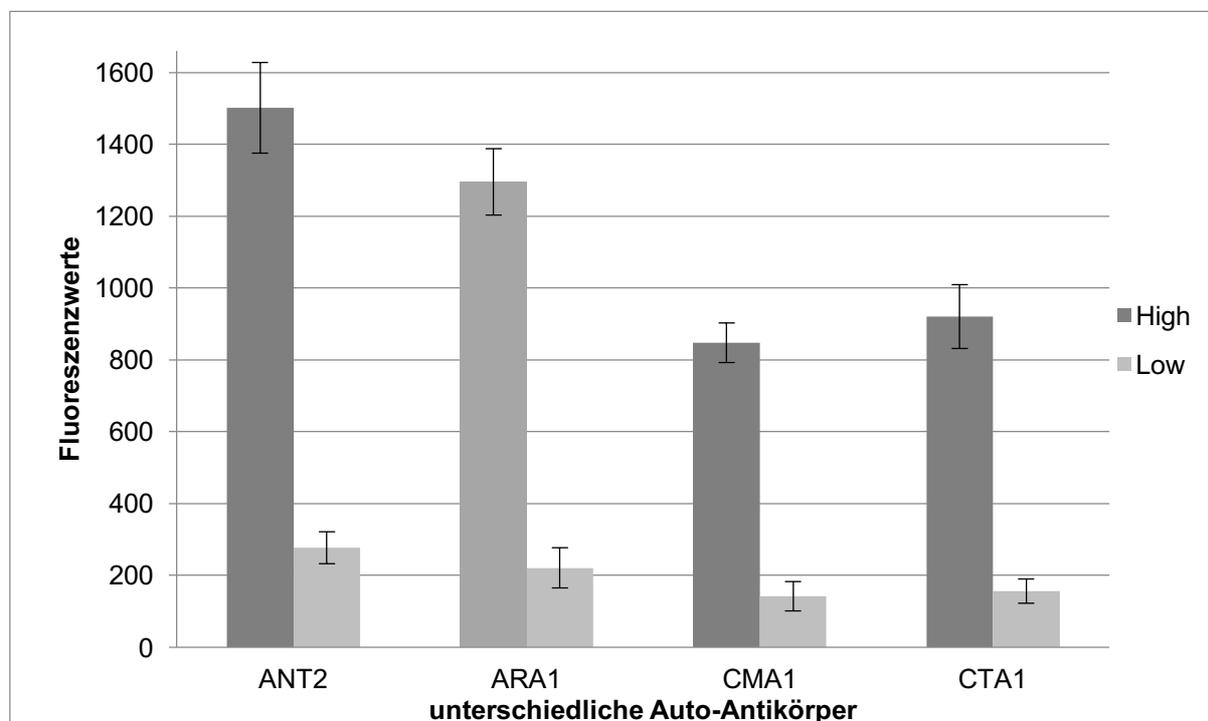


Abbildung 6: Vergleich der Kalibrierung "High" und "Low"

Anmerkung. Messung des Patientenserums 4593 (Verdünnung 1:200) mit unterschiedlicher Kalibrierung des Bio-Plex Suspension Array - Systems. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse von 4 Autoantikörpern der Einstellung: High und Low.

In der Kalibrierungsstufe „High“ deutlich geringere Standardabweichungen im Rahmen der Messschwankungen zwischen den Doppelbestimmungen dieses Versuches war, Daher wurde die Kalibrierungsstufe „High“ als Standard für alle folgenden Versuche gesetzt. In der tabellarischen Ergebnisdarstellung zeigen sich folgende Werte.

Tabelle 5: Resultat der SD (Einstellung "High" und "Low")

	ANT2	ARA	CMA1	CTA1
High Standardabweichung	126,5	92	55,5	89
SD High in (%)	8,42	7,1	6,54	9,66
Low Standardabweichung	44	56,5	41	34,5
SD Low in (%)	15,91	25,62	29,08	22,12

Anmerkung. Standardabweichungen der Fluoreszenzwerte in der in Doppelbestimmung gemessenen Kalibrierungsstufen „High“ und „Low“. Einheiten sind die Fluoreszenzeinheit von Bio-Plex.

4.3.2 Aufbau des Singleplex-ELISA mit immunisierten Kaninchenseren

Um die Methode aufzubauen und optimieren zu können, wurde zunächst ein Referenztest mit Kaninchenseren etabliert. Hierfür waren 2 Kaninchen auf CTA 1-immunisiert worden (Immunisierung extern durchgeführt). Um die Nachweisgrenze zu bestimmen, wurden Testreihen mit Kaninchenserum in 15 Verdünnungen (1:4, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:10.000, 1:20.000, 1:50.000, 1:100.000 und 1:1.000.000) durchgeführt. Die Methode wurde als Singleplex durchgeführt, da die Kaninchen nur auf einen Autoantikörper immunisiert wurden. Die Methode wurde standardmäßig durchgeführt, nur der Fängerantikörper war ein spezifisches Anti-Kaninchen-IgG. Durch die hochtitrige Immunisierung der Kaninchen, wurde bei den geringen Verdünnungen (1:4, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100) ein Maximalwert der Fluoreszenz von 24.000 erzielt. Damit waren diese Verdünnungen unbrauchbar für eine Eichkurve, da der wirkliche Fluoreszenzwert nicht messbar war. Somit wurden bei den Kaninchenseren nur höhere Verdünnungen verwendet.

Vergleichstestung der vorhandenen Kaninchenserum

Von der Firma Open Biosystems (Thermo Fisher Scientific) waren zwei Kaninchen mit einem Peptid vom kardialen Troponin 1 (siehe Tabelle 2, CTA1) immunisiert worden. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurde Serummaterial entnommen (Tag 0, Tag 35, Tag 56). Das hochtitrige Serum vom Tag 35 unterschied sich in dort durchgeführten laborinternen Messungen nicht vom Tag 56. Die Seriennummern der Kaninchen waren PA2348 (Kan. 1) und PA 2349 (Kann. 2) auf CTA 1 immunisiert (Protokoll: Crude antibody Sera 2 rabbit 70 days) Open Biosystems.

Zunächst wurden beide Seren in einer Messung in den Verdünnungen 1:10.000, 1:20.000, 1:50.000 und 1:100.000 verglichen, um zu klären, welches Serum in welcher Verdünnung sich am besten für die Eichkurve eignete.

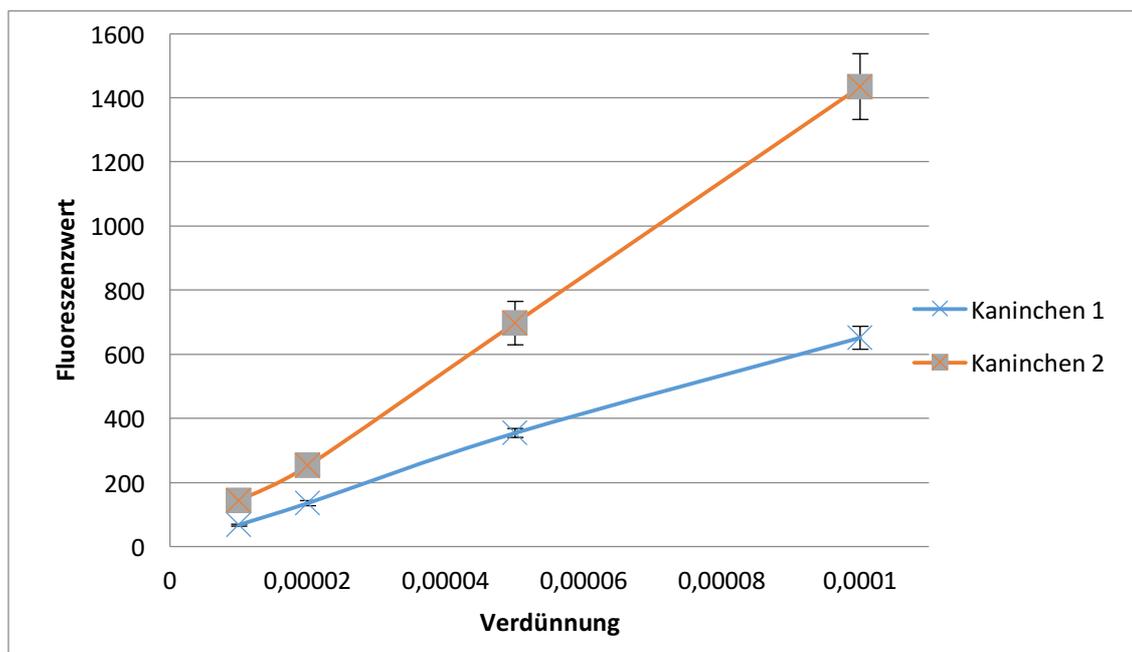


Abbildung 7: Vergleich der Kaninchenserum (1 und 2)

Anmerkung. Unterschiedliche Antikörperkonzentrationen in den beiden Seren der immunisierten Kaninchen. Auf der X-Achse finden sich die unterschiedlichen Verdünnungen (oben benannt), auf der Y-Achse die Ergebnisse in Fluoreszenzeinheit (BioPlex)

Zu sehen ist die Korrelation der Höhe der Fluoreszenzeinheit mit der Konzentration der Antikörper in den Seren.

Tabelle 6: Resultat SD Kaninchenserum

Kan. Serum Verdünnungen→	1 zu 10.000	1 zu 20.000	1 zu 50.000	1 zu 100.000
Kan. 1 Standardabweichung	35,76	13,43	7,78	7,07
SD Kan. 1 in (%)	5,48	3,78	5,74	10,55
Kan. 2 Standardabweichung	24,75	68,58	31,82	3,53
SD Kan. 2 in (%)	1,72	9,83	12,60	2,46

Anmerkung. Standardabweichungen der Kaninchen 1 und 2 (Kan. 1 u. 2) in den unterschiedlichen Verdünnungen. Standardabweichung ist in der Bio-Plex Fluoreszenzeinheit angezeigt.

Das Ergebnis war, dass Kaninchenserum 1 einen niedrigeren Fluoreszenzwert erreichte, jedoch damit einen stabileren Anstieg hatte. Deutlich hochtitriger war Kaninchenserum 2, die Standardabweichung zwischen den gemessenen Werten war hier größer. Die Seren zeigten eine hohe Reaktivität gegen das Autoantigen CTA-1. Kaninchen Serum 2 zeigte höhere Titer und wurde für die Testentwicklung als Referenzsystem genutzt.

Westernblot Kaninchenserum

Zusätzlich zu den Messungen im Bio-Plex Assay, wurde durch die Arbeitsgruppe um Dörner (im CBF, Charité Berlin) ein Westernblot mit den beiden Kaninchenserum durchgeführt. Hierdurch sollte die Reaktivität und Spezifität der Seren gegen das Zielprotein, Troponin I (CTA1) gezeigt werden. Die Bindungsstellen von Troponin I für Ratte und Kaninchen ist für die gegen humanem CTA 1 gleich.

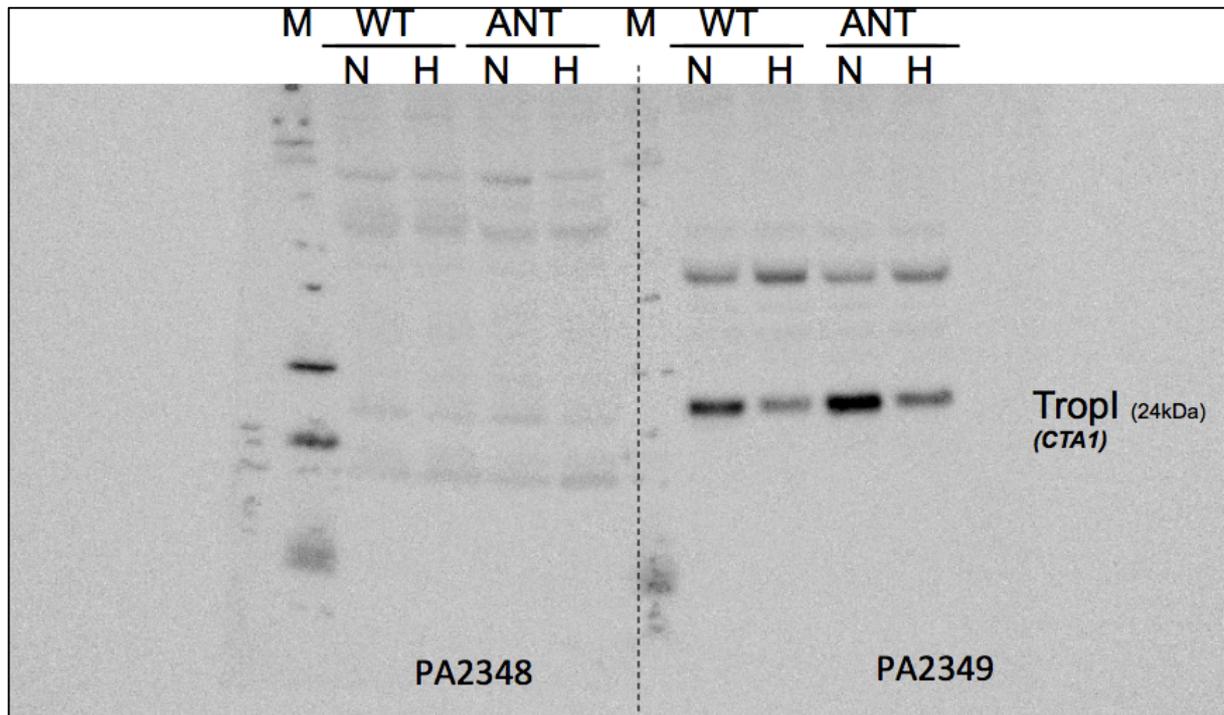


Abbildung 8: Westernblot der immunisierten Kaninchenseren

Durchführung: NuPage 4-12%-Gel, PVDF-Membran, Novex-Sharp-Proteinstandard (M), aufgetragen wurden 40µg Protein aus Wildtyp (WT) und ANT-transgenen (ANT) neonatalen Rattenkardiomyozyten, die unter normoxischen (N) oder hypoxischen (H) Bedingungen kultiviert wurden. Detektion: Chemilumineszenz via ECL im Luminescent Image Analyser/FujiFilm LAS-4000. (PA2348= Kaninchen 1; PA2349= Kaninchen 2)

Wie man auf der Abbildung 10 sehen kann, zeigt das Kaninchenserum Nr. 2 eine deutlich intensivere Nachweisbarkeit des CTA-Antikörpers als Nr. 1. Für alle Kaninchenversuche wurde aufgrund des erhöhten Titers, sowohl im ELISA als auch im Westernblot, nur das Serum von Kaninchen 2 genutzt.

Bestimmung der Intraassay-Genauigkeit bei Dreifachbestimmung

In einem weiteren Versuch wurde in einer Dreifachbestimmung die Abweichung zwischen den einzelnen Messungen und damit die Genauigkeit bestimmt. Aus diesen Werten konnte eine Eichkurve erstellt werden.

Tabelle 7: Ergebnisse Kaninchenserum in unterschiedlichen Verdünnungen

Verdünnung	Kan. 2 1.Versuch	Kan. 2 2.Versuch	Kan. 2 3.Versuch	Durchschnitt	SD in (%)
1 zu 500	5838	5382	4637	5285,66	11,47
1 zu 1000	3761	3968	4321	4016,66	7,05
1 zu 2500	2527	1818	2231	2192	16,25
1 zu 5000	1149	1047	1109	1101,66	4,67
1 zu 10000	611	555	574	580	4,91
1 zu 20000	271	263	298	277,33	6,61
1 zu 50000	131	119	142	130,66	8,8
1 zu 100000	66	65	67	66	1,52

Anmerkung. Ergebnisse in dreifachem Ansatz wiederholt. Die Messung wurde in einem Durchgang (Singleplex CTA1) durchgeführt. Werte sind als Fluoreszenzwerte nach Bio-Rad angegeben. (Kan. = Kaninchen)

Sowohl bei den Daten (siehe Tabelle 7) als auch in der Grafik konnte man Abweichungen zwischen den einzelnen Fluoreszenzwerten innerhalb einer Versuchsreihe sehen. Sie betrug zwischen 1,5 und 16,25 Prozent. Anhand der Daten konnte ein Trend etabliert werden. Bei stärkeren Verdünnungen wurden die Abweichungen der Messwerte geringer und waren somit reproduzierbarer. Es zeigte sich bei den Messungen ein Messbereich von 60 bis 5800 Fluoreszenzeinheiten.

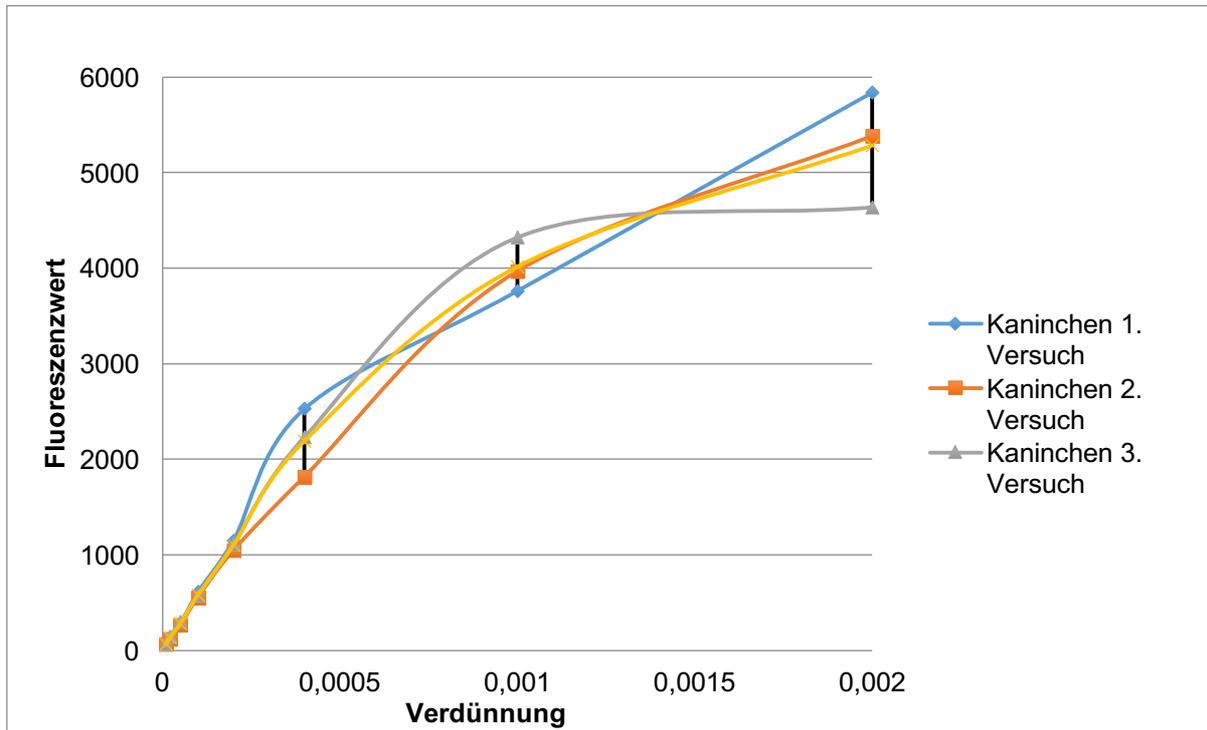


Abbildung 9: Abweichung bei der Dreifachbestimmung (Kaninchenserum)

Anmerkung. Eine der Eichkurven gemessen mit Kaninchenserum. Graphische Darstellung der verschiedenen Verdünnungen. X-Achse: Verdünnung (1:500 – 1:100.000). Y-Achse: Fluoreszenzwert

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden alle Versuche, sowohl bei Kaninchenserum, als auch bei humanen Seren, in höherer Verdünnung zunächst mit niedrigerer Antigenkonzentration und mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt.

Vergleich der Bio-Rad Serumverdünnungsmittel mit Kaninchenserum.

Als Bestandteil der Assays der Firma Bio-Rad gab es verschiedene Serumverdünnungsmittel.

Um die Auswirkungen auf den Fluoreszenzwert bei Benutzung verschiedener Verdünnungsmittel (Diluent) für das Kaninchenserum zu sehen, wurde ein Versuchsansatz in dreifacher Bestimmung und in drei verschiedenen Verdünnungen in beiden Serum-Diluenten durchgeführt. Diese Serumverdünnungsmittel (Sample bzw. Standard Diluent) sind von der Firma Bio-Rad schon vorbereitet geliefert worden. Deren Inhaltsstoffe sind Betriebsgeheimnis. Die Ergebnisse sind tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 8: Beispiel für eine Tabelle

	Kaninchen Serum 1 zu 1000	Kaninchen Serum 1 zu 5000	Kaninchen Serum 1 zu 10.000	Kaninchen Serum 1 zu 50.000
Sample Diluent	23758,66	16436,33	9063,33	4334
<i>SD in (%)</i>	17,79	18,45	42,45	17,64
Standard Diluent	3751	1304	1160,66	359,33
<i>SD in (%)</i>	13,58	9,96	4,25	6,15
facher-Unterschied zwischen Sample/Standard	6,33	12,6	7,8	12,06

Anmerkung. Unterschiede der Messwerte zwischen den beiden Verdünnungsmitteln für das Kaninchenserum. Es wurden der Sample-Diluent und der Standard-Diluent von der Firma Bio-Rad verglichen. Als Ergebnis ist der Änderungsfaktor vom Standard- zum Sample-Diluenten aufgeführt.

Das Ergebnis war ein im sechs- bis zwölffach höherer Fluoreszenzwert beim Sample-Diluent im Gegensatz zum Standard-Diluenten. Da größere Abweichungen bei den hohen Werten beim Sample Diluent bestanden, wurde für zukünftige Messungen der Standard- Diluent als standardisiertes Verdünnungsmedium für alle Seren für die weiteren Versuche genommen.

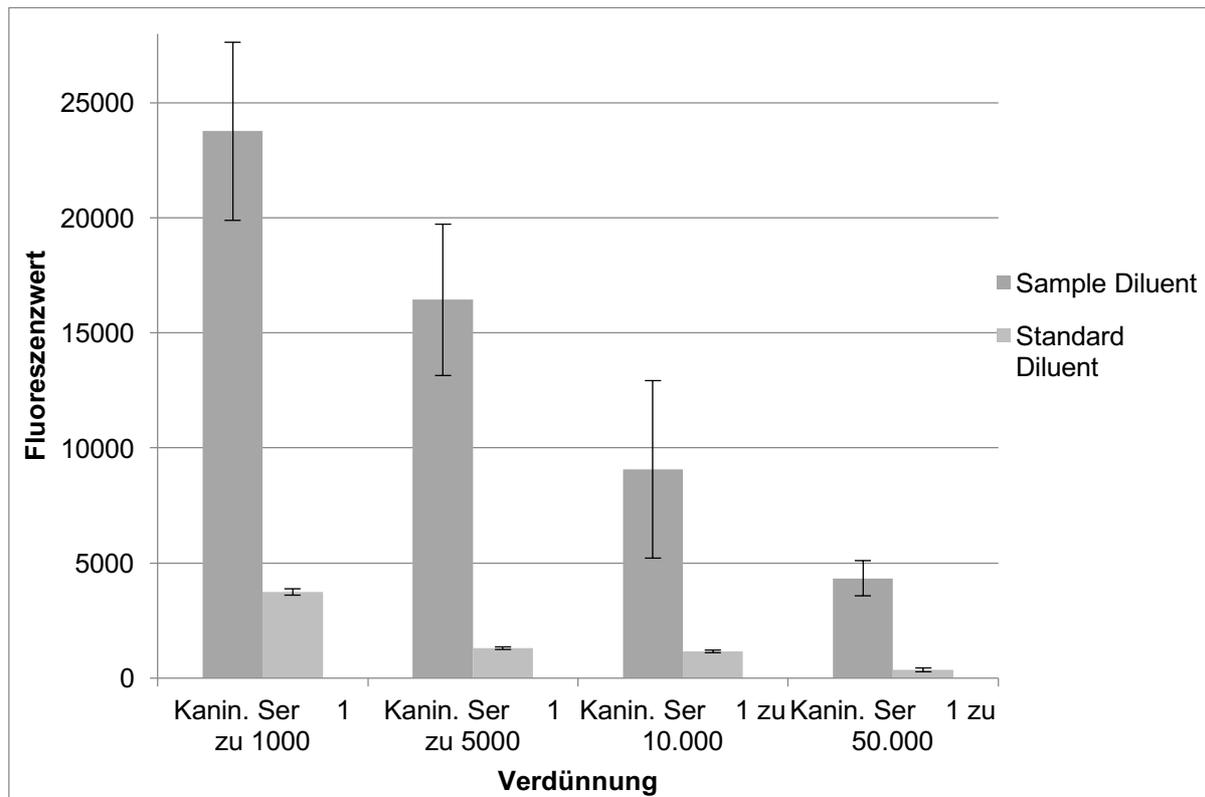


Abbildung 10: Vergleich der Verdünnungsmittel bei Kaninchenserum

Anmerkung. Vergleich des Sample-Diluenten mit dem Standard-Diluenten bei Kaninchenserum. Der Sample-Diluent liefert einen zehnfach höheren Fluoreszenzwert im Gegensatz zum Standard-Diluenten. Der Schwankungsbereich der hohen Sample-Diluent-Werte ist deutlich größer.

Mit gesammelten Daten und Erfahrungswerten durch die Messungen mit dem immunisierten Kaninchenserum, konnten nun Messungen mit humanen Seren beginnen.

4.3.3 Etablierung mit humanen Seren

Etablierung der „negativen Reaktion“.

Um herauszufinden wie viel Hintergrundfluoreszenz in jedem Well als Minimum stattfindet, wurde ein „Negativtest“ mit einem nicht-spezifischen Fängerantikörper durchgeführt. Der Fängerantikörper war ein mausspezifischer Antikörper und wurde im Multiplex-ELISA auf drei Patientenseren eingesetzt. Ziel war es, die Fluoreszenzreaktion ohne den richtigen Bestandteil der Versuchsanordnung zu sehen und ob fälschlicherweise trotzdem Anteile des Versuches falsch positive Ergebnisse liefern.

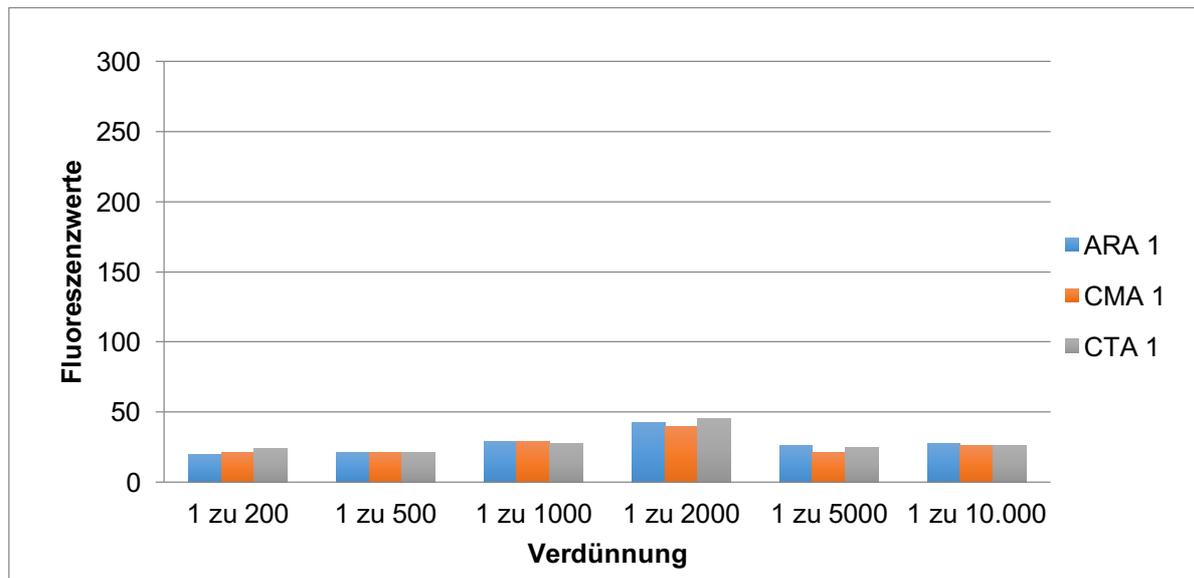


Abbildung 11: Negative Reaktion bei humanen Seren

Anmerkung. Fluoreszenzwerte bei negativer Reaktion im Multiplex-ELISA anhand des Beispiels des Patientenserums 4621. Die einzelnen Balken stehen beispielhaft für verschiedene Autoantikörper. Damit wurde ein negativer Cut-off bei dem Wert 50 festgelegt.

Es zeigte sich, dass sich bei einer „negativen Reaktion“ ein Fluoreszenzwert zwischen 15 bis 45 gemessen wurde. Damit wurden zunächst als negative Reaktion alle Werte unter 50 (Fluoreszenzwert) gewertet. Um herauszufinden, ob sich durch Austauschen oder Weglassen einzelner Methodik- Komponenten dieser als „negative Reaktion“ angesehener Wert bestätigen lässt, wurden weitere im Anschluss beschriebene Versuche durchgeführt. Zunächst wurde in einem Versuchsansatz das Serum weggelassen, und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Fängerantikörpers und unterschiedlichen Konstellationen von Sample- Diluent, Standard- Diluent oder Assay- Puffer getestet.

Tabelle 9: Versuchsanordnungen: negative“ Reaktion

Diluent	Beads mit gek. Antigen	Fängerantikörper Verdünnung	Änderungen am Versuch	Fluoreszenzwert
Sample	Ja	1 :1000	Ø Serum	159
Sample	Ja	1 :10.000	Ø Serum	79
Sample		1: 1000	Ø Serum, Beads	---
Standard	Ja	1 :1000	Ø Serum	156
Standard	Ja	1 : 10.000	Ø Serum	80
Standard		1 : 1000	Ø Serum, Beads	---
Assay Puffer	Ja	1 : 1000	Ø Serum, Diluent	---

Anmerkung. Ergebnisse im Weglassversuch von Serum mit verschiedenen Methoden Konstellationsänderung. Im Ergebnis zeigte sich ein höherer Wert von 160, der damit als Cut-off für eine „negative Reaktion“ galt. Mit dem Zeichen Ø sind die Anteile in der Versuchsordnung beschrieben, die weggelassen wurden.

Das Ergebnis dieses Versuches war, dass sich in einigen Kombinationen (Tabelle 9) ein Fluoreszenzwert bis 159 ergab. Somit wurde der im vorangegangenen Versuch als „negative Reaktion“ festgelegte Fluoreszenzwert von 50 nun auf 160 angehoben. Werte unter 160 wurden als Hintergrundfluoreszenz (falsch positive Fluoreszenz) gewertet.

Vergleich der Bio-Rad Serumverdünnungsmittel.

Nach dem vorangegangenen Vergleich zwischen den Verdünnungsmitteln bei den Kaninchenseren wurden auch die beiden von Bio-Rad zur Verfügung gestellten Sample- und Standard- Diluents bei humanen Seren verglichen. Es wurde an vier Patienten mit vier verschiedenen Autoantikörpern gemessen. Als Beispiel ist in der folgenden Grafik die Messung in einem Patientenserum (4593) mit zwei Autoantikörpern aufgeführt.

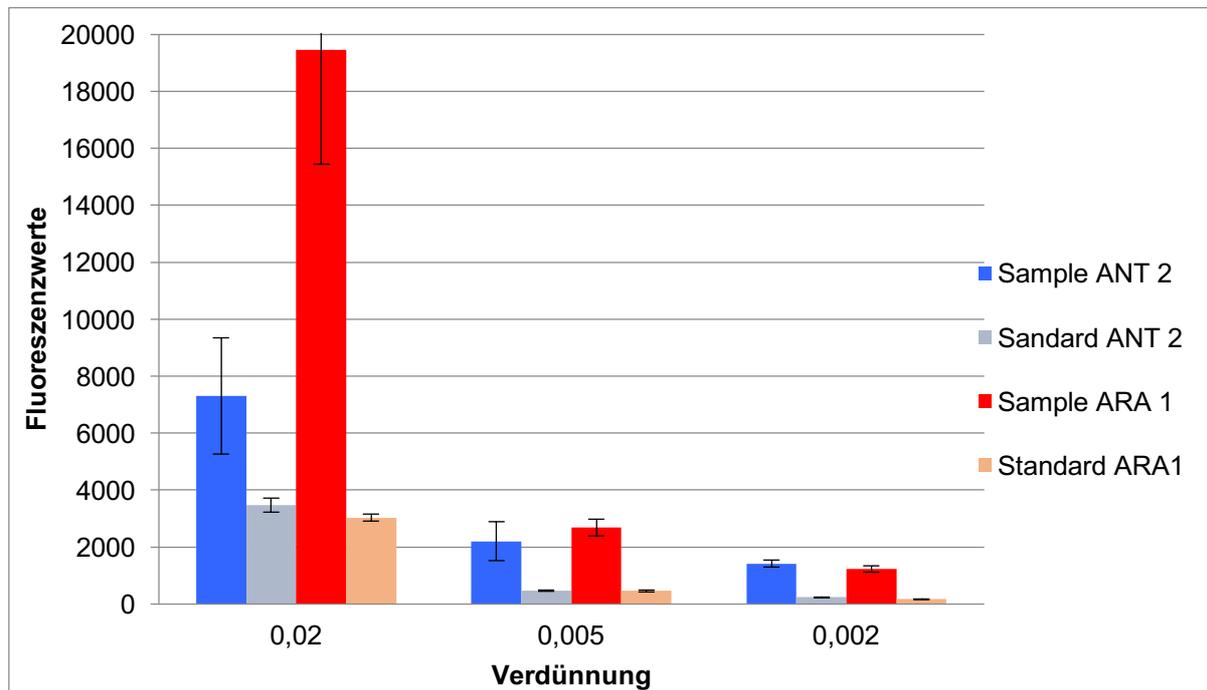


Abbildung 12: Vergleich der Verdünnungsmittel (humane Seren)

Anmerkung. Graphischer Vergleich der Verdünnungsmittel: Sample- und Standard- Diluent beim Patientenserum 4593 (als Beispiel mit zwei Autoantikörpern). Auf der X-Achse ist die unterschiedliche Verdünnung des Serums dargestellt, auf der Y-Achse die Fluoreszenzwerte (Ergebnisskala nach Bio-Plex)

Bei den humanen Seren gab es im Gegensatz zu den Kaninchenseren einen geringeren Fluoreszenzwertunterschied. Er lag in einem Bereich von einem 2,1- bis 7,3-fachen Unterschied zwischen Sample- und Standard- Diluent.

Tabelle 10: Unterschiedliche Verdünnungsmittel humanes Serum ANT2

ANT 2	Serum 1 zu 50	Serum 1 zu 200	Serum 1 zu 500
Sample Diluent	7296	2196	1413
Standardabweichung Sample Dil. in %	23,20	25,36	8,35
Standard Diluent	3474	466,5	233,5
Standardabweichung Standard Dil. in %	12,54	6,52	4,10
facher-Unterschied	2,1	4,7	6

Anmerkung. Serum des Patienten 4593 in verschiedenen Verdünnungen unter Vergleich der Verdünnungsmittel Sample- und Standard- Diluent: Der verwendete Autoantikörper war Adenin-Nukleotid-Translokase-2 (ANT2). Die Werte sind die Fluoreszenzeinheiten nach Bio-Rad.

Der Bereich des Unterschieds zwischen Standard- und Sample- Diluenten betrug das 2,1- bis 6-fache. Im Folgenden sind die Werte für die Verdünnungsmittel bei ARA aufgeführt.

Tabelle 11: Unterschiedliche Verdünnungsmittel humanes Serum ARA1

ARA 1	Serum 1 zu 50	Serum 1 zu 200	Serum 1 zu 500
Sample Diluent	19465	2689	1228
Standardabweichung Sample Dil. in %	20,62	10,78	9,04
<i>Standard Diluent</i>	3031	459,5	169,5
Standardabweichung Standard Dil. in %	7,94	8,49	4,01
facher-Unterschied	6,4	5,9	7,3

Anmerkung. Das Serum des Patienten 4593 in verschiedenen Verdünnungen unter Vergleich der Verdünnungsmittel Sample- und Standard- Diluent. Der verwendete Autoantikörper war der humane Beta1- adrenerge Rezeptor – Auto – Ak. (ARA1). Der Unterschied zwischen Standard- und Sample- Diluenten war 6,4 bis 7,3-fach.

Wie an den Standardabweichungen in den Tests mit Kaninchenseren (siehe Tabelle 8) zu sehen ist, hat der Standard-Diluent konstant die geringeren prozentualen Standardabweichungen. Besonders gering sind die Abweichungen bei Verdünnungen 1 zu 200 und 1 zu 500. Nach diesem Vergleich der Verdünnungsmittel wurde der Standard-Diluent als Standard für alle weiteren Messungen eingeführt.

Testung von unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Streptavidin-Phycoerythrin-Fluoreszenz und des Fängerantikörpers.

Die von Bio-Rad empfohlenen Verdünnungen des Streptavidin-Phycoerythrins von 1 zu 200 und des Fängerantikörpers, ebenfalls 1 zu 200, wurden in einer Testreihe auf ihre Testgenauigkeit überprüft. Dazu wurden in allen neun möglichen Kombinationen unterschiedliche Verdünnungen (1 zu 100, 1 zu 200, 1 zu 400) miteinander in Doppelbestimmung getestet. Der Probestpatient war einer der acht Testseren Autoantikörper in der Verdünnung 1 zu 200. Das Ergebnis dieser Testreihe war, dass die geringste Standardabweichung zwischen den in Doppelbestimmung getesteten Werten bei der Verdünnungskombination von 1 zu 400 sowohl bei Streptavidin-Phycoerythrin als auch bei dem Fängerantikörper nachgewiesen werden konnte.

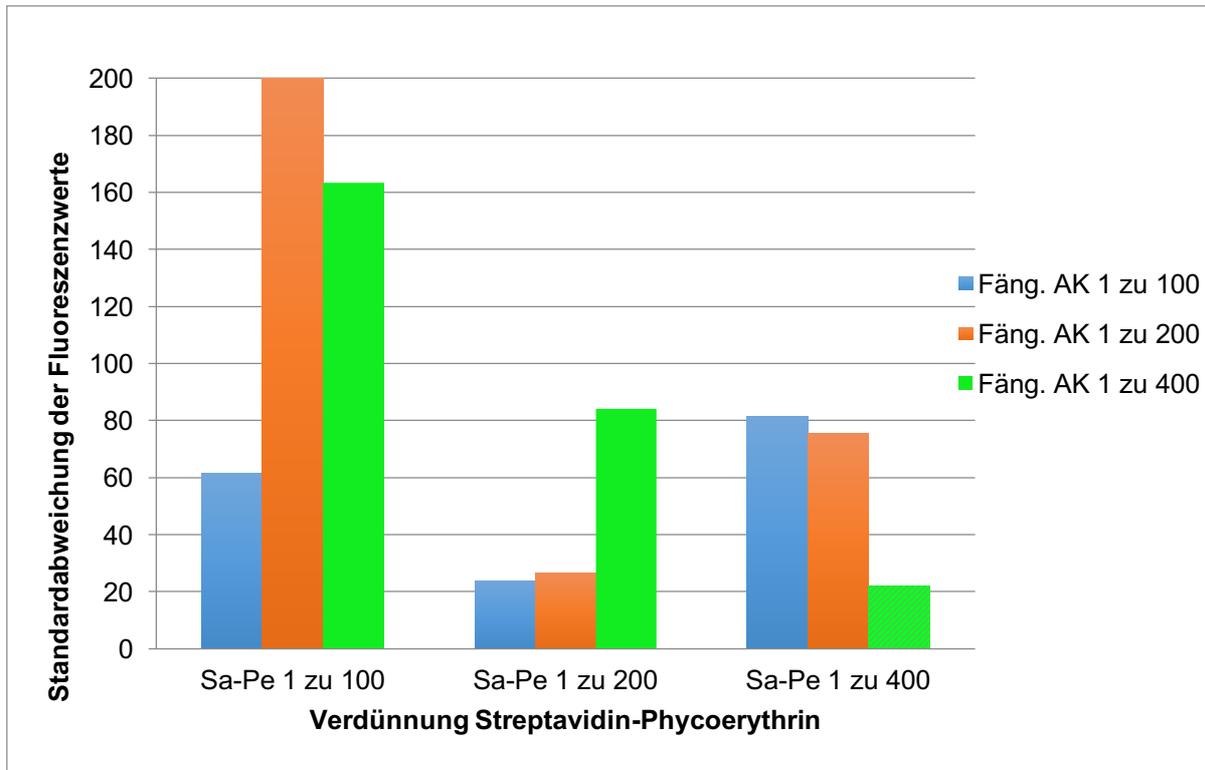


Abbildung 13: Standardabweichungen zwischen Doppelbestimmungen FängerAK/Sa-Pe

Anmerkung. Vergleich der Standardabweichungen der gemessenen Doppelbestimmungen von Streptavidin-Phycoerythrin und dem Fängerantikörper in verschiedenen Verdünnungen. Beide Parameter zeigen die geringste Standardabweichung bei der Verdünnung 1 zu 400.

Graphisch sind bereits die deutlichen Unterschiede bei den genutzten Verdünnungsstufen zu sehen. Besonders bei den niedrigen Verdünnungsstufen zeigen sich erhöhte Werte in der Standardabweichung. Im Folgenden sind diese prozentual dargestellt.

Tabelle 12: Fängerantikörper/Streptavidin-PE, Standardabweichungen in %

SD in %	Sa-Pe 1 zu 100	Sa-Pe 1 zu 200	Sa-Pe 1 zu 400
Fäng. AK 1 zu 100	12,19	8,91	24,09
Fäng. AK 1 zu 200	59,79	6,18	25,94
Fäng. AK 1 zu 400	51,61	23,94	4,79

Anmerkung. In dieser Tabelle sind die graphischen Unterschiede zwischen den Verdünnungen von den ELISA-Bestandteilen Streptavidin-Phycoerythrin (Sa-Pe) und dem Fängerantikörper (Fäng. AK) als Standardabweichung in Prozent dargestellt. Die geringste Abweichung ist markiert.

Aufgrund der geringsten Standardabweichung (4,79 %) wurden als Resultat dieses Versuches alle weiteren Versuche mit einer Streptavidin-Phycoerythrinverdünnung von 1 zu 400 und einer Fängerantikörper von ebenfalls 1 zu 400 durchgeführt. Diese Verdünnung zeigte eine ausstreichend starke Fluoreszenzreaktion.

4.4 Multiplex-ELISA

4.4.1 Resultatvergleich zwischen Single- und Multiplex-Assay

Nachdem die Vorversuche mit den Anpassungen der einzelnen Komponenten im Singleplex-ELISA in vielen Messungen stabil zeigten, wurde im Anschluss der Multiplex-ELISA als Methode etabliert.

Um gewährleisten zu können, dass sich der Single- vom Multiplex- Assay in der Ergebnisaussage nicht unterscheidet, wurde eine Vergleichsmessung mit denselben Patienten durchgeführt. Diese Versuchsreihe wurde mit drei Patienten (4621, 4632, 4680) und in zwei Verdünnungen (1 zu 200, 1 zu 500) durchgeführt. Exemplarisch werden hier zwei Patienten mit zwei Antikörpern dargestellt.

Tabelle 13: Ergebnisse Vergleich Multi- und Singleplex (Pat 4621)

	ANT2	CMA1
Multiplex	1291	438
Singleplex	1432	481,5
Standardabweichung	99,71	30,76
Standardabweichung in %	7,32	6,69

Anmerkung. In der Tabelle sind die Ergebnisse des Vergleichsversuches zwischen Multi- und Singleplex-ELISA aufgeführt. Der Patient 4621 wurde in einer Verdünnung von 1 zu 200 mit dem ANT2- und dem CMA1-Antikörper in beiden Systemen gemessen. Die Standardabweichung wurde zwischen den beiden Systemen errechnet. Zahlen entsprechen den Fluoreszenzwerteinheiten des Multiplex-Assays (BioPlex).

In den oben genannten Ergebnissen zeigt sich eine starke Kongruenz der Werte. Die Standardabweichung liegt zwischen über 5-10 %. Im Folgenden sind die Absolutwerte graphisch dargestellt.

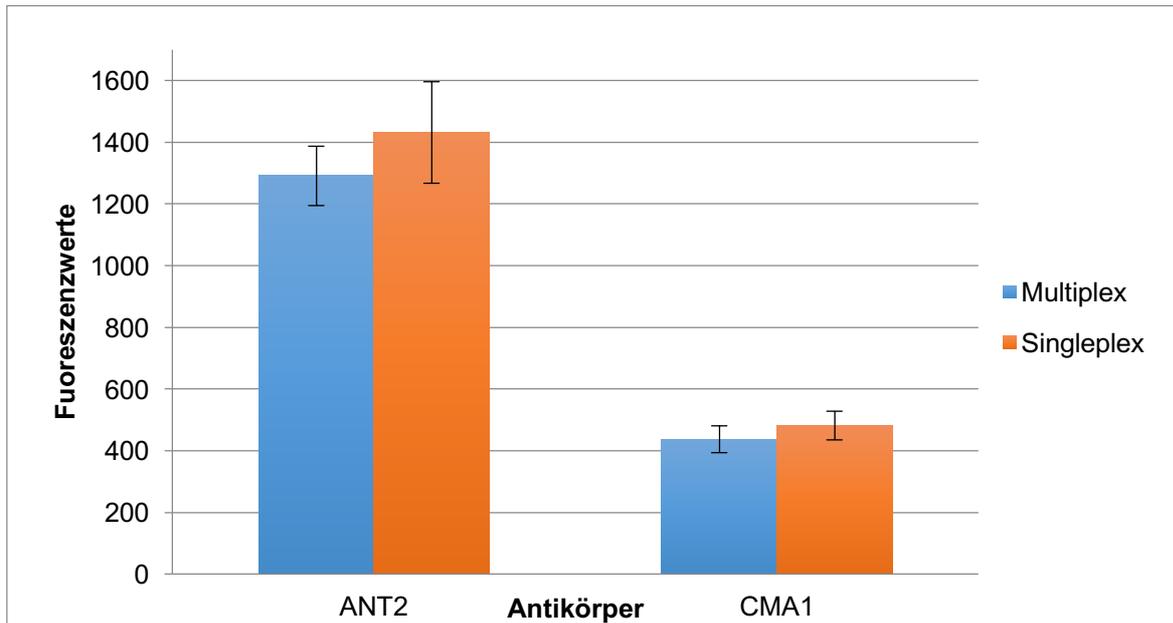


Abbildung 14: Vergleich Multi- mit Singleplex (Pat 4621)

Anmerkung. Der Vergleich zwischen Multi- und Singleplex-ELISA beim Patienten 4621 mit den beiden Autoantikörpern ANT2 und CMA1 in der Verdünnung 1 zu 200.

Es ergibt sich beim Patienten 4621 ein Unterschied zwischen den Messungen von 6,69 bis 7,32 Prozent (% SD). Im Folgenden ist exemplarisch ein weiterer Patient mit zwei Antikörpern aufgeführt.

Tabelle 14: Ergebnisse Vergleich Multi- und Singleplex (Pat 4680)

	ANT2	ARA
Multiplex	1862,5	808
Singleplex	1801,5	729,5
Standardabweichung	43,13351365	55,50788232
Standardabweichung in %	2,35	7,22

Anmerkung. In dieser Tabelle sind die Ergebnisse des Vergleichsversuches zwischen Multi- und Singleplex-ELISA aufgeführt. Der Patient 4680 wurde in einer Verdünnung von 1 zu 200 mit dem ANT2- und dem ARA- Antikörper in beiden Systemen gemessen. Die Standardabweichung wurde zwischen den beiden Systemen errechnet. Zahlen entsprechen den Fluoreszenzwerteinheiten des Multiplex Assays (Bio-Plex).

Es ergibt sich beim Patienten 4680 ein Unterschied zwischen den Messungen von 2,35 bis 7,22 Prozent (% SD). Im Folgenden sind die Absolutwerte graphisch dargestellt. Die prozentuale Abweichung zeigt auch hier erneut die Ähnlichkeit der Ergebnisse.

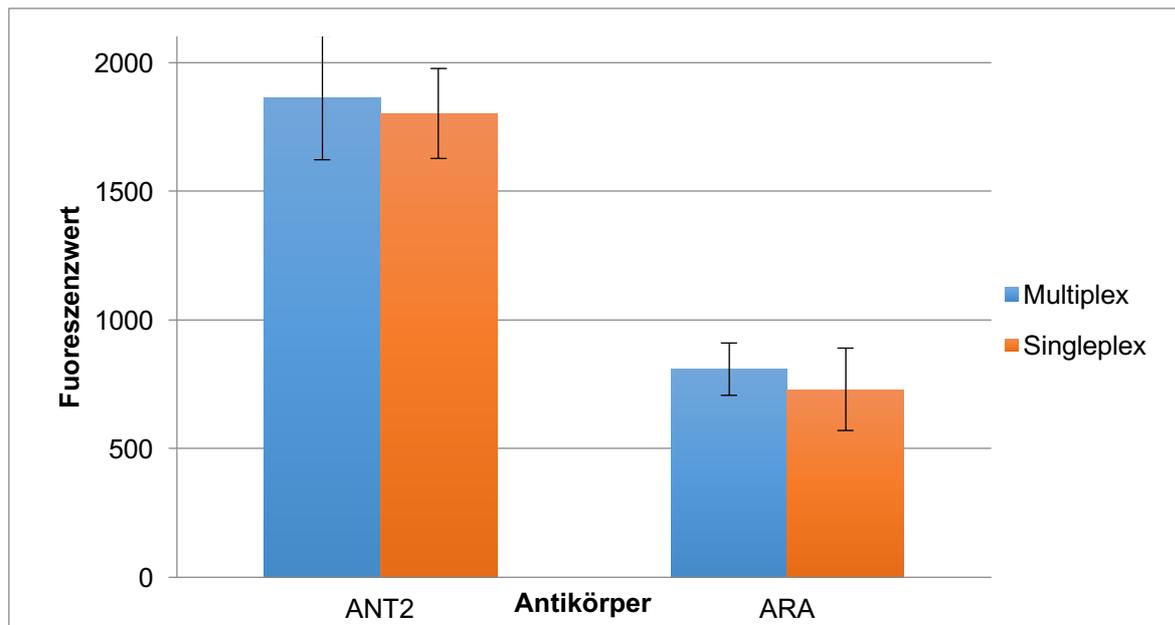


Abbildung 15: Vergleich Multi- mit Singleplex (Pat. 4680)

Anmerkung. Der Vergleich zwischen Multi- und Singleplex-ELISA beim Patienten 4680 mit den beiden Autoantikörpern ANT2 und ARA in der Verdünnung 1 zu 200

Das Resultat dieses Versuches war, dass trotz seiner etwas über Signifikanz liegenden Wertunterschiede zwischen einem Multi- und Singleplex-ELISA sich die Ergebnisse in den unterschiedlichen Systemen in der Tendenz nicht unterschieden und in beiden Systemen akkurate Resultate ergaben. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Versuche als Multiplexversuche durchgeführt.

4.4.2 Kontinuitätsmessung der ausgewählten Patientenproben

Ziel dieses Versuches war es, die Veränderungen der Resultate über Zeit festzustellen und ob die Methode stabile Resultate liefert.

Zunächst wurde Patient 4621 ausgewählt, um Veränderungen bei nicht alterierter Methode des Multiplex- Assays über einen gewissen Zeitraum zu testen. Dazu wurde der Patient im Multiplex- Assay nach entwickelter Methode in Verdünnung 1 zu 200 über fünf

Wochen lang gemessen. In Woche drei wurde eine neue Arbeitslösung hergestellt, welche den abfallenden Fluoreszenzwert wieder verbessert hat. Dargestellt wurden zwei der acht gemessenen Antigene. Sie verhielten sich in der Messung ähnlich wie die gewählten Beispiele.

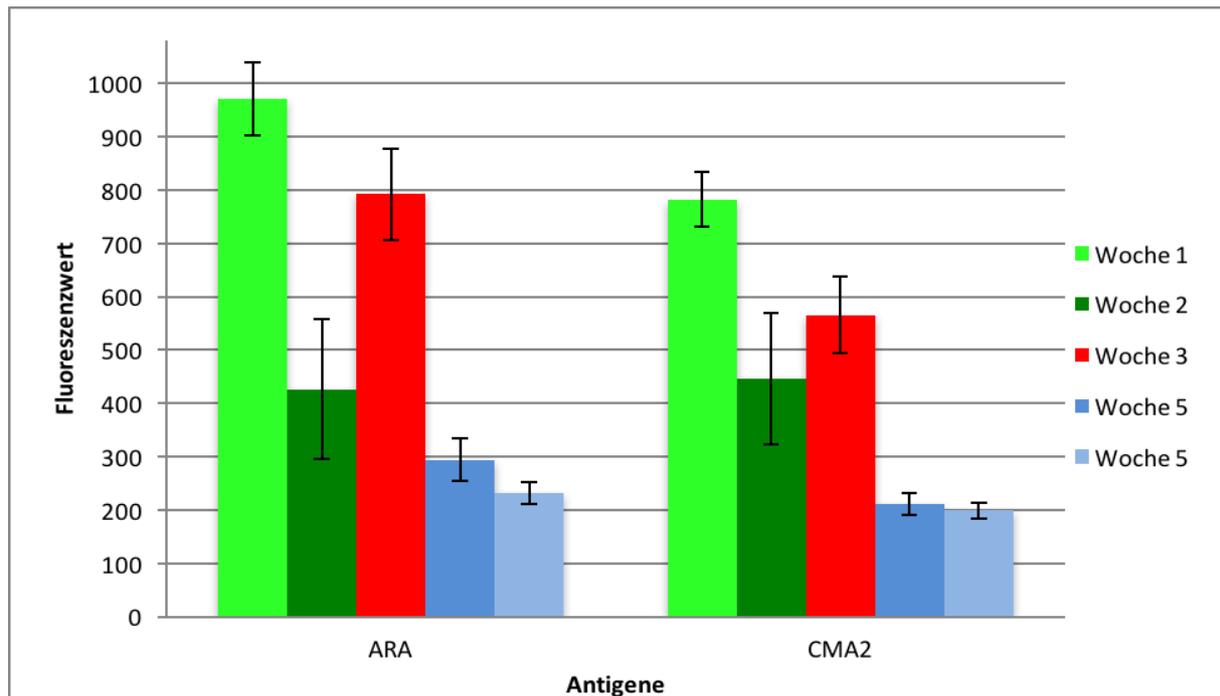


Abbildung 16: Messung Multiplex-Assay über die Zeit

Anmerkung. Hier wurde die Abnahme der Fluoreszenzwerte über den Zeitraum von fünf Wochen dargestellt. In Woche drei wurde eine neue Arbeitslösung hergestellt, wodurch sich die Verbesserung der Werte erklären lässt. Wenn die Messungen innerhalb einer Woche geschehen, sind die Ergebniswerte relativ stabil.

Diese Messung hat gezeigt, dass man eine Arbeitslösung maximal für eine Woche benutzen kann. Dieses sieht man auch an den Standardabweichungen in der Abbildung 16, die an den Tagen der frisch hergestellten Arbeitslösung (Woche 1, 3, 5) eine geringere Schwankungsbreite der Werte hat. Innerhalb einer Woche waren die Messungen relativ konstant (Woche 5). Und auch die gekoppelten Beads, die sehr lichtempfindlich sind, nehmen in ihrer Fluoreszenzstärke bei über Wochen lange Benutzung ab. Als Resultat wurden die gekoppelten Beads nicht länger als einen Monat lang verwendet.

4.4.3 Messung der ausgewählten Patientenseren im Multiplex (Acht Antigene)

Nachdem festgelegt war, dass die Arbeitslösung maximal eine Woche lang stabil ist, wurde untersucht, wie reproduzierbar die Versuchsergebnisse innerhalb dieser Zeit sind (Messtag 1-4). Dazu wurden die Seren an vier verschiedenen Tagen in Doppelbestimmung gemessen und die Ergebnisse verglichen. Exemplarisch werden hier Patienten 4593 mit negativer Immunfluoreszenz (siehe 3.1; Fa. Euroimmun) und 4680 auffälliger Fluoreszenz (siehe 3.1) aufgeführt.

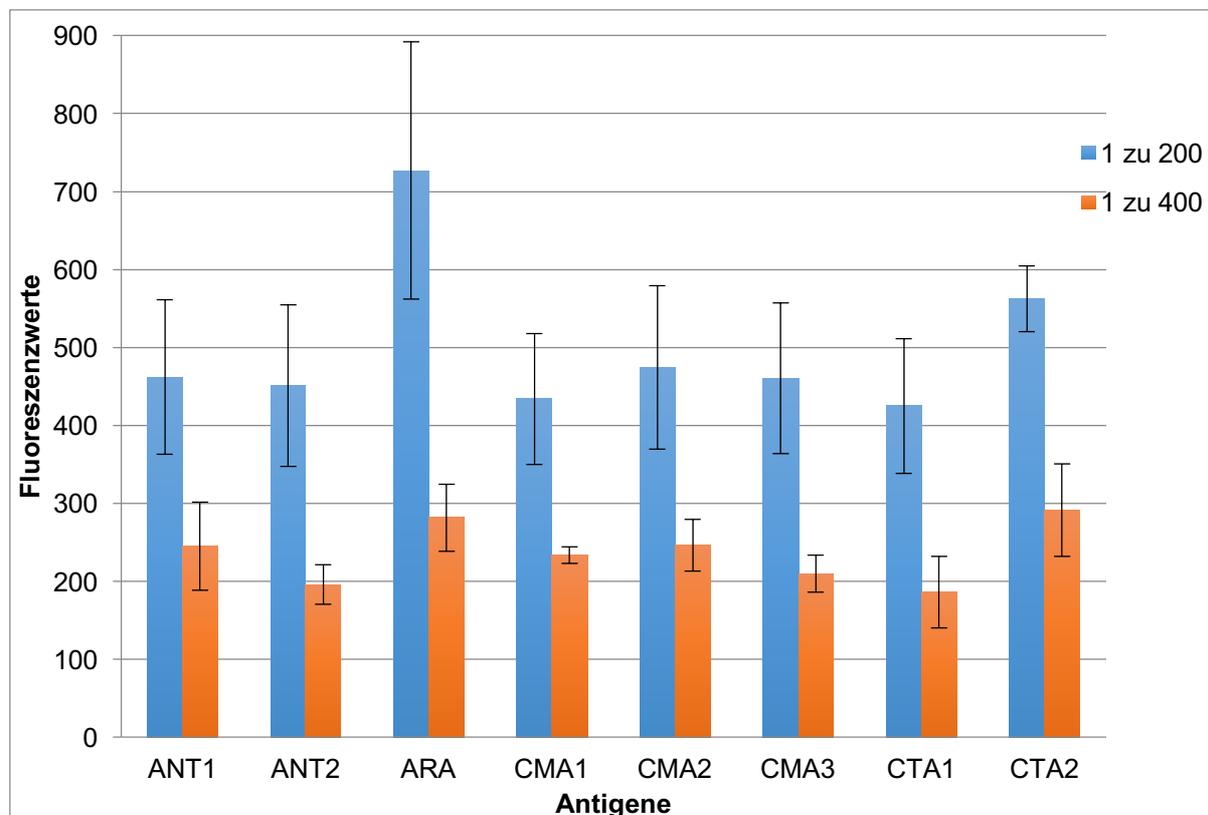


Abbildung 17: Durchschnittswerte des Patienten 4593 im Multiplex-ELISA mit acht Autoantikörpern

Anmerkung. Darstellung der Messdaten über vier verschiedene Messtage vom Patienten 4593 (negative Immunfluoreszenz). In dieser Abbildung wurden zur besseren Übersicht die Werte der unterschiedlichen Tage zu einer Säule beim jeweiligen Antigen zusammengefasst. Angezeigt ist auch die Standardabweichung.

Zu sehen war bei allen Antigenen eine Standardabweichung von 20 bzw. 16 % (Mittelwert gerundet). Je höher die Fluoreszenzwerte waren, desto höher war die Abweichung. Zur

besseren Vergleichbarkeit wurden die Standardabweichungen daher prozentual dargestellt.

Tabelle 15: Standardabweichung Messergebnisse (Pat 4593)

/ln %	ANT1	ANT2	ARA	CMA1	CMA2	CMA3	CTA1	CTA2	MW
1 zu 200	21,37	22,98	22,71	19,27	22,09	20,98	20,27	7,48	19,64
1 zu 400	22,98	12,99	15,33	4,57	13,42	11,14	24,54	20,38	15,66

Die Standardabweichungen zwischen den Verschiedenen Messtagen bei Patient 4593 in %. In der letzten Spalte ist der Mittelwert angegeben (MW)

Trotz exakter Beibehaltung und Ausführung der Methode sowie aller Erkenntnisse der Vorversuche, gelang es nicht, über die kurze Zeit signifikant konstante Fluoreszenzwerte und damit Ergebnisse zu produzieren. Die Interassay-Standardabweichungen lagen bis auf wenige Ausnahmen bei diesem Patienten deutlich über einem signifikanten Ergebnis. Dennoch war ein Trend zu sehen, da bei dem ARA-Antigen die Fluoreszenzwerte deutlich über denen der übrigen Parameter lagen.

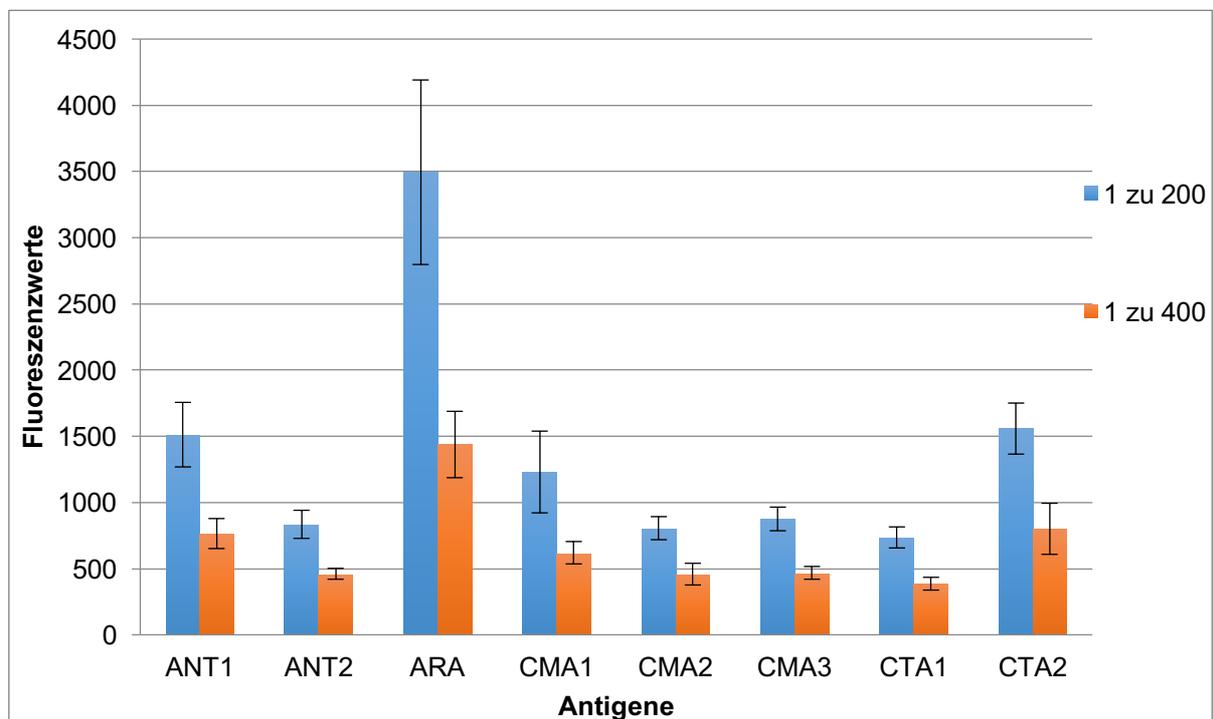


Abbildung 18: Durchschnittswerte des Patienten 4680 im Multiplex-ELISA mit acht Autoantikörpern

Anmerkung. Darstellung der Messdaten über vier verschiedene Messtage (jeweils vier Mal 1 zu 200 und vier Mal 1 zu 400) vom Patienten 4680 (positive Immunfluoreszenz). Zu sehen war in allen vier Messungen ein Trend, wobei der Patient die stärkste Reaktion bei den Antigenen ARA und CTA2 zeigt.

Zu sehen war bei allen Antigenen eine Standardabweichung von knapp 15 % (Mittelwert gerundet). Je höher die Fluoreszenzwerte waren, desto höher war die Abweichung. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Standardabweichungen daher prozentual dargestellt.

Tabelle 16: Standardabweichung Messergebnisse (Pat 4680)

In %	ANT1	ANT2	ARA	CMA1	CMA2	CMA3	CTA1	CTA2	MW
1zu 200	16,14	12,41	19,93	25,06	10,78	10,01	10,83	12,47	14,70
1zu 400	14,79	9,06	17,34	13,76	17,97	10,09	12,61	24,23	14,98

Anmerkung. Die Standardabweichungen zwischen den verschiedenen Messtagen bei Patient 4680 in %. In der letzten Spalte ist der Mittelwert angegeben (MW).

Bei den Messungen des Patienten 4680 konnte ein deutlicher Trend festgestellt werden. Die Fluoreszenzwerte in der Reaktion waren um mehr als das Doppelte erhöht, was als deutlich positive Reaktion gewertet wurde. Bei diesem Patienten war die Standardabweichung der Werte nicht so hoch wie bei dem vorangegangenen Beispiel. Jedoch auch hier gab es keine konstant signifikanten Ergebnisse. Durchschnittlich waren die Werte bei diesem Patienten deutlich höher, was als ein allgemein hochtitriges (aktiviertes) Serum hindeutet. Diese Probe wurde als positive Probe gewertet, da sie aufgrund der erhöhten Werte eine geringere Standardabweichung hat. In der zu Anfang durchgeführten Versuchsreihe mit dem Nachweis der Autoantikörper auf Affenherzmuskel (Fa. Euroimmun) zeigte das Serum des Patienten 4680 sich neben dem deutlichen Nachweis auf Antikörper gegen Glanzstreifen ebenfalls nun hohe Antikörpertiter gegen beta1-adrenergen Rezeptor (3500 Fluoreszenzeinheiten) und kardiales Myosin (1550 Fluoreszenzeinheiten) im Multiplexverfahren. Bei Serum 4593 und 4632 waren wie auch bei den negativen Humanseren eher geringe Antikörpernachweise. Anhand der Vorversuchsseren konnte gezeigt werden, dass die Methode von Bio-Plex (Single-/Multiplex) eine deutlich geringere Nachweisgrenze für Antikörperaktivität im Vergleich zur Euroimmunmethode besitzt (siehe 3.1).

4.5 Diagnostische Anwendung in Multiplex-ELISA

Um eine Vergleichsmöglichkeit zu dem einzigen zu dem Zeitpunkt der Arbeit kommerzielle erhältlichen ELISA-Kit zu haben, sollten nun die 78 Patienten mit dem Multiplex-ELISA gemessen werden.

Zunächst wurde die Standardabweichung für die gesamte Gruppe der 78 Patientenserum (sh. Methoden) wie folgt berechnet: Nach den statistischen Berechnungen mittels Shapiro-Wilk und D'Agostino-Pearson sind die Patientendaten der Gesamtgruppe (n=78) nicht normal verteilt. Somit wurden die Korrelationsanalysen mittels des Spearman - Korrelationskoeffizienten und für die Gruppenvergleiche mittels Kruskal-Wallis-Test mit einer Dunns Posthoc- Analyse berechnet. Die Gesamtergebnisse wurden als Korrelationen dargestellt.

In der folgenden Abbildung ist die Korrelation innerhalb der Multiplexmessung dargestellt. Im Gegensatz zu den vorherigen Messungen, werden die Intramessungen beim selben Patienten verglichen (1 zu 200 und 1 zu 400).

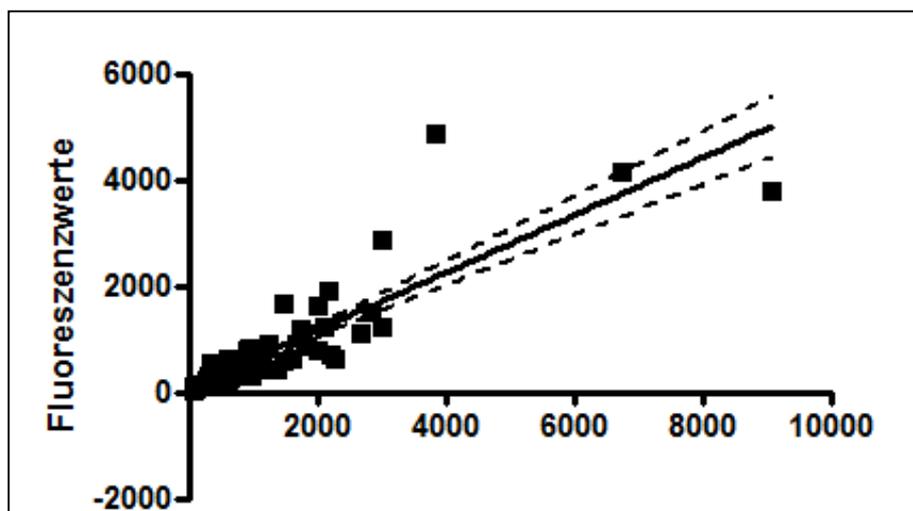


Abbildung 19: Korrelation ARA (Verdünnungen 1 zu 200 u. 1 zu 400)

Anmerkung. Korrelation eigener Ergebnisse mit den Verdünnungen 1 zu 200 (ARA, X-Achse) mit eigenen Ergebnissen 1 zu 400 (ARA, Y-Achse), X-Achse und Y-Achse Fluoreszenzeinheit Bio-Plex.

In dem Korrelationskoeffizienten von 0,8331 (95% Konfidenzintervall 0,7480-0,8913) nach Spearman zeigte sich in den Korrelationsmessungen eine hohe Signifikanz von $P < 0.0001$. Dieses zeigt, dass die Messergebnisse innerhalb der Verdünnungsreihen sehr

gut korrelieren und serielle Verdünnungen der Patienten Seren anwendbar sind. Aufgrund der besseren Darstellbarkeit und der verbesserten Nachweisbarkeit von Autoantikörpern bei der geringeren Verdünnung wurden hier ausschließlich Ergebnisse der Verdünnung 1 zu 200 genutzt. Aufgrund des äquivalent dynamischen Verhaltens der Verdünnung 1 zu 400 wurde diese nicht zur weiteren Berechnung genutzt.

Zunächst musste ein Level festgelegt werden, ab welchem ein Humanserum als positiv auf Autoantikörper gewertet werden konnte. Hierzu wurden zunächst die Daten der Kontrollgruppen gemessen. Die klin. Gruppen wurden in folgenden Statistiken verglichen.

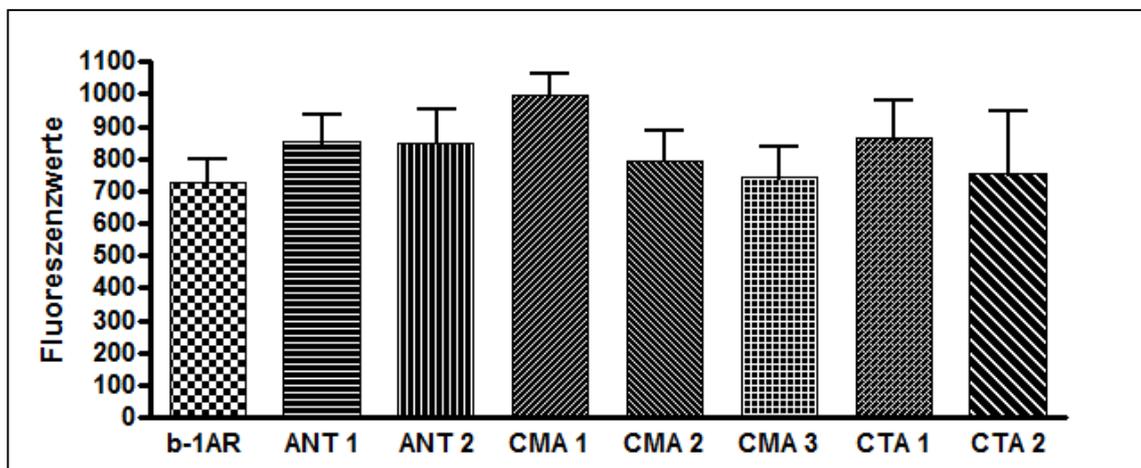


Abbildung 20: Kontrollen Gesamtübersicht mit SD

Anmerkung. Fluoreszenzwerte mit Standardabweichung der Kontrollgruppe für die acht gemessenen kardialen Autoantikörper. X-Achse unterschiedliche Autoantikörper mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe, Y-Achse: Fluoreszenzeinheit Bio-Plex

Die Ergebnisse sind im Folgenden tabellarisch dargestellt.

Tabelle 17: Median und Standardabweichung der Kontrollgruppe

	Cell-Trend	ARA	ANT1	ANT2	CMA1	CMA2	CMA3	CTA1	CTA 2	SD in %
Median	10,88	638,63	793,25	846,75	1035,5	786,88	718,38	845	588,5	16,41
SD	3,96	54,25	111,63	150	83,25	164,13	170,88	204,88	166,5	30,15
SD %	36,4	8,5	14,1	17,7	8,0	22,8	23,8	24,0	28,53	17,8

Anmerkung. In der nachfolgenden Tabelle ist der Median der einzelnen Kontrollgruppewerte dargestellt. Die Standardabweichung berechnet sich aus der Abweichung der einzelnen Messungen zum Median der Gesamtgruppe. Die Werte sind in Fluoreszenzeinheiten des Multiplex-Assays (Fa. BioPlex) angegeben.

Es zeigt sich bei der Kontrollgruppe eine vergleichbare Fluoreszenzaktivität der verschiedenen Autoantikörper. Die Standardabweichung ist im Mittel 17 % und liegt zwischen 8 und 36 Prozent. Die Ergebnisse zeigen bei der klinisch gesunden Kontrollgruppe bei der Standardabweichung eine relative Konstanz. In den statistischen Verfahren zeigten sich keinerlei jedoch Signifikanzen in der Korrelation der einzelnen Gruppen.

4.5.1 Messung Patientendaten

Einteilung der Untersuchungsgruppen.

Die 78 Humanseren wurden bereits vor Testung nach klinischen Kriterien und mittels histologischer und PCR - Diagnostik in verschiedene Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 18). Die detaillierten klinischen Angaben sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Diese Gruppen wurden mit den Ergebnissen der einzelnen Antikörper im Multiplex verglichen. Als Korrelationsmethode wurde das statistische Verfahren Kruskal-Wallis gewählt. Es zeigten sich die folgenden Korrelationen zu den klinischen Diagnosen.

Tabelle 18: Klinische und PCR-Diagnosen der vier Untersuchungsgruppen

Name	Kohorte
Kontrollen	Gesunde Patienten, ohne klinische u. myokard-bioptische Anzeichen einer Herzmuskelerkrankung
DCM	Pat. mit dilatativer Kardiomyopathie (virusfrei, ohne Entzündung (EF>50%))
Virus	Klinisch kranke Pat, mit bioptisch positivem Virusnachweis
MCA	Akute Myokarditis (myokardbioptisch mit Entzündung)

Die Patienten sind in oben genannte klinische Gruppen aufgeteilt. Errechnet sind die Durchschnittswerte der Ergebnisse und deren Standardabweichungen. Für jede Gruppe wurde der Median bestimmt. Alle Ergebnisse, die über dem Median der Kontrollgruppe und der dreifachen Standardabweichung lagen, wurden als positiv gewertet. Es wurde lediglich die Verdünnung 1 zu 200 gewählt.

Die in gesamten Ergebnisse wurden in weiteren Berechnungen miteinander korreliert. Statistisch signifikante Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen aufgeführt.

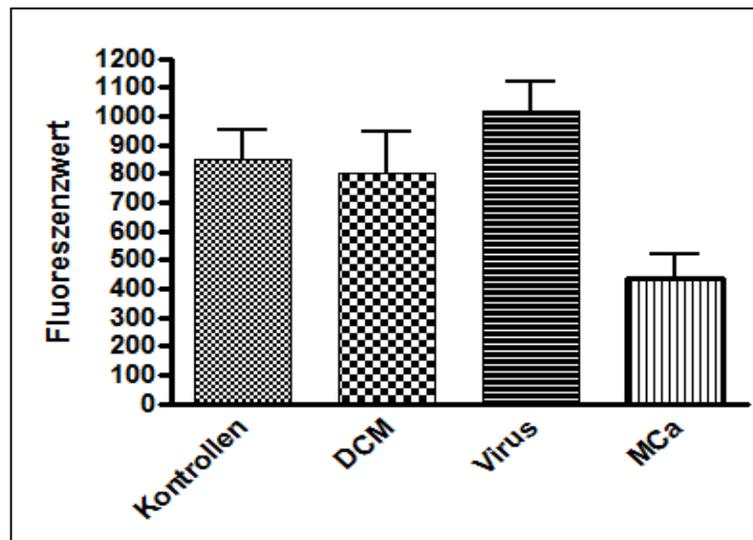


Abbildung 21: Messwerte von Autoantikörpern gegen ANT 2 bei Verdünnung 1 zu 200

Anmerkung. Aufgeführt sind hier die klinischen Gruppen mit den durchschnittlichen Fluoreszenzwerten (incl. Standardabweichung). Der gezeigte Autoantikörper ist ANT2 mit der Verdünnungsstufe von 1 zu 200 (Patientenseren)

Bei Patienten mit akuter Myokarditis war die Autoantikörperkonzentration gegen ANT2 signifikant niedriger als bei den Virusgruppen. Hier ergab sich eine statistische Signifikanz: Kruskal-Wallis-Test: P-Wert = 0,0236

Ähnliche Beobachtungen kann man bei den Autoantikörpern CMA 3 und CTA 1 machen. Bei akuter Myokarditis war ebenso die Autoantikörperkonzentration gegen CTA1 signifikant niedriger als bei den Kontroll- bzw. Virusgruppe. Dieses zeigt auch hier, dass die Autoantikörper im akuten Stadium der Myokarditis erniedrigt sind. Hier resultierte sich statistisch ein signifikantes Ergebnis (p Wert 0,0129, Kruskal-Wallis-Test).

Bei CMA3 ergab sich ein knapp signifikantes Ergebnis (p Wert 0,0618, Kruskal-Wallis-Test). Die übrigen Autoantikörper korrelierten nicht signifikant zu den beiden Vergleichsgruppen (siehe Tabelle 19). Ebenso in der stärkeren Verdünnungsstufe von 1 zu 400 ergaben sich keine statistischen Signifikanzen.

Tabelle 19: p-Werte des Kruskal-Wallis-Testes für die Autoantikörper- Konzentrationen

	Cell-Trend	ARA	ANT1	ANT2	CMA1	CMA2	CMA3	CTA1	CTA2
p-Wert	0,676	0,920	0,728	0,024	0,061	0,083	0,052	0,013	0,991
Signifikanz bei	-	-	-	MCa	-MCa	DCM	MCa	MCa	-

Anmerkung. In der Tabelle sind die Ergebnisse der p-Werte nach Korrelation der vier klinischen Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse. Es wurden jeweils ein Overall p-Wert bestimmt und die Signifikanzen der einzelnen Gruppen dargestellt. In der unteren Zeile ist der signifikante Wert dargestellt (Gruppesignifikant im Vergleich zu den restlichen Gruppen).

In der CMA 2 - Gruppe zeigte sich jedoch ein anderer Trend. Das Ergebnis im Kruskal-Wallis-Test ist mit einem P - Wert von 0,0829 nicht signifikant, aber im Trend höher bei der DCM Gruppe. Dieser Antikörper verhält sich aber umgekehrt zu den vorher genannten Ergebnissen.

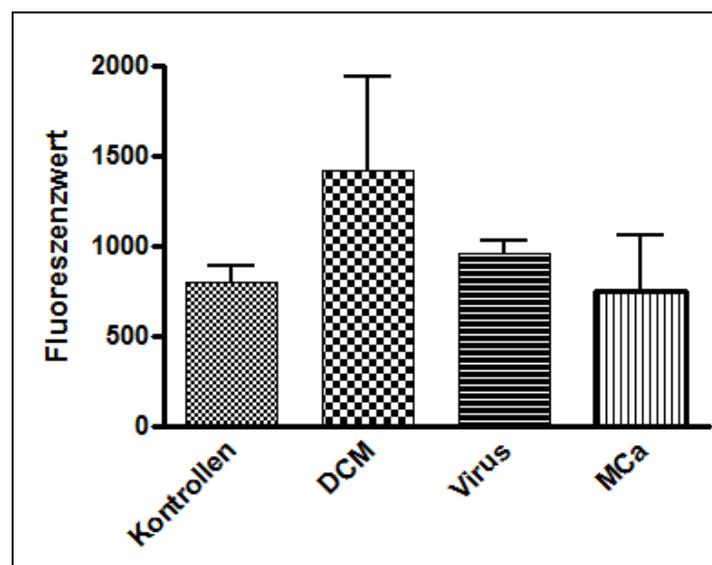


Abbildung 22: CMA 2, Verdünnung 1 zu 200

Anmerkung. Aufgeführt sind hier die klinischen Gruppen mit den durchschnittlichen Fluoreszenzwerten (incl. Standardabweichung). Der gezeigte Autoantikörper ist CMA2 mit der Verdünnungsstufe der Patientenseren von 1 zu 200.

Es zeigt sich ein deutlich erhöhtes Ergebnis bei der Korrelation in der Gruppe der DCM im Gegensatz zur Kontroll- und Virus - Gruppe. Dies kann auf einen erhöhten Autoantikörper - Titer in der DCM - Gruppe hinweisen. In der Zusammenschau konnte gezeigt

werden, dass in drei von acht getesteten Autoantikörpern die klinische Gruppe „akute Myokarditis“ signifikante erniedrigte Fluoreszenztiter aufweist. Dies konnte bei drei der acht Autoantikörper gezeigt werden, bei CMA1 ergab sich mit 0,061 ein fast signifikantes Ergebnis. In der Messung mit CMA2 konnte als einziger Autoantikörper ein deutlicher anderer Trend gezeigt werden, der eine erhöhte Autoantikörper Konzentration in der DCM-Gruppe im Vergleich zu Kontroll- und Virus-Gruppe zeigen konnte. Dieses Ergebnis war jedoch statistisch knapp nicht signifikant.

Festlegung eines Schwellwertes für die diagnostische Anwendung

Da in den Vorversuchen kein einheitlicher Schwellwert festgelegt werden konnte, ab welchem Messwerte die Patientenserum als positiv gewertet werden konnte, wurde eine individuelle Herangehensweise an die jeweiligen Versuchsreihen gewählt. In der Methode Multiplex wurde der Median der Kontrollgruppe des jeweiligen Versuchsdurchganges für die zwei verschiedenen Verdünnungen von 1 zu 200 und 1 zu 400 bestimmt. Zusätzlich wurde die Standardabweichung der Kontrollgruppe bestimmt. Alle Ergebnisse, die über dem Median und der dreifachen Standardabweichung der Kontrollgruppe lagen, wurden als positiv gewertet. Die prozentualen Anteile der positiven Patienten in den klinischen Gruppen sind in Tabelle 20 dargestellt. In der Gesamtübersicht der einzelnen Gruppen im Multiplex-ELISA ergaben sich unten genannte Ergebnisse. Alle Ergebnisse, die über dem Median der jeweiligen Kontrollgruppe und der dreifachen Standardabweichung lagen, wurden als positiv gewertet. Die Ergebnisse der 1 zu 400 Verdünnung wurden nicht weiter aufgezeigt.

Nach Festlegung des Schwellwertes konnten die vorherigen errechneten signifikanten Ergebnisse genauer beleuchtet werden. Bei den zunächst durchgeführten Berechnungen mittels Kruskal-Wallis-Test wurden alle gemessenen Seren mit einbezogen. Bei CTA1 ergab sich dabei in der Berechnung im Vergleich zu anderen Gruppen mit einem p-Wert von 0,0129 ein deutlich signifikantes Ergebnis mit einer erniedrigten Autoantikörperkonzentration in der Gruppe MCA. Dies liegt wie im Punktdiagramm (Abbildung 24) gezeigt werden konnte an den niedrigen Einzelkonzentrationen der neun Humanseren.

Im Folgenden ist exemplarisch die Verteilung der einzelnen Humanseren als Fluoreszenzwerte beim CTA 1- Autoantikörper dargestellt.

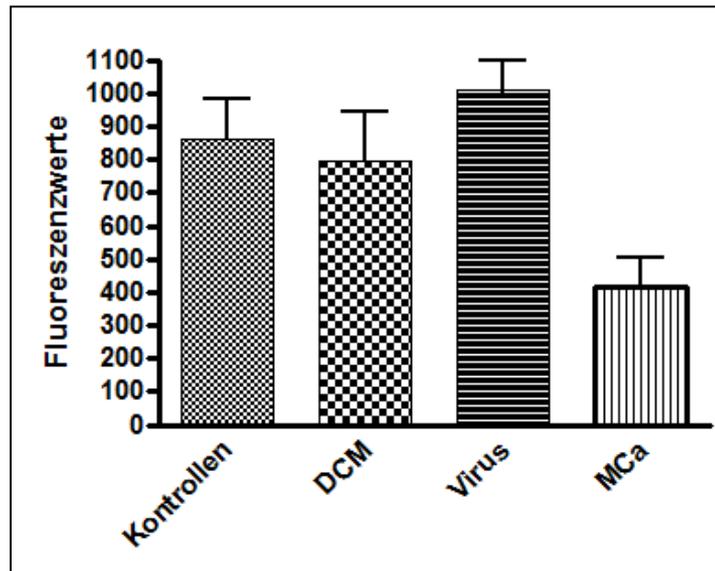


Abbildung 23: CTA1, Verdünnung 1 zu 200

Anmerkung. Es zeigt sich in der Gesamtübersicht über die 4 Gruppen eine signifikant geringere Konzentration des Fluoreszenztiters

Im folgenden Punktdiagramm (Abb. 24) ist der Schwellwert exemplarisch eingezeichnet. Hier sind die teilweise deutlich erhöhten Titer zu erkennen, die deutlich erhöhte autoimmune Antikörperkonzentration zeigen.

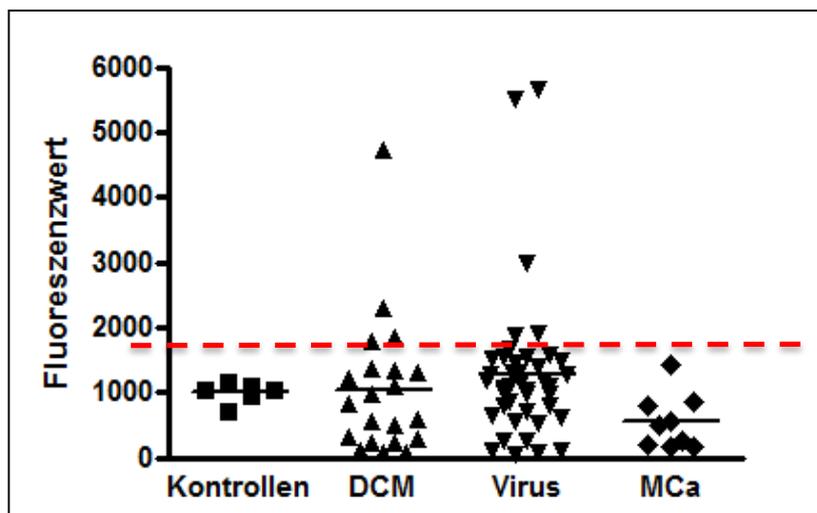


Abbildung 24: CTA1, Verdünnung 1 zu 200 mit Schwellwert

Anmerkung. Der für CTA 1 bestimmte Schwellwert (cut off) (im Beispiel 1459). Deutlich zu erkennen sind die einzelnen hochtitrigen Humansenen. Die Verdünnung des Serums beträgt 1 zu 200. Die gestrichelte Linie zeigt den Schwellwert.

Die zuvor mit einbezogenen Patienten der MCa- Gruppe, haben bei dem Autoantikörper CTA1 nach festgelegtem Schwellwert keinen positiven Antikörperbefund. Im Balkendiagramm sind nur positive Werte dargestellt. (Abb. 25)

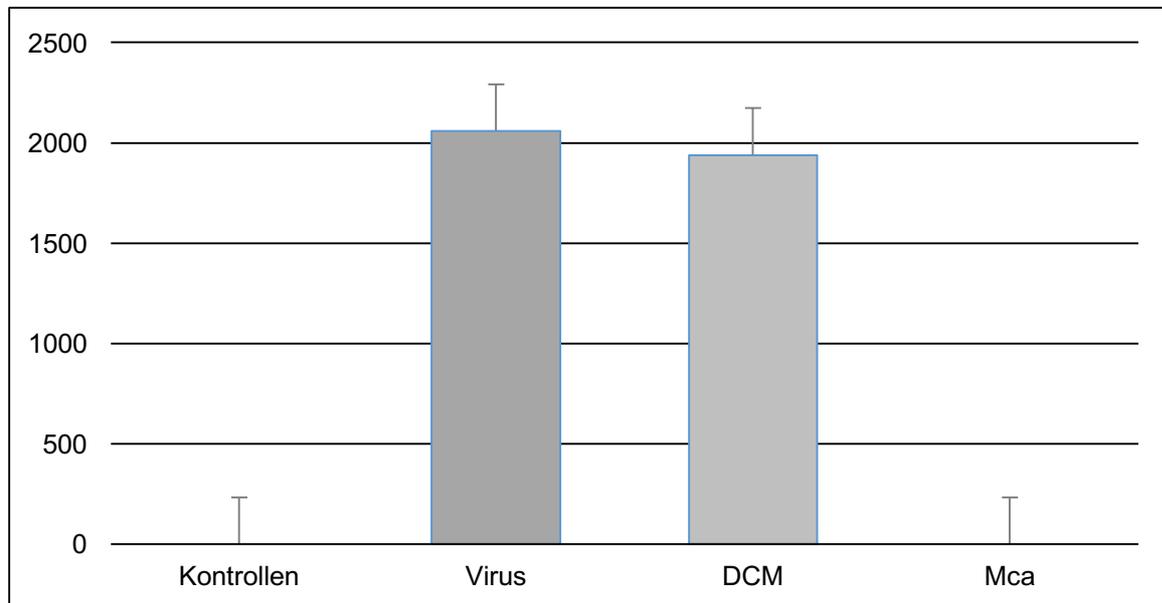


Abbildung 25: CTA1, 1 zu 200 nur positive Werte

Anmerkung. Darstellung der vier Gruppen mit den nach Schwellwert bestimmten positiven (positive Autoantikörper) Patienten. Kontrollen und MCa beinhalten keinen positiven Patienten in diesem Beispiel.

Wie in dem Beispiel zu sehen ist, ist nach dem Festlegen des Schwellwertes kein positiver Patient in der Gruppe MCa und in den Kontrollen zu finden.

Die prozentualen Anteile der positiven Patienten der klinischen Gruppen sind in Tabelle 20 dargestellt. Für die Fallzahlanalyse wurde zur Berechnung Fischer's exact -Test bzw. Chi-Square genutzt.

Tabelle 20: Positive Autoantikörper in Prozent für die vier Untersuchungsgruppen

	β- adre- nerg /ARA)	ANT 1	ANT 2	CMA 1	CMA 2	CMA 3	CTA 1	CTA 2
<i>Festgelegter Level (*)</i>	801,525	1128,05	1296,75	1285,4	1279,25	1231	1459,625	1088
Kontrollen (n=6)	0	0	0	0	0	0	0	0
MCA (n=10)	33(3)	33(3)	0	11(1)	11(1)	0	0	33(3)
DCM (n=21)	48(10)	43(9)	19(4)	33(7)	24(5)	14(3)	19(4)	38(8)
Virus (n=42)	49(20)	39(16)	19(8)	36(15)	17(7)	20(8)	12(5)	19(8)
Gesamtanzahl	33	28	12	23	13	11	9	19
p-Wert <u>GE- SAMT</u>	<u>0,143</u>	<u>0,271</u>	<u>0,337</u>	<u>0,179</u>	<u>0,538</u>	<u>0,346</u>	<u>0,373</u>	<u>0,163</u>
p-Wert MCA	0,2286	0,2286	1	1	1	1	0,2268	1
p-Wert DCM	0,057	0,0707	0,5453	0,1548	0,5572	1	0,1358	0,5453
p-Wert Virus	0, 0339	0,1595	0,571	0,1575	0,5725	0,571	0,571	0,577

Anmerkung. Positive Autoantikörper in Prozent für die vier Untersuchungsgruppen. *(Median Kontrollgruppe + 3 x Standardabweichung, in Bio-Plex Fluoreszenzeinheit angegeben) In Klammern: Anzahl der positiven Serumproben. Der p-Wert ist aus allen Gruppen berechnet worden. Hier dargestellt ist der gesamt p-Wert (Signifikanz) für jeden Autoantikörper (Wahrscheinlichkeit ein positives Ergebnis bei genanntem AK zu haben). Zusätzlich sind die p-Werte der einzelnen Gruppen (Berechnung gegen die Kontrollgruppe) aufgezeigt.

Bei ARA, ANT1, CMA1 und CTA2 waren die Anteile der als positiv auf Autoantikörper gewerteten Serumproben mit jeweils 48, 43, 33 und 38 % in der DCM Gruppe am höchsten. Aber auch in den Gruppen akute Myokarditis und Virus („klinisch kranke Patienten, weder DCM noch MCA aber mit Virusnachweis“) ergaben sich teilweise erhöhte Fluoreszenztiter in den Patientenserum. Die Gruppe Virus und DCM hatten prozentual ähnlich hohe Anteile.

4.5.2 Aufspaltung der Virusgruppe

Zur Frage der Autoantikörperbildung bei unterschiedlichen Virusinfektionen wurden die vier unterschiedlichen Virustypen den Autoantikörperkonzentrationen zugeordnet und statistisch ausgewertet. In diesem Zusammenhang war die größte Gruppe mit Coxsackievirusnachweis von besonderem Interesse, da in der Literatur insbesondere besonders bei myokardialen Coxsackievirus – Infektionen ein Zusammenhang zu Autoantikörpern beschrieben ist. Diese sind in Tabelle 21 dargestellt. Bei der Gruppe ADV und PVB19 zeigten sich keinerlei signifikante p-Werte in Korrelationen (keine Abb.). Von der Gruppe der coxsackieviruspositiven Patienten, wurde sowohl das Serum zur Erstbiopsie (Cox A) und das Serum zur Nachfolgebiopsie (Cox B) gemessen. Anhand dieser Messwerte sollte geprüft werden, ob eine primäre Virusinfektion die Bildung von Autoantikörpern induzieren kann.

Tabelle 21: Messwerte Autoantikörper von coxsackiepositiven Patienten zur 1. Biopsie (Cox A) und Nachfolgebiopsie (Cox B)

	Durchschnitt COX (SD COX)	Durchschnitt Positive (SD pos. COX)	Anzahl pos. Pat. (= Anteil in %)
CellTrend COX A (β1-Adre. Rz AK)	14,19 (8,24)	28,10 (7,35)	4 (23)
CellTrend COX B (β1-Adre. Rz AK)	12,42 (4,84)	20,27 (3,31)	3 (20)
ARA nur COX A	1389,87 (1498,24)	1883,73 (1705,89)	11 (64)
ARA nur COX B	1683,47 (2231,98)	3446,42 (2687,01)	6 (40)
ANT1 nur COX A	1282,59 (930,31)	1950,31 (928,06)	8 (47)
ANT1 nur COX B	1475,40 (1194,83)	2570,96 (1152,28)	6 (40)
ANT2 nur COX A	1111,66 (605,68)	1830,19 (697,78)	4 (23)
ANT2 nur COX B	1123,92 (766,57)	2265,83 (882,48)	3 (20)

Diagnostische Anwendung in Multiplex-ELISA

CMA1 nur COX A	1407,03 (1123,55)	2250,00 (1471,58)	6 (35)
CMA1 nur COX B	1480,73 (1305,06)	2329,36 (1464,58)	7 (46)
CMA2 nur COX A	1108,81 (393,65)	1529,50 (224,78)	5 (29)
CMA2 nur COX B	966,05 (444,37)	1763,50 (466,75)	2 (13)
CMA3 nur COX A	1050,24 (623,61)	1806,19 (776,78)	4 (23)
CMA3 nur COX B	1077,05 (859,11)	2396,17 (1047,80)	3 (20)
CTA1 nur COX A	1119,62 (557,26)	2208,00 (555,5)	2 (11)
CTA1 nur COX B	1075,22 (639,45)	1960,75 (694,41)	3 (20)
CTA2 nur COX A	901,40 (717,09)	1865,00 (893,39)	4 (23)
CTA2 nur COX B	1065,03 (1014,62)	3033,92 (334,11)	3 (20)

Anmerkung. In dieser Tabelle sind die Mittelwerte der einzelnen COX (A und B) Gruppe aufgeführt. (1. Spalte). In der 2. Spalte sind die Patienten dargestellt, die nach dem Schwellenwert als positiv gewertet worden sind, mit deren Mittelwert und Anzahl (3. Spalte). Die Gruppe COX A beinhaltet n=17 Patienten, die Gruppe B n=15 Patienten. Zuletzt ist die Standardabweichung der Gesamtgruppe COX (n=32) aufgeführt. Gezeigt sind die Ergebnisse vom Einzel-ELISA der Firma CellTrend und die Multiplex-ELISA Ergebnisse für alle 8 Autoantikörper des Multiplex-ELISA.

Wie in der Tabelle 21 zu sehen ist, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Mittelwerten der positiven Patienten im Vergleich zwischen den beiden Gruppen COX A und COX B. Graphisch dargestellt ergibt sich exemplarisch folgendes Bild für CTA2.

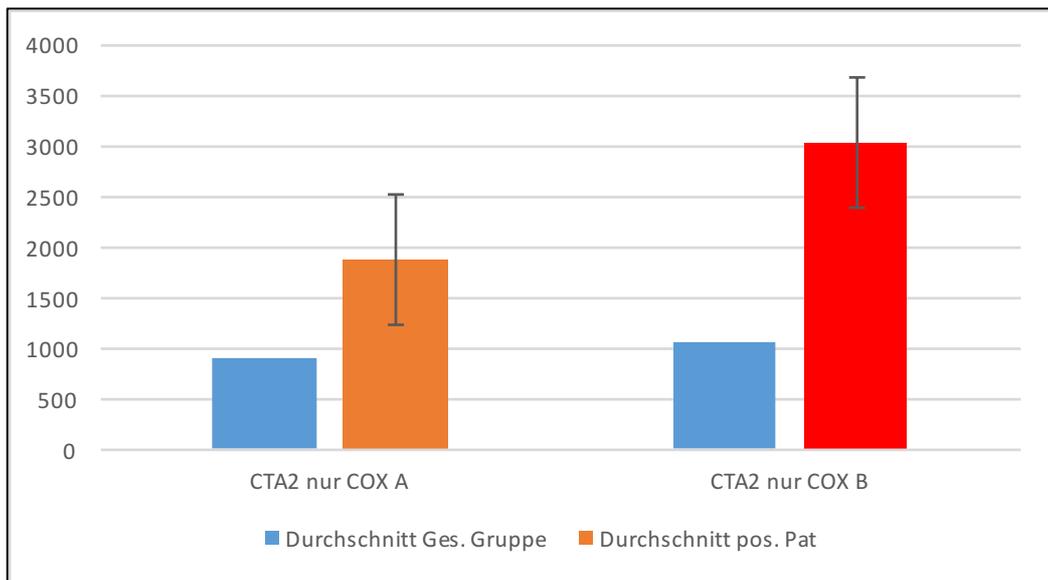


Abbildung 26: Darstellung COX A und B im Vergleich, CTA2

Anmerkung. In der Grafik dargestellt sind die beiden COX Gruppen Ergebnisse bei CTA2. In den ersten Balken (links in jeweiliger Gruppe) sind die Mittelwerte der gesamten Gruppe (COX A und B) aufgezeigt. Im 2. Balken (rechts) sind nur die jeweils positiven Patienten gezeigt.

Es zeigen sich bei den durchschnittlichen Werten der Gesamtgruppe vergleichbare Ergebnisse. Bei den positiven Patienten hingegen, zeigt sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen COX A und B. Die Gruppe B zeigt oft deutlich höhere Fluoreszenzwerte an mit jedoch auch hoher Standardabweichung.

Hierzu wurden weitere Korrelationsberechnungen durchgeführt. Diese (Abbildung 27) zeigte jedoch trotz der Differenz der Ergebnisse keine signifikanten Werte.

Es wurden im Weiteren die Gruppen Cox A und B graphisch in der Korrelation gegen die Gruppen Kontrolle, DCM und MCA dargestellt.

Die einzigen signifikanten Werte nach Korrelationen der Gruppen, zeigten sich, wie auch zuvor, bei der Berechnung der zunächst vier Gruppen (Abb. 22, 23), ANT2, CTA1. Bei dem Autoantikörper CMA3 konnte lediglich noch ein Trend gezeigt werden.

Im Folgenden ist exemplarisch CTA1 mit der Cox-Gruppen Aufspaltung dargestellt.

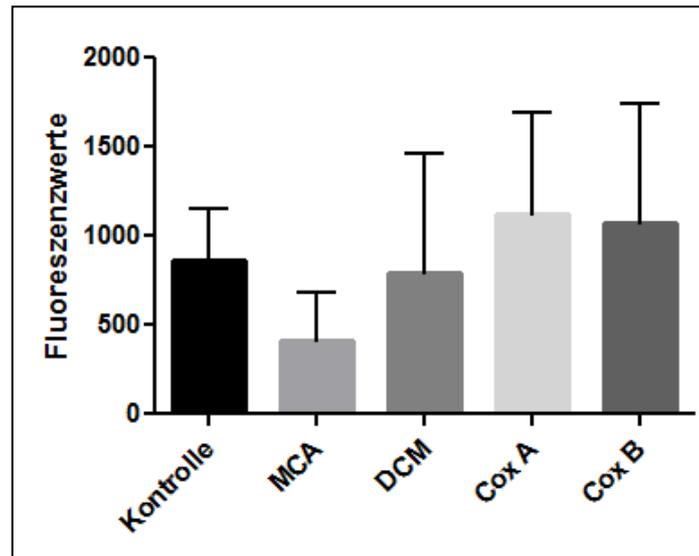


Abbildung 27: Vergleich der Gruppe Cox A und B mit DCM, MCA und Kontrollen (exemplarisch CTA1)

Anmerkung. In dieser Abbildung sieht man die Ergebnisse bei weiterer Aufteilung der Virusgruppe. Die Gruppe COX A und B. Diese zeigen höhere Fluoreszenzwerte als die restlichen Gruppen. Unterschiede zwischen ihnen sind klein.

Zu sehen sind die hohen Standardabweichungen und der erniedrigte Autoantikörperfluoreszenzwert MCA.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse dieser Korrelationen (5 Gruppen) aufgeführt. Es wurde ebenfalls die Gesamtgruppe COX (A + B zusammen) als eine Gruppe statistisch ausgewertet. Hier ergab sich erneut dasselbe Bild wie bereits zuvor bei der Gesamtvirusgruppe (Abb. 22 und 23). Auch bei der weiteren Aufspaltung in COX A und B zeigten sich die selben Trends wie zuvor in der Korrelation der vier Gruppen. Der Fluoreszenzwert von MCA, und somit die Autoantikörperkonzentration, ist weiterhin im Gegensatz zu den anderen Gruppen deutlich niedriger.

In der folgenden Tabelle sind die p-Werte der exemplarisch dargestellten Berechnung der Abbildung 27 gezeigt.

Tabelle 22: Vergleich der p-Werte 5 Gruppen gegen 4 Gruppen. bei weiterer Aufspaltung der Virus-Gruppe

	Cell-Trend	ARA	ANT1	ANT2	CMA1	CMA2	CMA3	CTA1	CTA2
P Wert (5 Gruppen)	0,351	0,483	0,706	0,063	0,237	0,737	0,140	0,039	0,932
p-Wert (4 Gruppen)	0,676	0,920	0,728	0,024	0,061	0,083	0,052	0,013	0,991
Vergl. Cox A/ B Gesamt	0,199	0,672	0,623	0,961	0,869	0,358	0,922	0,840	0,611
Vergl. COX A/B Positive	0,223	0,185	0,162	0,752	0,822	0,402	0,502	0,765	0,128

Anmerkung. In dieser Tabelle sind die errechneten P-Werte nach Aufspaltung der Virusgruppe in die Cox A- und B-Untergruppen. Der p-Wert (Gesamtberechnung) ergibt sich aus dem Vergleich der fünf Gruppen. In der 2. Spalte sind zum Vergleich die P Werte des 4-Gruppenvergleiches aufgezeigt. Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen den Gruppen COX A und B durchgeführt. In der Spalte 3 sind die p-Werte der gesamten Cox-Gruppe aufgeführt, in Spalte 4 die p-Werte der positiven Patienten der Cox-Gruppe (Cox A und B) dargestellt worden

Diese Daten zeigen, dass die Aufspaltung der Gruppen in COX A und B keine Signifikanzsteigerung oder starke Veränderung im Vergleich zu den Vorwerten zeigen. Weiterhin ist CTA1 signifikant (MCa niedriger) und ANT2 ist in dieser Aufspaltung sogar nur grenzwertig signifikant (MCa zeigt weiterhin niedrigere Fluoreszenzwerte). Der vorherig gezeigte Trend bei CMA3 ist nach der Differenzierung in die COX - Gruppen nicht mehr vorhanden.

Auch der Vergleich der beiden Coxsackievirus-Gesamtgruppen (Cox A und B) zeigt zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Auch in Betrachtung der rein positiven Coxsackie-Werte (p-Werte Tab. 21) zeigt sich hier nicht mehr als ein Trend in manchen Autoantikörper Messungen (z.B. CTA2, ANT1).

4.5.3 Vergleich der Ergebnisse mit kommerziellem ELISA

Um eine Vergleichsmöglichkeit mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode (Multiplex-ELISA) zu haben, wurden 78 Seren zum Nachweis von Antikörpern mit einer bereits existierenden Methode verglichen. Die Firma CellTrend hatte zu dem Zeitpunkt dieser Arbeit eine Nachweismöglichkeit für einen Autoantikörper, welcher für Kardiomyopathie als bedeutungsvoll beschrieben war: gegen den humanen beta1-adrenergen Rezeptor. Da in dieser Arbeit ebenfalls der beta1-adrenerge Rezeptor getestet wurde, wurden für diesen Parameter die Ergebnisse zwischen denen der Fa. CellTrend und den eigenen verglichen.

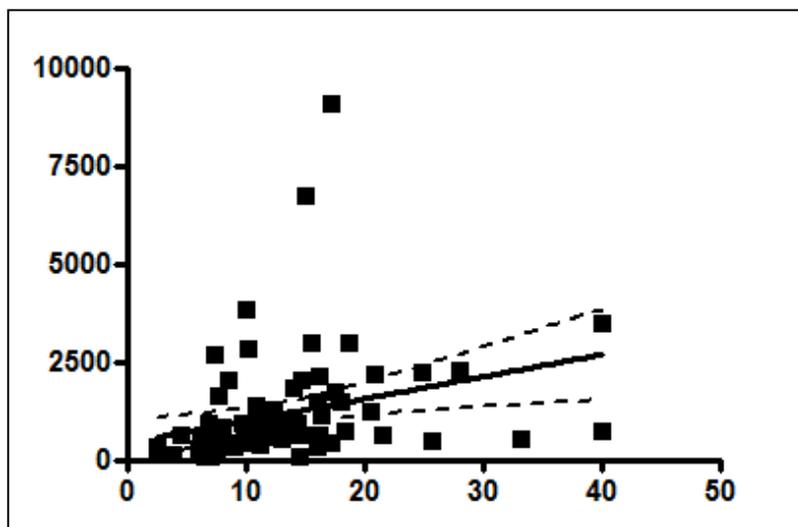


Abbildung 28: Korrelation β -1AR AK CellTrend zu Multiplex (Verd. 1 zu 200)

Anmerkung. Korrelation CellTrend β -adrenerger Rezeptor (β 1-AR) mit eigenen Ergebnissen 1 zu 200 (ARA) X-Achse Einheiten CellTrend, Y-Achse Fluoreszenzeinheit Multiplex. (p-Wert $P < 0.0001$)

Der Korrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte eine hohe Signifikanz mit einem P-Wert (two-tailed) von $P < 0.0001$. Es ergibt sich ein Korrelationskoeffizient $r = 0,5163$ mit einem 95% Konfidenzintervall (0.3285 bis 0.6647). Bis auf einige Ausnahmen bei sehr hohen Fluoreszenzwerten (sowohl Fa. CellTrend als auch im Multiplex), stimmen die Messergebnisse beider Methoden gut überein. Die Ergebnisse zwischen der Einzel-ELISA-Methode (Fa. CellTrend (β 1 AR)) und der Verdünnung 1 zu 400 (ARA) zeigte sich

ebenfalls eine signifikante Korrelation von $p = 0,0009$ (Spearman) (Abb. 29). In der Auswertung der Methode (Schwellwert) ergeben sich jedoch Differenzen bei den einzelnen positiven Patienten.

4.6 Klinische Korrelation Patientendaten CellTrend und Multiplex-ELISA

Bei unseren β_1 -adrenergen Autoantikörpermessungen mittels Multiplex-ELISA zeigten sich im Vergleich zur CellTrend-Methode deutlichere Unterschiede in den dargestellten Gruppen (s.o. Tab 21). Die Gruppe ARA hatte nach Berechnungen mittels Multiplex ELISA einen deutlich höheren Anteil an positiven Patienten z.B. in der COX B Gruppe 20% Einzel-ELISA, 40% Multiplex-ELISA) aber auch in den anderen gemessenen Gruppen. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse verglichen worden.

Tabelle 23: Vergleich der Anteil der positiven Patienten (Einzel-ELISA (Fa. Celltrend) gegen Multiplex-ELISA)

Gruppen	Anzahl positive Titer (Humanseren) EINZEL-ELISA	Anteil an der klinischen Gruppe EINZEL-ELISA	Anzahl positive Titer (Humanseren) MULTIPLEX-ELISA	Anteil an der klinischen Gruppe MULTIPLEX-ELISA
Kontrollen (ges. Patienten)	0	0 %	0	0 %
DCM	4	19 %	3	33 %
Virus	9	22 %	10	48 %
MCa	1	11 %	20	49 %
COX A	4	232	11	64 %
COX B	3	20 %	6	40 %

Anmerkung. In der Tabelle sind die Anzahl der positiven Patienten aufgeführt, mit deren prozentualen Anteil an der Gesamtgruppe. (Zeile 1, ges. = gesunde Patienten) Aufgeführt sind der β_1 -adrenerge Rezeptorautoantikörper des Einzel-ELISA (Fa. CellTrend) und der β_1 -adrenerge Rezeptorautoantikörper des Multiplex-ELISA. Es ist ein deutlich erhöhter Anteil an positiven Patienten in der Multiplexmessung zu sehen.

Im Folgenden ist das Ergebnis der vier Gruppen (Ergebnis des Einzel-ELISA der Fa. Euroimmun) graphisch dargestellt.

Die Virusgruppe hatte im Durchschnitt die höchsten Fluoreszenzwerte. In den statischen Verfahren zeigten sich jedoch keine Signifikanzen in der Korrelation sowohl bei den Ergebnissen des Einzel-ELISA (Fa. CellTrend). Auch bei den Ergebnissen des Multiplex ELISA zeigen sich keine signifikanten Ergebnisse (ARA, ähnliches Bild, daher nicht erneut dargestellt).

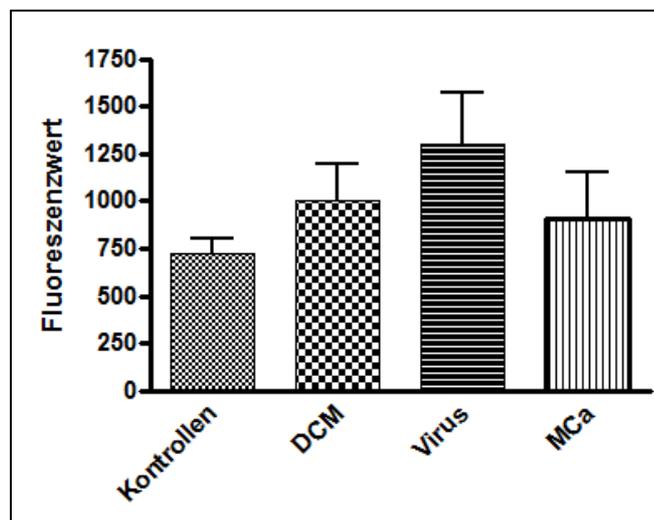


Abbildung 29: β -1AR (ARA) Gruppen Multiplex, 1 zu 200

Anmerkung. Aufgeführt sind hier die klinischen Gruppen mit den durchschnittlichen Fluoreszenzwerten (incl. Standardabweichung). Der gezeigte Autoantikörper ist β 1-adr. (ARA, Multiplex) mit der Verdünnungsstufe der Patientenseren von 1 zu 200.

Auch eine weitere Aufspaltung der Virusgruppe in COX A und COX B, zeigte, genau wie in der Multiplexmessung, keine signifikanten Werte in beiden Messsystemen. Somit sind die Ergebnisse zwischen den beiden ELISA vergleichbar.

5 DISKUSSION

5.1 Übersicht über die Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war es, ein multiparametrisches Verfahren zur Messung von acht Autoantikörpern bei definierten Herzmuskelerkrankungen zu etablieren. Die Methode basiert auf an Beads gekoppelten Antigenen, die mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. Bei den Antikörpern handelte es sich um Autoantikörper gegen charakteristische Peptidsequenzen myokardialer Proteine wie Adenin-Nucleotid-Translokase (2 Peptide: Manchado 2002, Schwimmbeck 1991), humaner β 1-adrenerger Rezeptor (Mobini 1999), kardiales Myosin (3 Peptide: Cunningham 2002, Donermeyer 1995, Beisel 1991) sowie kardiales Troponin (2 Peptide: Kaya 2008). Im Multiplex-ELISA wurden diese acht für die DCM beschriebenen Autoantikörper in einem Testansatz zusammengefasst. Für die DCM wurden Autoantikörper in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen. Die Autoantikörper gegen den β 1-adrenergen Rezeptor, Adenin-Nucleotid-Translokase (Sequenz 1) kardiales Myosin (Sequenz 1) und kardiales Troponin (Sequenz 2) wurden in jeweils 48, 43, 33 und 38 % der Seren positiv getestet. Anhand der Korrelationen der Multiplexuntersuchungsergebnisse von Humansenen bioptisch vordiagnostizierter Patienten zu einem kommerziellen Einzel-ELISA (CellTrend) konnte anhand signifikanter Einzelergebnisse die Validität die Multiplexmethode gezeigt werden.

5.2 Aufbau des Multiplex ELISA's

Eine Routinemethode zur autoimmunologischen Diagnostik bei Kardiomyopathien existierte noch nicht. Obwohl über 30 kardiale Autoantikörper bekannt sind, gibt es zurzeit nur Einzelnachweise von wenigen Autoantikörpern für spezifische kardiale Autoantikörper (Caforio 2013). Es gibt wenige standardisierte Verfahren für die klinische Routine. Daher fiel die Entscheidung, als Vergleich die Autoantikörperidentifizierung durch Immunfluoreszenz an Affenherzmuskels zu wählen, in der Annahme, dass deren Proteine mit humanen vergleichbar sind. Hier werden Autoantikörper dadurch identifiziert, dass z.B. auf Mikroskopierobjektträger aufgebraachte Affenherzmuskeln als Antigen-Substrate dienen, an denen Serumautoantikörper an bestimmte Herzmuskelbestandteile binden, die dann nach zwei Inkubationsschritten im Fluoreszenzmikroskop sichtbar wurden. Diese

Methode der Fa. Euroimmun hat eine relativ hohe Nachweisgrenze. Bereits bei einer Verdünnung von 1:100 gab es jedoch keinen Fluoreszenznachweis mehr. Die Methode der Autoantikörperbestimmung mittels Immunfluoreszenz hat den Nachteil, dass die Autoantikörper unselektiert detektiert werden und die Aufteilung in verschiedene Antikörper durch diese Untersuchung nicht möglich ist. Daher wird sie auch in der Regel nur dann eingesetzt, wenn es nicht möglich ist, Testantigene analyssegerecht für Enzymimmuntests aufzubereiten (Euroimmun 2016).

In der Multiplex-Methode ist diese durch laser- und computergesteuerte Auswertung möglicherweise genauer und kann Nuancen in Fluoreszenzabweichungen besser erfassen. Daher eignete sich die Immunfluoreszenzmethode suboptimal, um als Positivkontrolle im Vergleich zum Multiplex-ELISA verwendet zu werden. Im Multiplex-ELISA sind deutlich geringere Nachweisgrenzen mit den möglicherweise spezifischeren Antikörpern möglich.

Außer einem ELISA-Test für β 1-adrenerge Rezeptorautoantikörper, den die Firma CellTrend seit 2011 kommerziell zu Forschungszwecken anbietet, fehlten Vergleichsmöglichkeiten zu den sieben weiteren gemessenen Autoantikörpern gegen myokardiale Proteine (s.o). Die Fa. CellTrend benutzt im Gegensatz zum Ansatz in dieser Arbeit die gesamte Proteinsequenz zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen den β 1-adrenergen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (CellTrend 2011), während in dieser Arbeit Teilsequenzen der myokardialen Proteine verwendet wurden.

Bei den Peptidsequenzen der hier dargestellten Methode handelt es sich um Teile von publizierten Antigenen von herzmuskelspezifischen Zellbestandteilen (z.B. Beisel 1991, Schwimmbeck 1991, Donermeyer 1995, Mobini 1999, Machado 2002; Kaya 2008). Diese wurden in Herzmuskelbiopsaten bei Patienten mit einer Kardiomyopathie gefunden, die durch Virusinfektionen ausgelöst worden waren. Die Nutzung eines definierten Peptidanteils einer Proteinsequenz würde theoretisch eine höhere Spezifität autoimmuner Antikörper aufzeigen müssen. Es ist einfacher, spezifische kürzere Peptidsequenzen zu verwenden als das gesamte Protein synthetisch herzustellen und dann zu koppeln. Dennoch könnte die unterschiedliche Sequenzlänge von 10 bis 29 Aminosäuren für die Immunogenität und somit Menge der Autoantikörperproduktion für die Nachweisbarkeit im Serum eine Rolle gespielt haben.

Zum Aufbau und zur Optimierung der Methode mittels Kaninchenserum wurde die Firma Open Biosystems (Thermo Fisher Scientific) beauftragt, zwei Kaninchen 70 Tage lang auf humanes kardiales Troponin 1, (siehe Sequenz unter Tabelle 2) zu immunisieren. Mit diesem antikörperhaltigen Kaninchenserum wurde nach einer Vergleichsmessung der Seren die Eichkurve erstellt. Eines der Seren enthielt eine höhere Antikörperkonzentration gegen kardiales Troponin, was sich im Western - Blot bestätigte. Bei den extern hergestellten Kaninchenserum sind methodische Fehler nicht gänzlich auszuschließen. Auch die gewählten Kaninchen zur Herstellung des immunisierten Serums haben einen Einfluss auf die Höhe der Fluoreszenzreaktion. Es war wichtig ein standardisiertes Vergleichsserum zur Eichung der Methode und Justierung ihrer Bestandteile zu haben.

Die Standardabweichung der in Dreifachbestimmung getesteten Messergebnisse (SD) betrug zwischen 4 und 16 Prozent. Anhand der Daten konnte ein Trend etabliert werden: denn bei stärkeren Verdünnungen wurden die SD geringer und die Messungen waren somit besser reproduzierbar. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich in einer überproportional höheren Autoantikörperkonzentration, die es bei erkrankungsbedingten Serumspiegeln beim Menschen nicht in dieser Höhe gibt. Bei den hochtitrigen speziell immunisierten Kaninchenserum war die optimale Verdünnung 1 zu 1000. Bei humanen Seren wurde grundsätzlich eine niedrigere Verdünnungsstufe (1 zu 200) gewählt. Die Verdünnung musste bei den Kaninchen somit 5 x so hoch sein, was den deutlichen Unterschied der in der Natur vorkommenden Serumkonzentration und dem artifiziell immunisierten zeigt. Auf Basis dieser Ergebnisse wurden alle Versuche, sowohl bei Kaninchenserum als auch bei humanen Seren, in höherer Verdünnung und mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt. Da die Versuchsreihen im Verlauf mehrfach wiederholt wurden, war eine Doppelbestimmung zur Beibehaltung der Intra-Assay-Genauigkeit ausreichend. Die SD zeigte sich stabil in oben genanntem Bereich.

Der Sample-Diluent hatte einen zehnfach höheren Fluoreszenzwert im Gegensatz zu Standard-Diluenten. Die Abweichung zwischen den Mehrfachbestimmungen der hohen Sample-Diluent- Werte ist deutlich größer (siehe die Standardabweichung Tabelle 8). Um diese Abweichungen möglichst gering zu halten, fiel die Wahl auf den Standard-Diluenten (Puffer) für die weiteren Versuche. Da die Zusammensetzung der käuflich erworbenen Diluenten Betriebsgeheimnis der Fa. Bio-Rad Laboratories Inc. sind, kann der Grund für

diese Unterschiede nicht genannt werden. Möglich ist, dass der Bio-Plex Suspensions-Array bereits auf Bestandteile in dem Diluenten reagieren. Es zeigte sich, dass selbst ohne Serum grundsätzlich eine minimale Nachweisbarkeit der gekoppelten Beads vorhanden war. Die Kombination aus Fängerantikörpern und mit Antigenen gekoppeltem Bead zeigte bereits eine Fluoreszenzreaktion. Dies ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Somit wurde in dieser Arbeit als „negative Reaktion“ der Fluoreszenzwert von 160 festgelegt. Auch bei den humanen Seren wurde eine Testung mit den verschiedenen Serumverdünnungsmitteln (Sample- bzw. Standard Diluent) von der Firma Bio-Rad durchgeführt. Die Fluoreszenz war im Sample-Diluenten gegenüber dem Standard-Diluenten 2,1- bis 6-fach erhöht. Außerdem war die Standardabweichung höher. Daher entschieden wir uns auch bei Humansen für den Standard-Diluenten. Dies zeigte die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsreihen zur Eichung der Methode mittels Kaninchenseren und Humansen. Es wurde zusätzlich nach der optimalen Konzentration des Fängerantikörpers und des Markierungstoffes Streptavidin-Phycoerythrin gesucht.

Da wir durch eine weitere Verdünnung auf 1 zu 400 sowohl des Fängerantikörpers als auch des Streptavidin-Phycoerythrin die minimale Standardabweichung weiter verbessern konnten, wurden ab diesem Zeitpunkt die Agentien in der hohen Verdünnung von 1 zu 400 angewendet.

Es zeigte sich, dass die von der Firma Bio-Rad beschriebene Methode für die Messungen von acht Autoantikörpern bei den eigenen Testseren abgeändert werden musste. Die Eichung der Methode und die Vergleichbarkeit bei der Etablierung der Methode durch immunisierte Kaninchenseren und Humansen erwies sich als sinnvoll. Durch mehrfache Messungen mit den verschiedenen Testseren (Kaninchen und Human) konnten die einzelnen Schritte genauer etabliert werden. Es zeigte sich zusätzlich, dass die Antikörper in den humanen Testseren eine deutlich erniedrigte Konzentration von Autoantikörper aufweist als bei den immunisierten Seren, was die Genauigkeit der Methode und die Möglichkeit der genauen Quantifizierung beweist.

5.3 Multiplex-ELISA und Vergleich mit der Literatur

Um die in der Literatur vorbeschriebenen falschpositiven Fluoreszenzsignale möglichst zu umgehen, wurde als Fängerantikörper spezielles Anti-Human IgG (Fc gamma-specific) Biotin der Firma Bioscience genutzt. Bei Kellar und Mitarbeitern (2001) wurden bei der Anwendung des Multiplex-Verfahrens diverse Fängerantikörper von u.a. Mäusen und Ratten an Humanseren getestet.

In der Arbeit wurde angenommen, dass diese Signale durch heterophile Antikörper hervorgerufen werden, die sich wiederum an diese Antikörper binden und somit eine Fluoreszenzreaktion auslösen. Die in der Arbeit durchgeführten Versuchsreihen unterstützen die Vermutung, dass Antikörper tierischen Ursprungs nachweislich falsch positive Signale generierten unabhängig von der Fänger- oder Detektionsantikörperspezifität (Kellar 2001). Nachdem die Multiplex-Methode vielfach justiert und dadurch standardisiert worden war, musste verglichen werden, wie genau die Ergebnisse des Multiplex (Versuch mit mehreren verschiedenen Beads pro Well) mit denen im Singleplex (Einzelversuche) übereinstimmten. Hierzu wurden, wie exemplarisch oben gezeigt, mehrere Testreihen an Humanseren in beiden Methoden durchgeführt (Abbildung 14 und 15).

Im Endergebnis zeigte sich, dass sich trotz einiger etwas über der Signifikanz liegenden Ergebnisse zwischen einem Multi- und Singleplex-ELISA die Ergebnisse in den unterschiedlichen Systemen tendenziell nicht unterschieden und in beiden Systemen gleiche Resultate erzielt worden waren. Ab diesem Zeitpunkt wurden dann alle Versuche als Multiplexuntersuchungen durchgeführt. Bereits bei der Erstbeschreibung des Multiplex-ELISA's von McDade und Mitarbeitern (1997) konnten in Wiederholungsversuchen die Ergebnisse nicht immer signifikant reproduziert werden.

In der Arbeitsgruppe um Oliver (1998) konnte im Vergleich zwischen dem Bead-Multiplex-System und einem Einzel-ELISA nur eine Übereinstimmung von 91 % zwischen den Methoden bei der Determinierung von Cytokinen gefunden werden.

Während Kellar (2001) mit aufwendigen Zugaben von Antigenen aus Rattenserum und Immunglobulinen die Restfluoreszenz deutlich verringern konnte, entschieden wir uns gegen diese aufwendige und kostspielige Methode. Zudem hatte Kellar mit der Präinkubation mit Rattenserum in einigen Fällen keinen oder lediglich partiellen Erfolg, z.B. für IL-2, TNF α und IFN- γ .

Wir konnten durch entsprechend hohe Verdünnungen und einen angepassten einheitlichen Schwellwert der Immunfluoreszenzrestaktivität in Mehrfachmessungen reproduzierbare Ergebnisse erzielen und somit die geringe Restfluoreszenz vernachlässigen. Die Stabilität der Lösungen war abhängig von der Lichtempfindlichkeit der Beads. Die Abbildung 3.11 zeigt die Entwicklung der Fluoreszenzwerte in zwei einzelnen Humanseren (β 1-adrenerger Antikörper, kardiales Myosin (Sequenz 2)) über fünf Wochen. Methode und Verdünnungen wurden nicht verändert. Die einzige Änderung ergab sich, als in Woche drei eine neue Arbeitslösung (vorgefertigte Lösung mit gekoppelten Beads) hergestellt worden war. Exemplarisch wurden zwei der acht gemessenen Antigene dargestellt. Die übrigen verhielten sich ähnlich wie die dargestellten Beispiele.

Ursachen für das Abfallen und unterschiedliche Konstanz der Fluoreszenzwerte ist u.a. die Lichtempfindlichkeit der Beads. Obwohl darauf geachtet wurde, die gekoppelten Beads in einer lichtundurchlässigen Aufbewahrungseinheit und in Alufolie verpackten Tubes beim Pipettieren aufzubewahren, schienen die kurzen Lichteinflüsse bereits ihren Schaden an der Fluoreszenz und der damit verbundenen Nachweisbarkeit bewirkt zu haben. Eine weitere Möglichkeit ist die ungleiche Verteilung beim Pipettieren aus ein und demselben Test - Tube über längere Zeit. Trotz exaktem Vortexen, könnten sich die schweren Anteile der Arbeitslösung (gekoppelte Beads) bereits nach kurzer Zeit eher als Pellet am Grund abgesetzt haben. Hier wird bei Aufnahme in die Pipette eher Lösung entnommen als am oberen Spiegel. Daraus ergab sich die Empfehlung, die gekoppelten Beads nicht länger als einen Monat lang zu verwenden. Vergleichbare Literatur zu dieser Empfehlung fehlt.

5.4 Messungen von humanen Testseren

Mit der komplettierten Methode des Multiplex-ELISA wurden mehrere Messungen an humanen Testseren durchgeführt. Dazu wurden die Seren an vier verschiedenen Tagen in Doppelbestimmung gemessen und die Ergebnisse verglichen. Exemplarisch wurden oben zwei Humanseren dargestellt (Abb. 17 und 18). Zu sehen war in allen vier Messungen ein Trend, wobei die dargestellten Humanseren eine starke Reaktion bei den Antigenen β 1-adrenerger Antikörper und auch bei kardialem Troponin (Sequenz 2) zeigten.

Die Höhe der Antikörper im ELISA war in dem Serum des Patienten mit positiver Immunfluoreszenz (Fa. Euroimmun) ca. fünf-bis siebenfach höher als dem Patienten mit negativer Immunfluoreszenz. Aber auch bei letzterem waren die Anti-beta1-Rezeptorantikörper deutlich positiv. Dieses ist wahrscheinlich durch die höhere Sensitivität der Methode zu erklären. Denn die Antikörpertiter im ELISA korrelieren gut zu klinischen Stadien der Herzinsuffizienz (Aso 2009). Auch wird in neueren Untersuchungen mittels ELISA bei 60 % der DCM-Patienten Autoantikörper gerade gegen den β 1-adrenergen Rezeptor nachgewiesen (Holthoff 2012), während in anderen Untersuchungen diese nur zu 30 % beschrieben wurden (Caforio 2002) (sh unten 4.7, u.a.) Möglicherweise spielt aber immer noch die hohe Varianz eine Rolle. Daher werden zum Screening andere Methoden eingesetzt (Joshi-Barr 2016). Trotz exakter Beibehaltung und Ausführung der Methode der Vorversuche in dieser Arbeit, gelang es nicht, über zweieinhalb Wochen identische Fluoreszenzwerte zu produzieren (Tabelle 15 und 16). Hier lag die Standardabweichung bei 20%. Die Intra-Assay-Standardabweichungen lagen bis auf wenige Ausnahmen bei diesem Patienten bei einem nicht-signifikanten Ergebnis. Bei den erhöhten Titern des Kaninchenserums zeigt sich eine geringere Standardabweichung von etwa 10%. Der Grund für diese weniger breite Streuung der Ergebnisse könnte in der deutlich höheren Konzentration der Autoantikörper im Serum sein. Hierdurch kommt es zu einer verbesserten und eindeutigeren Nachweisbarkeit durch den Multiplex-ELISA kommen.

Andere Arbeitsgruppen berichten ebenfalls über große Unterschiede ihrer Parameter. So ergaben sich bei Kellar und Mitarbeitern (2001) ebenfalls in Doppelversuchen und in über mehrere Tage durchgeführten Versuchsreihen ebenfalls deutliche „spikes“ in deren Versuchsreihen. Dort ergaben sich Abweichungen von 79% bis 122%. Auch mit Wechseln des Humanserums zu Rattenserum änderte die Abweichung kaum (± 11 %). Grossmann und Mitarbeiter (2011) beschrieben bei Multiplexuntersuchungen von Rheumautoantikörpern wie ANA, anti-ds-DNA, anti-Sm, u.s.w. Intra-Assay-Variationskoeffizienten (CV) von 3,3% bis 9,9 % an drei Tagen und Inter-Assay-Variationskoeffizienten von sechs Mikrobead von 1,6 bis 15,1 %. Die Interpopulations-CVs der IgG-coated Mikrobeadpopulation lagen an Tag 1 bei 14,7%, am Tag 2 bei 11,8 % und am Tag 3 bei 9,6 %.

5.5 Vergleichsmessungen von humanen Testseren

Abschließend wurden 78 Humanseren von Patienten der IKDT im Multiplex gemessen. Als Vergleichsmethode wurde die Messung der Fa. CellTrend gewählt, da sie zu diesem Zeitpunkt die einzige auf dem Markt verfügbare Methode war, mit der dieser Autoantikörpers bei Kardiomyopathie gemessen werden konnte. Im Gegensatz zur eigenen Multiplex-Messung mit gekoppelten Beads verwendete die Fa. CellTrend das gesamte Molekül des β 1-adrenergen Rezeptors als Antigen und wies dieses in Einzelmessungen (ELISA) bei den Patienten nach. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Ergebnissen der Firma CellTrend und der Messung von dem hier entwickelten β 1-adrenergen Rezeptor in der Verdünnung 1 zu 200. Aufgrund dieser Ergebnisse, die den kommerziellen Messungen entsprachen, wurden die Testmethoden als etabliert angesehen.

In weiteren Versuchsansätzen wurden Ergebnisse innerhalb verschiedener Verdünnungen von 1 zu 200 und 1 zu 400 verglichen. Hier ergab sich ebenfalls ein hochsignifikantes Ergebnis. Somit war die Methode in sich ebenfalls als valide anzusehen. Da sich der Versuchsaufbau für den β 1-adrenergen Rezeptor Autoantikörper im Vergleich zu dem kommerziellen ELISA (Fa. CellTrend) als valide gezeigt hatte, konnte das Testsystem auch für die anderen sieben Antigene analog entwickelt und optimiert werden.

Schließlich wurde die Korrelation zwischen dem bei CellTrend gemessenen β 1-adrenergen Rezeptor-Autoantikörper und dem bei einer Verdünnung von 1:400 im Multiplex gemessenen β 1-adrenergen Rezeptorantikörpern hergestellt. Hier ergab sich jedoch keine signifikante Korrelation. Gründe hierfür konnte die zu hohe Verdünnung gewesen sein, die sich von der wahrscheinlich deutlich geringeren Verdünnung des kommerziellen ELISA's der Firma CellTrend zu sehr unterschied. Im Gegensatz dazu waren bei zwei nicht zu weit auseinanderliegenden Verdünnungen unserer Versuchsreihen von 1 zu 200 und 1 zu 400 die Ergebnisse vergleichbar.

Die Ergebnisse für die β 1-adrenergen Rezeptorautoantikörper waren zwar nicht signifikant, wir versuchten dennoch die Ergebnisse im Zusammenhang zu den vordiagnostizierten klinischen Daten zu interpretieren (s.u.). Weitere Korrelationen der anderen Autoantikörper wurden nicht aufgezeigt, da keine direkten Vergleichsmöglichkeiten bestehen.

Autoantikörper gegen den β 1-adrenergen Rezeptor (Einzel-ELISA- und Multiplex-ELISA-Messung)

In der Statistik nach Spearman zeigten sich innerhalb des Assays die jeweiligen Messungen der 78 Patienten aber größtenteils hochsignifikant übereinstimmend. In der statistischen Prüfung nach Pearson, die methodisch zunächst eher ungeeigneter erschien, da keine Normalverteilung vorlag, waren die Signifikanzen zwar ebenfalls durchgehend vorhanden, jedoch lagen die Korrelationskoeffizienten nicht ausschließlich unter $p = 0,05$. Hier muss in weiteren Messungen geklärt werden, ob sich die hochsignifikanten Zahlen bestätigen lassen. Die erhobenen Daten wurden schließlich mit bereits bestehenden klinischen Daten der Patienten korreliert. Hierzu wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet, der die Ergebnisgruppen untereinander korreliert.

5.6 Autoantikörper gegen den β 1-adrenergen Rezeptor (Einzel-ELISA- und Multiplex-ELISA-Messung)

Die Humanseren waren in vier klinische Gruppen eingeteilt worden (Kontrollen, MCA, DCM, und Virus). Sowohl bei dem ELISA für den β 1-adrenergen Rezeptor-Autoantikörper der Firma CellTrend, als auch bei dem hier entwickelten Multiplex-ELISA- β 1-adrenergen Rezeptor-Autoantikörper ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei den eigenen Messungen wurde jedoch der Nachweis von anti- β 1-adrenergen Rezeptorantikörpern in der DCM-Gruppe in 48 % und in der Virus-(Coxsackie) Gruppe von 49 % gegenüber der Gruppe mit akuten Myokarderkrankungen mit 33 % als erhöht angesehen. Schultheiss und Kühl (1990) erkannten die Bedeutung von Autoantikörpern in 30 - 50 % bei DCM-Patienten (Kühl 2013). Der beta1-adrenerge Rezeptor wurde von Holthoff (2012) in ca. 60 % nachgewiesen. Die große Variabilität der Prävalenz (ca. 30 bis zu 90 %) hat zum einen methodische Gründe (s.u.), zum anderen liegen diese auch in der Gruppenzuordnung in der sich stets weiterentwickelnden Differenzierung in der Diagnostik von Kardiomyopathien. Während Holthoff und Mitarbeiter zu 8 % antikörperpositive Seren in der Kontrollgruppe feststellte, wurde bei unseren Messungen die „Rest“-Fluoreszenz der Kontrollseren als Cut-Off (Nullwert) festgelegt. Dadurch sind die Ergebnisse unserer Arbeit wieder vergleichbar. Das Erkrankungsspektrum unserer MCA-Gruppe mit 33 % positiven Seren ist möglicherweise nicht vergleichbar mit der Hypertonusherzgruppe (preserved ejection fraction) bei Holthoff, die in 17% anti- β 1-adrenergen Rezeptor antikörperpositiv war. Es ist bekannt, dass stimulierende Autoantikörper gegen

den für die Kontraktion und Relaxation des Herzens wichtigen beta1-adrenergen Rezeptor die Herzinsuffizienz entscheidend beeinflussen können. Dennoch weiß man zu wenig über die Korrelation der Antikörpermenge zur Schwere der Erkrankung und vor allem zu zeitlichen Abläufen im Krankheitsverlauf: Abhängig von einer individuellen genetischen Prädisposition führt eine Schädigung von Kardiomyozyten durch Entzündung, Ischämie oder kardiotoxische Substanzen zu Autoimmunreaktionen (Jahns 2010). Durch eine Apoptose oder Nekrose der Myozyten werden daraufhin kardiale (Auto)Antigene freigesetzt, die wiederum eine Autoimmunreaktion auslösen, die im schlimmsten Fall zu einer andauernden autoantikörpervermittelten Herzmuskelschädigung mit konsekutivem fibrotischem Umbau und schließlich zur Herzmuskeldilatation führt. Anti- β 1-Autoantikörper führen nachweislich zu einem Anstieg des sarkoplasmatischen zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) und erhöhten Kalziumkonzentrationen. Eine extrakorporale Immunabsorption oder in Zukunft direkte Neutralisation der im Blut zirkulierenden Rezeptorantikörper können jedoch die Herzmuskelschädigung verhindern (Felix 2000, Staudt 2005).

Als zusätzlicher Grund für die sehr unterschiedlich angegebenen Häufigkeiten könnte die ELISA-Methode eine Rolle spielen. Während nach Holthoff und Mitarbeitern ELISA's mit sehr langen Proteinsequenzen mehr falsch positive Ergebnisse ergeben, soll der von ihm benutzte ganzzellbasierter ELISA durch eine hohe Reproduzierbarkeit charakterisiert sein und wenig falsch positive Ergebnisse enthalten (Holthoff 2012). Die Validität unserer eigenen Methode mit verschiedenen langen Proteinsequenzen konnten wir im Gegensatz zur Annahme von Holthoff jedoch i.d.R. nachweisen.

5.7 Autoantikörper gegen Adenin-Nucleotid-Translokase, kardiales Myosin, kardiales Troponin

Im prozentualen Vergleich ergab sich für die DCM für alle Autoantikörper ein positiver Nachweis, am deutlichsten für β 1-adrenergen Rezeptorautoantikörper, Adenin-Nucleotid-Translokase, kardiales Myosin (Sequenz 1) und kardiales Troponin (Sequenz 2) mit jeweils 48, 43, 33 und 38 % autoantikörperpositiv getesteter Seren. Diese Werte liegen in einem Bereich, der in der Literatur beschrieben ist (Caforio 2013). Auch in unserer Arbeit wurden Antikörper in der Virusgruppe nachgewiesen, gegen β 1-adrenergen Rezeptorautoantikörper in 39 %, kardiales Myosin (Sequenz 1 36 %, Sequenz 2 24 % und

Sequenz 3 20 %), im Mittel in 26%. Auch bei anderen im eigenen Multiplex gemessenen Autoantikörpern gegen Adenin-Nucleotid-Translokase-AK (Sequenz 2), kardiales-Myosin (Sequenz 3) und kardiales Troponin (Sequenz 1) ergaben sich signifikante Ergebnisse. Hier zeigte sich bei Seren von Patienten mit akuter Myokarditis eine signifikant niedrigere Konzentration an Autoantikörpern gegenüber den Gruppen mit unklarer Herzerkrankung (virusassoziierter Myokarditis). Gegenüber der DCM-Gruppe war die Konzentration auch erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Die Werte bei DCM waren nicht signifikant höher oder auf vergleichbarem Level wie bei der Virus- und der Kontrollgruppe.

Autoantikörper gegen Adenin-Nucleotid-Translokase

Die Autoantikörperspiegel gegen ANT waren in der eigenen Virusgruppe gegenüber der Gruppe mit akuter Myokarditis (MCA) signifikant erhöht. Schwimmbeck (1993) entwickelte ein Nachweisverfahren zum Anti-ANT-Antikörper-Nachweis und erkannte in der ähnlichen Molekularstruktur zwischen Aminosäuresequenzen von der ANT zu Coxsackievirus B3 (CVB3). CVB3 verursacht Myokarditiden und führt zu Produktion von Autoimmunantikörpern.

Antikörper gegen kardiales Myosin

Bei dem Autoantikörper gegen kardiales Myosin (Sequenz 2) hingegen zeigte sich ein deutlicher Trend bei der DCM-Gruppe. Hier ergab sich als einziger der acht getesteten Autoantikörper ein deutlich erhöhter Titer gegenüber der Kontroll- und Virusgruppe. Ein signifikantes Ergebnis zeigte sich allerdings nicht (P-Wert von 0,0829). Im Verlauf müssten hier weitere Seren getestet werden, um das Ergebnis zu bestätigen. In der DCM-Gruppe konnten Autoantikörper gegen kardiales Myosin (Sequenz 1) in 33 % festgestellt werden, in der Virusgruppe zu 36 %. Erst durch hochsensitive ELISA- oder Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass Anti-Myosin-Antikörper (Sequenz 2) sowohl bei der DCM bis zu 67 % als auch zu 42 % der Patienten mit Myokarditiden vorhanden sein können (Caforio 1992). An isolierten Kardiomyozyten konnten Warraich und Mitarbeiter (2001) durch Myosinantikörper durch eine Änderung der Kalziumsensitivität der Myofilamente eine Abnahme der Kontraktilität hervorrufen. Dennoch ist der Autoantikörper gegen kardiales Myosin in seinen molekularen Mechanismen, die zur Herzinsuffizienz führen, letztlich noch nicht vollständig geklärt. Denn Autoantikörper gegen kardiales Myosin ohne spezifische Oberflächenbindungen wurden nicht von Myozyten aufgenommen und

zeigten keinen Effekt auf den Calciumstrom. Da beide Isoformen Alpha- und Betamyosin im Sarkolemmkompartiment lokalisiert sind, ist der Mechanismus der Antikörperinteraktion und die intrazelluläre Signaltransduktion noch wenig verstanden. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass monoklonale Antikörper gegen kardiales Myosin im Tierexperiment zur Myokarditis führen kann. Diese erklärt jedoch nicht die Herzinsuffizienz der DCM-Patienten, bei denen der Nachweis kardialer Myosinautoantikörper mit einer Verschlechterung der Herzfunktion korrelierte. Es konnte auch gezeigt werden, dass kardiale Antimyosinautoantikörper mit dem beta1-adrenergen Rezeptor kreuzreagieren und dadurch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktivieren. cAMP löst wiederum die Adrenoceptor-Adenylcyclase-Proteinkinase Kaskade (PKA) aus, die die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle phosphoryliert und einen verstärkten Ca-Einstrom vom extrazellulären Milieu bewirkt sowie eine Ca-Freisetzung durch das sarkoplasmatische Retikulum. Diese Mechanismen führen schließlich zur myokardialen Dysfunktion und Apoptose von Kardiomyozyten (Kaya 2012). Durch experimentelle Untersuchungen nach Coxsackie-Virus B 3 (CVB 3) - induzierter Autoimmunmyokarditis wurden bereits 1992 von Neumann und Mitarbeitern Antimyosin-Antikörper nachgewiesen. Auch die eigene Virusgruppe enthielt überwiegend Seren von Patienten mit Coxsackie B-Virusinfektionen. Im Akutstadium hingegen (akute Myokarditisgruppe) waren nur in 11 % Autoantikörper nachweisbar. In der MCa-Gruppe waren die Autoantikörper gegen Myosin signifikant erniedrigt gegenüber der Gesamtgruppe.

Autoantikörper gegen kardiales Troponin

Autoantikörper gegen kardiales Troponin (Sequenz 1) können schwere Herzmuskelentzündungen verursachen, insbesondere nach einer CVB3-Infektion. Die Arbeitsgruppe um Leuschner konnte 2008 in nur in 7 % bei DCM und in 9,2 % bei ischämischer Kardiomyopathie Autoantikörper gegen kardiales Troponin nachweisen, 19 % der Seren von Patienten mit DCM und in 12 % bei Virusmyokardiopathie Autoantikörper gegen kardiales Troponin (Sequenz 1) nachgewiesen wurden.

Kardiale Autoantikörper bei Viruserkrankungen

Viruspositive und autoantikörperpositive Herzmuskelbiopsien wurden in einer prospektiven Studie an Patienten mit Myokarditis/DCM in 12 % nachgewiesen. 48 % waren in

dieser Untersuchung nur anti-heart-autoantibody (AHA)-positiv, 9% ausschließlich virus-positiv und 31 % virus-und AHA-negativ (Caforio 2007). In der Gruppe ohne Nachweis eines pathogenetischen Faktors könnten nicht untersuchte Viren und auch eine andere z.B. zellvermittelte Autoimmunität von Bedeutung gewesen sein. Schon 1998 konnten Pauschinger und Mitarbeiter molekulargenetisch bei der sog. idiopathischen DCM in 39 % eine enterovirale RNA identifizieren. Bei inflammatorischen Kardiomyopathien hingegen ließ sich Enterovirus - RNA in 31 % nachweisen. Kühl und Mitarbeiter (2005) konnten neben Enteroviren häufig Parvovirus B 19 bei linksventrikulären Funktionsstörungen nachweisen. Bereits 1995 konnte Lauer aus der Arbeitsgruppe um Schultheiss in 48 % Coxsackie B 3- assoziierte Antikörper gegen Myosin signifikant häufiger bei der Myokarditis gegenüber 24 % bei der DCM und in 21 % bei anderen kardialen Erkrankungen nachweisen (Lauer 1995).

Im Unterschied zur DCM wurde die Bedeutung der Autoantikörper in der Pathogenese der DCM mit Viruspersistenz erst später erkannt. Heute geht man davon aus, dass es bei viraler Genese besonders zu Beginn der Erkrankung zur Freisetzung herzspezifischer Antigene kommt, und eine Autoimmunreaktion ausgelöst werden kann. Die Höhe der Autoantikörperkonzentration im Serum könnte zur Schwere der Herzmuskelschädigung und im zeitlichen Verlauf zum klinischen Verlauf der DCM korrelieren: Bei länger andauernden progredienten Erkrankungen erwartet man bei der DCM, besonders bei Viruspersistenz, dass kardiale Autoantikörperkonzentrationen nicht abfallen. Prospektive Studien sollen diese Fragestellung klären (Deubner 2010). Beschrieben wurden jedoch auch, dass Autoantikörpernachweise eher mit früheren Krankheitsstadien assoziiert waren und zeitlichen Verlauf abnehmen können (Caforio 1997, 2007). Bei einer DCM mit Viruspersistenz ist die Interaktion zwischen Viruspersistenz und Ursachen der unzureichenden Bildung neutralisierender Antikörper und die Dynamik der Autoantikörperproduktion im zeitlichen Verlauf nicht untersucht. Die Infektion wird als wesentliche Ursache für die meist linksventrikulär eingeschränkte Herzfunktion angesehen. Entsprechend ist auch das therapeutische Vorgehen. Falls vorhanden, erfolgt eine spezifische Therapie mit Virustatika. Wenn diese nicht zur Verfügung stehen, führte der therapeutische Einsatz von Interferon zur einer Viruselimination und dadurch zu einer verbesserten Herzfunktion (Kühl 2003, Schultheiss 2016). Eine zusätzliche pathogenetische Bedeutung wird bei der

DCM mit Viruspersistenz der Aktivität von Autoantikörpern zugestanden, deren Konzentration in dieser Arbeit vergleichbar mit denen der DCM-Gruppe war, bei der keine Viruspersistenz angenommen wurde. Ob dann nach therapeutischer Viruselimination in Zukunft auch eine Elimination der Autoantikörper z.B. durch Plasmapherese erfolgen sollte (sequentielle Therapie), oder eine antivirale und immunsuppressive Therapie kombiniert werden, ist zu erwägen (Caforio 2007). Welche kardialen Autoantikörper sich besonders negativ auf die Herzfunktion auswirken, könnte durch eine konsequente Weiterentwicklung der Autoantikörperbestimmung z.B. mit einem Multiplex-ELISA differenzieren lassen. Da Autoantikörper eine unterschiedliche Wirkung auf die Inotropie haben, sind in diesem Zusammenhang Erkenntnisse über einzelne Autoantikörper von Bedeutung. Insbesondere wurde dem β 1-Rezeptorautoantikörper eine größere Bedeutung in der Pathogenese der DCM zugeschrieben. Im Tierexperiment konnten Jahns und Mitarbeiter (2004) nachweisen, dass es durch Antikörper gegen β 1-Rezeptoren zu einer progredienten Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion und einer biventrikulären Dilatation kommt. In unseren Versuchsreihen konnten sowohl in der DCM - Gruppe als auch der Virus-Gruppe in jeweils 48 bzw. 49 % β 1-Autoantikörper nachgewiesen werden (s.o.)

Autoantikörper bei Coxsackievirus (COX)-Infektionen

In dieser Arbeit waren bei Dreiviertel der Virus/Autoantikörper-Untersuchungsgruppe Coxsackieviren im Myokard nachgewiesen worden. Schultheiss und Mitarbeiter konnten 1996 die pathogenetische Rolle von Autoantikörpern gegen ANT bei verringerter Herzfunktion nach Coxsackievirusinfektionen nachweisen. In Untersuchungen von Nowalany-Kozielska und Mitarbeitern 2016 waren Zytomegalie- und ebenfalls Coxsackie B-Viren am häufigsten bei Patienten nachgewiesen worden, deren DCM sechs Monate nicht progredient war. Coxsackie B-Viren weisen strukturell ähnliche Epitope wie das kardiale Myosin auf. Kreuzreagierende Autoantikörper konnten durch die Ähnlichkeiten des Antigens (molekulares Antigenmimikry) die Bildung von Autoantikörpern induzieren (Kühl 2005). In dieser Arbeit konnte bei Viruspersistenz keine Abnahme der Autoantikörperkonzentrationen in zwei Messungen im Verlauf der Erkrankung festgestellt werden. Ebermann und Mitarbeiter konnten 2012 tierexperimentell zeigen, dass eine suffiziente Regulation des zellulären Energiemetabolismus die Viruselimination ermöglicht. Bei chronischer Infektion hingegen ist die mitochondriale Herzmuskelfunktion beeinträchtigt und selbst, wenn

später das Virus eliminiert war, blieben die autoimmunologischen Prozesse weiter aktiv. Dörner und Mitarbeiter (2006) wiesen im Tierversuch nach, dass lösliche Isoformen vom Coxsackie-Adenovirusrezeptor Antikörperproduktionen induziert und gleichzeitig die Myokarditis verstärkt, wahrscheinlich sekundär durch die Auslösung autoimmuner Prozesse. Das könnte auch eine Erklärung sein für die Feststellung in dieser Untersuchung, dass bei Viruspersistenz die Autoimmunphänomene im Verlauf nicht abnehmen. Gleichzeitig ist es eine Erklärung dafür, dass die Prognose bei gleichzeitiger Persistenz von Coxsackie (B3) -Viren und Autoantikörpern schlecht ist.

Die Arbeitsgruppe um Caforio (2013) postuliert, dass vor allem bei chronischen Herzerkrankungen, so wie der DCM ohne Viruspersistenz, autoinflammatorische Prozesse in ca. 50 % vorlagen. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung können dieses bestätigen und zusätzlich zeigen, dass auch im Zusammenhang mit persistierenden Virusinfektionen, hauptsächlich Coxsackievirusinfektionen, kardiale Autoantikörper ebenfalls zu ca. 50 % nachweisbar waren.

Obwohl bisher bei der akuten Myokarditis nach geltenden europäischen Richtlinien die Diagnostik durch Biopsien als Goldstandard gilt (Caforio 2013), gibt es zu wenig Daten zu Autoantikörpern in der Akutphase und im weiteren Verlauf. Denn die diagnostische Endomyokardbiopsie wird immer noch zögerlich durchgeführt. Diese wird meist erst bei nicht ausheilenden Erkrankungen eingesetzt und zu einem zu geringen Prozentsatz auf autoimmune Phänomene untersucht (Kühl 2012, Caforio 2013). In Deutschland werden jährlich nur 5000 Patienten herzbiopsiert, obwohl die jährliche Neuerkrankungsinzidenz bei ca. 25 000 Kardiomyopathien insgesamt liegt. Das bedeutet, dass der Anteil der Herzmuskelbiopsien unter 20 % liegt (Lassner, 2013).

Möglicherweise lassen sich in Zukunft durch weitere Testansätze und klinische Korrelationen unklare akute Herzmuskelerkrankungen mithilfe des hier entwickelten Multiplex-ELISAs auch in früheren Krankheitsstadien genauer aufklären. Dann ließe sich die z.B. immunsuppressive Therapie zu einem Zeitpunkt einsetzen, bevor irreversible Myokardschäden entstehen. Bei bereits diagnostizierten und therapierten Autoimmunmyokarditiden könnte der Multiplex-ELISA als Verlaufskontrolle eingesetzt werden.

5.8 Beantwortung der Fragestellung

Die angewandte Methode zur Messung von kardialen Autoantikörpern mittels eines Multiplex-ELISAs war reproduzierbar und ist somit erfolgsversprechend. Es gelang mit dem hier erstmals entwickelten Multiplex-ELISA der Nachweis von Autoantikörpern im Serum von DCM-Patienten. Diese war sowohl im Multiplex-ELISA als auch im kommerziellen ELISA der Fa. CellTrend möglich. Dabei war der Multiplex-ELISA in der Sensitivität dem Einzel-ELISA überlegen. Die Nachweisbarkeit der verschiedenen Autoantikörper war hingegen unterschiedlich gut. Es variierte der Anteil der Positivität zwischen den Autoantikörpern in den unterschiedlichen Darstellungen.

Der Multiplex-ELISA konnte somit durch diese Arbeit entwickelt werden. Es ergab sich eine fast signifikante Übereinstimmung zwischen dem Single- und Multiplex-ELISA. Ebenfalls konnte die Methode standardisiert werden. Der Grenzwert wurde als Median plus 3-fache SD der Kontrollgruppe festgelegt, ab welchem eine Serumprobe als „positiv“ gewertet werden konnte. Anhand des begrenzten Stichprobenumfangs in dieser Arbeit und fehlenden Daten aus der klinisch-kardiologischen Forschung, konnten die Ergebnisse noch nicht sicher eingeordnet werden.

Es ist denkbar, dass in einzelnen Fällen bei Patienten mit hohen Titern mit der hier entwickelten Methode Titerverläufe bestimmt werden können. Bei den aktuell vorliegenden Diskrepanzen zwischen den einzelnen Messungen, sind z.Zt. klinische Verlaufskontrollen noch nicht möglich, jedoch zukünftig denkbar.

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt und angewendet, die in einer einzigen Messung erstmals acht verschiedene Autoantikörper gleichzeitig messen kann. Der Multiplex-Assay zeigte äquivalente und möglicherweise auch genauere Ergebnisse als aktuell kommerziell erwerbliche Einzel-ELISA. Darüber hinaus konnte aufgrund der zusammengefassten Messungen eine Zeitersparnis und eine Verringerung der für die Messung nötigen Probenmenge gegenüber einem Einzel-ELISA als Vorteil festgestellt werden.

Es zeigten sich jedoch auch noch einige Schwachstellen im Multiplex-ELISA. Im Laufe der Messungen waren teilweise hohe Abweichungen zwischen den Einzelmessungen aufgefallen, was die Reproduzierbarkeit erschwerte. Es konnten häufig nur Trends in der Reproduzierbarkeit gezeigt werden. Hier ist selbst durch äußerst sorgfältiges Ausführen der Methodik kaum Spielraum zur Verbesserung. Diese Schwierigkeiten wurde bereits in

der Literatur von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Kellar 2001; Nifli, 2006; Willitzki 2012). Hier scheint eine Problematik innerhalb der Methodik oder anhand des zu messenden Untersuchungsmaterials auch in anderen klinisch-diagnostischen Bereichen vorzuliegen. Denn obwohl die Sensitivität eines ELISAs oder Multiplex-Tests seit 1998 kontinuierlich verbessert wurde, und ein Multiplextest material- und zeitsparend ist, gilt z.B. für ein ANA-Screening immer noch eine indirekte Immunfluoreszenztechnik als Goldstandard (IIF-Testing auf Hep2-Zellen) (Willitzki, 2012).

Ebenfalls schwierig gestaltete sich die Nachweisbarkeit mancher Autoantikörper, z.B. gegen Adenin-Nucleotid-Translokase (Sequenz 1) und gegen kardiales Troponin (Sequenz 2). Hier könnten die vorhandenen Sequenzen und deren Pathogenität eine Rolle spielen. Da es sich um nur kurze Anteile des gesamten Autoantigens handelt, ist möglicherweise die Bindung zu den Autoantikörpern an dieser Peptidsequenz schlechter oder gar nicht gegeben. Verbesserungen hier könnten sich aus der Nutzung längerer oder ganzer Proteinsequenzen ergeben.

Mit längeren Proteinsequenzen müsste gegebenenfalls die Anzahl der Autoantigene pro Well reduziert werden. In der Originalarbeit von McDade und Mitarbeitern (1997) war die Multiplexmessung auf vier gekoppelte Antigene pro Well ausgelegt. Es sind Unterschiede zwischen verschiedenen Multiplexgrößen, z.B. zwischen vier und acht Antikörpern beschrieben worden. Hier müssten in Zukunft weitere Versuche an größeren Kohorten unternommen werden.

Der hier dargestellte und getestete Multiplex - ELISA stellt einen ersten Prototyp eines diagnostisch nutzbaren immunologischen Testsystems für kardiale Autoantikörper dar. Eine Verbesserung des Tests und die umfassende klinische Validierung bleiben nachfolgenden Projektarbeiten überlassen.

Quellenverzeichnis

Aretz HT1, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1987 ;13-14

Aso S, Yasaki Y, Kasai H, et al. Anti-beta1-adrenoreceptor autoantibodies and myocardial sympathetic activity in chronic heart failure. *Int J Cardiology* 2009; 13: 240-5

Beisel KD, Srinivasappa J, Prabhakar BS. Identification of a putative shared epitope between Coxsackie virus B4 and cardiac alpha myosin heavy chain. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 49-55

Belizna C, Dujvestijn A, Hamidou M, Cohen Taevert JW. Antiendothelial cell antibodies in vasculitis and connective tissue disease. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1545-1550

Bio-Plex Cytokine Assay Instruction Manual, BIO RAD, 2010

Bio-Plex Multi-Plex System Broschüre

http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5405.pdf 13.08.2013

Bio Rad Broschüre : Bio-Plex Pro™ Magnetic COOH Beads ; Bio-Plex® COOH Beads ; Amine Coupling Kit; Instruction Manual <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4110012C.pdf> am 18.11.2014

Bottazzo GF, Todd I, Mirakian R, Belfiore A, Pujol-Borrell R. Organ-specific autoimmunity. A 1986 overview. *Immunol Rev* 1986; 94: 137-169.

Brockfeld T, Hrsg. 2008, Physiologie. 5. Vegetatives Nervensystem und Motorik, zweite Auflage Marburg: Medi-Learn Verlag, 64-65

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; 5: 1734-1742

-
- Caforio AL1, Bauce B, Boffa GM et al. Autoimmunity in myocarditis and dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibody frequency and clinical correlates in a patient series from Italy. *G Ital Cardiol.* 1997 Feb;27(2):106-12.
- Caforio ALP, Daliento L, Angelini A, et al. Autoimmune myocarditis and dilated cardiomyopathy: focus on cardiac autoantibodies. *Lupus* 2005; 14: 652-55
- Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, et al. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J.* 2007 :1326-33
- Caforio AL1, Pankuweit S, Arbustini E, et al. European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2013 ;34:2636-48
- CellTrend Produktinformation, EIA zur quantitativen Bestimmung von anti-1-adrenerge Rezeptor Antikörpern http://www.celltrend.de/tl_files/inhalte/dateien/Produktinfo%20dt/B1-AR%20Produktinfo%20dt.-2012-03.pdf , Stand 10/2012
- Cunningham MW, Hall NK, Krisher NK, Spanier AM. A Study of anti-group-A-streptococcal monoclonal antibodies cross-reactive with myosin. *J Immunol* 1986; 136: 293-8
- Cunningham MW; McCormack JM, Fenderson PG, et al. Human and murine antibodies cross-reactive with streptococcal M protein and myosin recognize the sequence GLN-LYS-SER-LYS-PLN in M protein. *J Immunol* 1989; 143: 2677-83
- De Scheerder IK, De Buyzere M, Delanghe J, et al. Humoral immune response against contractile proteins (actin and myosin) during cardiovascular disease. *Eur Heart J* 1991; 12 (Suppl D): 88-94
- Deetjen P, Speckmann E-J, Hescheler J, Hrsg. 2005, *Physiologie*, vierte Auflage, München Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH, 430-431

Deubner N, Berliner D, Schlipp A, et al. Cardiac β 1-adrenoceptor autoantibodies in human heart disease: Rationale and design of the Etiology, Titre-Course, and Survival (ETICS) Study. *Eur J Heart Fail* 2010 ; 12:753-762

Doesch AO, Mueller S, Nelles M, et al. Impact of troponin I -autoantibodies in chronic dilated and ischemic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2011; 106: 25-35

Dörner A, Kallwellis-Opara A, Pauschinger M, Kühl U, Schultheiss HP. Cardiac autoantibodies in viral myocarditis. *Heart Fail Clin* 2005; 1: 333-43

Dörner A, Grunert HP, Lindig v, et al. Treatment of coxsackievirus-B3-infected BALB/c mice with soluble coxsackie adenovirus receptor CAR4/7 aggravates cardiac injury. *J Mol Med(Berl)* 2006; 84: 842-51

Donermeyer DL Beisel KW, Allen PM, Smith SC. Myocarditis-inducing epitope of myosin binds constitutively and stably to I-Ak to antigen-presenting cells in the heart. *J Exp Met* 1995; 182: 1291-300

Ebermann L, Wilka S, Klumpe I. et al. The mitochondrial respiratory chain has a critical role in the antiviral process in Coxsackie B 3-induced myocarditis. *Laboratory Investigation* 2012; 92: 125-134

Euroimmun Website, http://www.euroimmun.de/pdf/cat2006_internet_d.pdf, Stand 06/2016

Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Gatewood S, et al. Mast cells and innate cytokine are associated with susceptibility to autoimmune heart disease following Coxsackievirus B 3 infection. *Autoimmunity* 2004; 37: 131-45

Felix SB, Beug D, Dörr M. Immunoabsorption therapy in dilated cardiomyopathy. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2015;13:145-52

Felix SB, Staudt A, Dörffel 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 ;35:1590-8

Frustaci A, Russo MA, Chimenti C: Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J* 2009

Grossmann K, Roggenbuck D, Schröder C, et al. Multiplex assessment of a non-organ-specific autoantibodies with a novel microbead-based immunoassay . *Cytometry A.* 2011; 79::118-25

Holthoff HP1, Zeibig S, Jahns-Boivin V, et al. Detection of anti- β 1-AR autoantibodies in heart failure by a cell-based competition ELISA. *Circ Res.* 2012 ;111:675-84

IKDT Website: <http://www.ikdt.de/de/institut/>, Stand 06/2016

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; 133: 1419-29

Jahns R, Schlipp A, Boivin V, Lohse MJ. Targeting receptor antibodies in immune cardiomyopathy. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36: 212-18

Joshi-Barr S, Haberland A, Bartel S, et al. High throughput bioassay for beta1-adrenoceptor autoantibody detection. *Int J Cardiology* 2016. Published online June 08

Kaya Z, Afanasyeva M, Wang Y, et al. Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. *Nat Immunol* 2001; 8: 739-45

Kaya Z, Göser S, Buss SJ, et al. Identification of cardiac troponin I sequence motifs leading to heart failure by induction of myocardial inflammation and fibrosis. *Circulation* 2008; 118: 2063-2073

-
- Kaya Z, Leib, C, Katus HA. Autoantibodies in heart failure and cardiac dysfunction. *Circulation Research* 2012; 110: 145-158
- Kellar KL1, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane BE. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry* 2001; 45: 27-36
- Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, et al. Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation*. 2008 ;118:639-48
- Kühl U, Noutsias M, Schultheiss HP. Immunohistochemistry in dilated cardiomyopathy. *Eur J Cardiol* 1995; 16: 100-6
- Kühl U, Ebermann L, Lassner D, et al: Adenine nucleotide translocase 1 expression affects enterovirus infection in human and murine hearts. *Int J Cardiol* 2014; 172: e449-52
- Kühl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al.: Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2003; 107: 2793–8
- Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, et al. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 2005a; 112: 1965–70
- Kühl 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*, Vol 111, 2005b 887-893
- Kühl U, Pauschinger M, Seeberg B, Lassner D, et al. 2005. Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction. *Circulation* 112: 1965-70
- Kühl U, Lassner D, Pauschinger M, Gross UM, et al. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *J Med Virol* 2008; 80:1243-51

Kühl U, Lassner D, von Schippenbach, et al. Interferon-beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy. *Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1295-6

Kühl U, Schultheiss HP. Myocarditis-early biopsy allows for tailored regenerative treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109: 361-8

Lakdawala NK, Winterfield JR, Funke BH. Dilated Cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2013; 6: 228-37

Lappé JM, Pelfrey CM, Cottleur A, Tang WH. Cellular proliferative response to cardiac troponin I in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Tranl Sci* 2011; 4: 317-22

Lassner D, Siegismund CS, Stehr J et al. Recent advances in molecular diagnostics and treatment of heart muscle disease, *J Analyt Sci* 2013; 3: 98-109

Lauer B, Padberg K, Schultheiss HP, Strauer BE. Autoantibodies against human ventricular myosin in sera of patients with acute and chronic myocarditis. *J Am Co 11 Cardiol* 1994; 23: 146-153

Lauer B, Padberg K, Schultheiss HP, Strauer BE. Autoantibodies against cardiac myosin in patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy..*Z Kardiolog* 1995; 84: 301-310

Lauer B, Schannwell M, Kuhl U, et al. Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis. *J AmColl Cardiol* 2000; 35: 11-18

Leuschner F, Li J, Goser S, et al. Absence of auto-antibodies against cardiac troponin I predicts improvement of left ventricular function after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008; 16; 1949-1955

Limas CJ, Limas C. Beta-adrenoreceptor antibodies and genetics in dilated cardiomyopathy: an overview and review. *Eur Heart J* 1991;12 (Suppl D): 175-7

-
- Maisch B, Richter A, Sandmüller A, Portig I, Pankuweit S, the members of the project 9a in the BMBF-Heart Failure Network. Inflammatory dilated cardiomyopathy. *Herz* 2005; 30: 535-44
- Manchado C, Orús J, Vilarroya F. Epitope mapping of mitochondrial adenine nucleotide translocase-1 in idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 571-82
- McDade RL, Spain MD. Rapid, economical testing in the clinical laboratory: a new flow cytometry-based multiplex system. *Clin Immunol Newsletter* 1997; 17: 154-58
- Mobini R, Magnusson Y, Wallukat G, et al. Probing the immunological properties of the extracellular domains of the human beta(1)-adrenoceptor. *J Autoimmun* 1999; 13: 179-86
- Neumann, DA, Rose DR, Ansari AA, et al. Induction of multiple heart autoantibodies-in mice with Cocksackie B3- and cardiac myosin-induced autoimmune myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 1994; 1: 146-153
- Mobini R, Maschke H, Waagstein F. New insights into the pathogenesis of dilated cardiomyopathy: possible underlying autoimmune mechanism and therapy. *Autoimmunity Reviews* 2004; 3: 277-84
- Nelson PN, Astley SJ, Roden D, et al. Characterization of anti-myosin monoclonal antibodies. *Hybridoma* 2005; 24: 314-8
- Nifli A-P, Notas G, Mamoulaki M, et al. Comparison of a multiplex, bead-based fluorescent assay and immunofluorescence methods for the detection of ANA and ANCA autoantibodies in human serum. *J Immunol Methods* 2006; 311: 189-97
- Notario C, Manchado B, Zamora M, Mampel T, Vinas O. Assessment of membrane-bound mammal mitochondrial adenine nucleotide translocase topography by experimental antibodies. *Biochemistry* 2003; 42: 820-8

-
- Nowalany-Kozielska E, Koziel M, Domal-Kwiatkowska D, et al. Clinical significance of viral genome persistence in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *Intervirol* 2016; 5: 350-356
- Oliver KG1, Kettman JR, Fulton RJ. Multiplexed analysis of human cytokines by use of the FlowMetrix system. *Clin Chem*. 1998 Sep;44(9):2057-60.
- Pauschinger M, Kühl U, Dörner A, et al. Detection of enteroviral RNA in endomyocardial biopsies I inflammatory cardiomyopathy and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Z Kardiol* 1998; 87: 443-453
- Rehm H, Hammar F, Hrsg. 2005, *Biochemie*, dritte Auflage, Frankfurt am Main: Wissenschaftlicher Verlag Harri Deutsch GmbH, 59
- Renart J, Reiser J, and Stark G R , Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 3116–20
- Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1991; 14: 426-28
- Rose NR. The adjuvant effect in infection and autoimmunity. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2008; 34: 279-82
- Schultheiss HP, Kühl U, Cooper LT. The management of myocarditis. *Eur Heart J*. 2011 ;32: 2616-25
- Schultheiss HP, Bolte HD, Schwimmbeck P, Klingenberg M. The antigenic characteristics and the significance of the adenine nucleotide translocator (ANT) as a major autoantigen for the antimitochondrial antibodies in myocarditis and congestive cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1983; 15: 85-93

-
- Schultheiss HP, Schwimmbeck P, Bolte HD, Klingenberg M. The antigenic characteristics and significance of the adenine nucleotide translocator as a major autoantigen to anti-mitochondrial antibodies in dilated cardiomyopathy. *Adv Myocardiol* 1985; 6: 311-27
- Schultheiss HP, Ulrich G, Janda I, et al. Antibody mediated enhancement of calcium permeability in cardiac myocytes. *J Exp Med* 1988; 168: 2105-19
- Schultheiss HP, Kuhl U, Schwimmbeck P, Strauer BE. Biomolecular changes in dilated cardiomyopathy. In: Baroldi G, Camerini F, Goodwin JF, eds. *Advances in cardiomyopathies*. Berlin: Springer Verlag, 1990: 221-34
- Schultheiss HP, Noutsias M, Kühl U, et al. Cardiomyopathies. I: Classification of Cardiomyopathies – dilated cardiomyopathy. *Internist* 2005; 46: 1245-58
- Schultheiss HP, Piper C, Sowade K, et al. Betaferon in chronic viral cardiomyopathy (BICC) trial: Effects of interferon- β treatment in patients with chronic viral cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol* 2016 Apr 25
- Schulze K, Becker BF, Schauer R, Schultheiss HP. A 1990. Antibodies to the ADP-ATP carrier – an autoantigen in myocarditis and dilated cardiomyopathy – impair cardiac function. *Circulation* 1990; 81: 959-69
- Schulze K, Schultheiss HP. The role of ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease. *Eur Heart J* 1995; 16 (suppl): 64-7
- Schwimmbeck PL, Bland NK, Schultheiss HP, et al. The possible value of synthetic peptides in the diagnosis and therapy of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1991; 12 (Suppl D): 76-80
- Schwimmbeck PL, Schwimmbeck NK, Schultheiss HP, Strauer BE. Mapping of antigenic determinant of the adenine-nucleotide translocator and coxsackie B3 virus with synthetic peptides: use for the diagnosis of viral heart disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 2: 135-140.

-
- Schwimmbeck PL, Schwimmbeck NK, Schultheiss HP, Strauer BE. Mapping of antigenic determinants of the adenine nucleotide translocator and coxsackie B3 virus with synthetic peptides: use for the diagnosis of viral heart disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 135-40
- Schwimmbeck PL, Badorff C, Schultheiss HP, Strauer BE. Transfer of human myocarditis into severe combined immunodeficiency mouse. *Circ Res* 1994; 75: 156-64
- Schwimmbeck PL, Bigalke B, Schulze K, et al. The humoral immune response in viral heart disease: characterization and pathophysiological significance of antibodies. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193: 115-9
- Sharer JD. The adenine nucleotide translocase type 1 (ANT1): a new factor in mitochondrial disease. *IUBMB Life* 2005; 57: 607-14
- Shmilovich H, Dannon A, Binah O. Autoantibodies to troponin I in patients with idiopathic dilated and ischemic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2007; 117: 198-202
- Smith JC, Allen PM. Myosin-induced acute myocarditis is a T-cell mediated disease. *J Immunol* 1991; 147: 2141-7
- Standard Protokoll, xMAP-Kopplung von Beads mit HPV- spezifischen Oligonukleotidsonden, PD Dr. A M Kaufmann, SOP Nr.7; 19.3.09
- Staudt A, Dörr M, Staudt Y, et al. Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy – results from protein-A immunoabsorption. *Am J Heart* 2005; 150: 729-36
- Trimpert C, Herda LR, Eckerle LG, et al. Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy: long-term reduction of cardiodepressant antibodies. *Eur J Clin Invest*. 2010 ; 40:685-91
- Tschöpe, Carsten; Kühl, Uwe. Myokarditis: Meist mit Defektheilung *Dtsch Arztebl* 2015; 112:

Warraich RS, Noutsias M, Kasak I, et al. Immunoglobulin G 3 cardiac myosin autoantibodies correlates with left ventricular dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy: Immunoglobulin G3 and clinical correlates. *Am Heart J* 2001; 143: 1076-84

Willitzki A, Hiemann R, Peters V, et al. New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:284740. doi: 10.1155/2012/284740. Epub 2012 Dec 19.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Gustav Hauck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Entwicklung eines Autoantikörper-Multiplex ELISA´s zur Diagnostik von Kardiomyopathien, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

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

Berlin, den 03.12.2016

Gustav Hauck

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Schultzeiß, ohne den es diese Dissertation nie gegeben hätte und der mich stets voller Geduld unterstützte. Dabei möchte ich mich insbesondere für das Überlassen des interessanten Themas bedanken und die zahlreichen Motivationen in allen Phasen dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt meinen Betreuern Dr. U. Kühl und Dr. D. Laßner für die instruktiven Treffen und gute Unterstützung, insbesondere im Bereich der benötigten wissenschaftlichen und klinischen Grundlagen. Sie standen mir zu jeder Zeit mit hilfreichen Tipps und Anregungen zur Seite, und beantworteten jede noch so komplexe Fragestellung, sowohl zu methodischen als auch zu inhaltlichen Themen stets prompt und ausführlich. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. M. Rohde und Dr. Ch. Siegismund für die gute Betreuung bei der Erstellung und Auswertung der Statistik und dem Niederschreiben der Arbeit bedanken Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des IKDT für die ständige Hilfe bei den experimentellen Arbeiten. Frau Dr. A. Dörner (Charité Berlin) danke ich für die Western Blot-Analyse. Zusätzlich bedanke ich mich bei Dr. Roland Pilot bei der Unterstützung des Layouts und der Formatierung.

Ich bedanke mich an dieser Stelle auch bei meinen Eltern Dres. M. Vocks-Hauck und G. Hauck, meinem Bruder cand. med. Leonhard Hauck, meiner Patentante Prof. Dr. E. Vocks, für den kontinuierlichen Austausch und die regen Diskussionen, die einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Dissertation geleistet haben.