

**Aus dem Hertie-Institut für klinische Hirnforschung der  
Universität Tübingen  
Abteilung Allgemeine Neurologie  
Kommissarischer Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Melms**

**Regulation von Autoimmunerkrankungen  
durch den PTPN22 1858\*C/T Polymorphismus und die  
*NCF1* Gen- / Pseudogenstruktur**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Peter Hoffmann  
aus  
Stuttgart – Bad Cannstatt**

**2010**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. R. Weissert

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Gasser

***meinen  
Eltern***

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung und Fragestellung	3
2.1	Komplex-genetische Autoimmunerkrankungen	3
2.1.1	Definition und Epidemiologie	3
2.1.2	Ätiologie und Pathogenese	3
2.2	Myasthenia gravis und Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22	6
2.2.1	Myasthenia gravis	6
2.2.1.1	Definition	6
2.2.1.2	Epidemiologie	6
2.2.1.3	Krankheitsbild	6
2.2.1.4	Verlauf	7
2.2.1.5	neonatale Myasthenia gravis	8
2.2.1.6	Begleiterkrankungen	8
2.2.1.7	neuromuskuläre Übertragung	8
2.2.1.8	Pathogenese	10
2.2.1.9	Bedeutung des Thymus	11
2.2.1.10	klinische Klassifikationen und Scores	12
2.2.1.10.1	Klassifikation nach Ossermann und Genkins	12
2.2.1.10.2	Myasthenia Gravis Score nach Besinger	13
2.2.1.11	Diagnostik	13
2.2.1.11.1	Pharmakologische Testung	13
2.2.1.11.2	repetitive Stimulation mittels Elektromyographie	13
2.2.1.11.3	Antikörperdiagnostik	14
2.2.1.12	Therapie	15
2.2.1.12.1	Acetylcholinesterase-Inhibitoren	15
2.2.1.12.2	Immunsuppressive Therapie	16
2.2.1.12.3	Thymektomie	16
2.2.2	Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22	17
2.2.3	Fragestellung	18
2.3	Multiple Sklerose / Malaria und der Neutrophil cytosolic factor 1	19

---

2.3.1	Multiple Sklerose	19
2.3.1.1	Definition	19
2.3.1.2	Epidemiologie	19
2.3.1.3	Krankheitsbild	20
2.3.1.4	Verlaufsformen	20
2.3.1.5	Diagnosekriterien	21
2.3.1.6	Prognose	24
2.3.1.7	Pathogenese	25
2.3.1.8	Diagnostik	27
2.3.1.8.1	Liquordiagnostik	27
2.3.1.8.2	Elektrophysiologische Diagnostik	28
2.3.1.8.3	Kernspintomographie	28
2.3.1.8.4	Skalen zur Abschätzung der Behinderung	28
2.3.1.9	Therapie	28
2.3.2	Malaria	31
2.3.2.1	Definition	31
2.3.2.2	Epidemiologie	31
2.3.2.3	Entwicklungszyklus des Parasiten	31
2.3.2.4	Krankheitsbild	32
2.3.2.5	Therapie	33
2.3.3	Reaktive Sauerstoffmetabolite	33
2.3.4	Neutrophil cytosolic factor 1	35
2.3.4.1	Definition	35
2.3.4.2	NADPH-Oxidase	35
2.3.4.3	<i>NCF1</i> -Gen und Pseudogene	36
2.3.4.4	NCF1 und Autoimmunerkrankungen	40
2.3.5	Fragestellung	40
3	Material und Methoden	41
3.1	Myasthenia gravis und PTPN22	41
3.1.1	Patienten	41
3.1.2	Material und Geräte	41
3.1.2.1	SNP Genotypisierung	41

---

3.1.2.2	Anti-Titin-Antikörper-Elisa	41
3.1.2.3	Anti-AChR-Antikörper-Radioimmunoassay	42
3.1.3	Methoden	42
3.1.3.1	SNP Genotypisierung	42
3.1.3.1.1	SNP-Genotyping-Mix	42
3.1.3.1.2	Taqman Universal Master Mix	43
3.1.3.1.3	Polymerase Kettenreaktion – Prinzip	43
3.1.3.1.4	Genotypisierung – Prinzip	43
3.1.3.1.5	Polymerase Kettenreaktion – Durchführung	45
3.1.3.2	Anti-Titin-Antikörper-ELISA	46
3.1.3.2.1	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest – Prinzip	46
3.1.3.2.2	Anti-Titin-Antikörper-ELISA	46
3.1.3.3	Anti-AChR-Antikörper-Radioimmunoassay	48
3.1.3.4	Statistische Analyse	48
3.2	NCF1 und Multiple Sklerose / Malaria	49
3.2.1	Patientengut	49
3.2.2	Material und Geräte	50
3.2.2.1	DNS-Separation aus humanem Vollblut	50
3.2.2.2	NCF1 Genotypisierung	50
3.2.2.3	Agarose – Gelelektrophorese	51
3.2.2.4	Zellseparation von Mono- und Granulozyten	51
3.2.2.5	Zählung und Verdünnung der polymorphnukleare Zellen und mononukleären Zellen des peripheren Blutes	52
3.2.2.6	Markierung eines Antikörpers mit R-Phycoerythrin	52
3.2.2.7	Bradford-Test	53
3.2.2.8	Färbung von Mono- und Granulozyten mit R-PE-markiertem p47-phox (D-10)-Antikörper	53
3.2.3	Methoden	53
3.2.3.1	DNS-Separation aus humanem Vollblut	53
3.2.3.2	NCF1 Genotypisierung	54
3.2.3.2.1	Taqman Universal Master Mix	54
3.2.3.2.2	Polymerase Kettenreaktion	55

---

3.2.3.2.3	Genotypisierung	55
3.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	56
3.2.3.4	Zellseparation von Mono- und Granulozyten	56
3.2.3.4.1	Zellseparation	56
3.2.3.4.2	Separation der Mono- und Lymphozyten	57
3.2.3.4.3	Separation der Granulozyten	57
3.2.3.5	Zählung und Verdünnung der PMNs und PBMCs	58
3.2.3.6	Markierung eines Antikörpers mit R-Phycoerythrin	58
3.2.3.6.1	p47-phox (D-10): sc-17845	58
3.2.3.6.2	Markierung	58
3.2.3.7	Bradford-Test	59
3.2.3.7.1	Prinzip	59
3.2.3.7.2	Durchführung	60
3.2.3.8	Färbung von Mono- und Granulozyten mit R-PE-markiertem p47-phox (D-10)-Antikörper	60
3.2.3.9	Durchflusszytometrie / Fluorescence activated cell sorting	61
3.2.3.9.1	Prinzip	61
3.2.3.9.2	Durchflusszytometrie	61
3.2.3.10	Statistische Analyse	62
3.2.3.10.1	Malaria	62
3.2.3.10.2	Multiple Sklerose	62
4	Ergebnisse	63
4.1	Myasthenia gravis und PTPN22	63
4.1.1	Messwterergebnisse	63
4.1.2	Allelfrequenzen- und Genotypenverteilung	63
4.1.3	Allelfrequenzen in Subgruppen der MS-Patienten	64
4.2	NCF1 und Multiple Sklerose / Malaria	66
4.2.1	$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten und MS	66
4.2.2	$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten sind assoziiert mit Subphänotypen der MS	66
4.2.3	$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten und Malaria	69
4.2.4	Korrelation der $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit der ROS-Produktion in Malariapatienten	70

---

4.2.5	$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten und Hämoglobinkonzentration	70
4.2.6	Durchflusszytometrie der Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten	71
5	Diskussion	73
5.1	Myasthenia gravis und PTPN22	73
5.1.1	Einführung	73
5.1.2	Assoziation des PTPN22 Polymorphismus mit Myasthenia gravis	73
5.1.3	Assoziation des PTPN22 Polymorphismus mit dem Auftreten von Anti-AChR-Antikörpern und Anti-Titin-Antikörpern	73
5.1.4	Anti-Titin-Antikörper und Thymome	74
5.1.5	Genotypen in Abhängigkeit vom Thymomstatus	75
5.1.6	Subgruppenanalyse der MG-Patienten ohne Thymom	75
5.1.7	Vergleich unserer Ergebnisse mit früheren Studien	76
5.1.8	Zusammenfassung und Ausblick	78
5.2	NCF1 und Multiple Sklerose / Malaria	79
5.2.1	Einführung	79
5.2.2	$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten in Multiple Sklerose-Patienten	79
5.2.3	$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten in Malaria-Patienten und Vergleich mit der ROS-Produktion	80
5.2.4	Kritik der Methode	81
5.2.4.1	Genotypisierung der NCF1-Fragmente	81
5.2.4.2	Durchflusszytometrie der Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten	82
5.2.5	Zusammenfassung und Ausblick	82
6	Zusammenfassung	83
6.1	Myasthenia Gravis und PTPN22	83
6.2	NCF1 und Multiple Sklerose	84
6.3	NCF1 und Malaria	85
7	Literaturverzeichnis	86
	Danksagung	104
	Lebenslauf	105



## 1 Abkürzungsverzeichnis

ACh	=	Acetylcholin
AChR	=	Acetylcholinrezeptor
AIE	=	Autoimmunerkrankungen
BSA	=	bovines Serumalbumin
<i>CTLA4</i>	=	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DNS	=	Desoxyribonucleinsäure
EAE	=	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	=	Expanded Disability Status Scale
FRET	=	Förster resonance energy transfer
FSC	=	Forward Scatter
HLA	=	humanes Leukozyten-Antigen
IVIg	=	intravenöse Immunglobuline
KI	=	Konfidenz-Intervall
LYP	=	Lymphoid Tyrosine Phosphatase
MG	=	Myasthenia gravis
MGB	=	minor groove binder
MHC	=	major histocompatibility complex
MRT	=	Magnetresonanztomographie
MS	=	Multiple Sklerose
NADPH	=	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
<i>NCF1</i>	=	Neutrophil cytosolic factor 1
OR	=	Odd's Ratio
p47-phox	=	Protein47-Phagozytenoxidase
PBMC	=	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	=	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	=	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Phox	=	Phagozytenoxidase
PMA	=	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMN	=	polymorphnukleare Zellen

## Abkürzungsverzeichnis

---

PTPN22	=	Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22
RA	=	Rheumatoide Arthritis
ROS	=	Reaktive Sauerstoffmetabolite (reaktive oxygene species)
R-PE	=	R-Phycoerythrin
SSC	=	Side Scatter
SLE	=	systemischer Lupus Erythematosus
SNP	=	single nucleotid polymorphism

## **2 Einleitung und Fragestellung**

### **2.1 Komplex-genetische Autoimmunerkrankungen**

#### **2.1.1 Definition und Epidemiologie**

Autoimmunerkrankungen (AIE) werden durch eine fehlende immunologische Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen ausgelöst. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion gegen eigene Körperzellen, dabei können ein oder mehrere Organe betroffen sein. Geschätzte 4-5 % der Bevölkerung sind von einer der mehr als 80 verschiedenen AIE befallen, wobei Frauen eine höhere Inzidenz als Männer aufweisen [Vyse et al., 1996]. AIE befinden sich unter den zehn häufigsten Todesursachen. Die sechs häufigsten AIE, die zusammengenommen ca. 50 % der AIE ausmachen, sind Rheumatoide Arthritis (RA), Morbus Basedow, Diabetes mellitus Typ I, perniziöse Anämie, systemischer Lupus erythematosus (SLE) und Multiple Sklerose (MS) [Wandstrat et al., 2001].

#### **2.1.2 Ätiologie und Pathogenese**

Die Pathogenese von AIE ist bis jetzt weitgehend ungeklärt. Die Anfälligkeit für komplexe AIE wird durch eine Vielzahl von genetischen und stochastischen Faktoren sowie von Umweltfaktoren bestimmt. Die Konkordanzrate von eineiigen Zwillingen zeigt am besten den genetischen Einfluss als dominierenden Faktor für die Entwicklung einer AIE. Sie reicht von 15 % bei RA [Silman et al., 1993] bis zu 57 % bei SLE [Winchester, 1992].

Die Vererbung von AIE erfolgt in den meisten Fällen polygenetisch, aber auch einige monogenetisch vererbte AIE sind bekannt, wie z.B. das X-chromosomal vererbte Syndrom mit Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie (IPEX), welches durch Mutationen im *Forkhead box P3 Gen (FOXP3)* ausgelöst wird [van der Vliet et al., 2007] oder das Autoimmun-Polyendokrinopathie-Candidiasis-Ektodermale Dystrophie-Syndrom (APECED-

Syndrom), bei dem das Gen verändert ist, welches für das Autoimmunregulator Protein (AIRE) kodiert. Bei APECED-Syndrom handelt es sich um eine Erkrankung mit den Symptomen autoimmune Polyendokrinopathie, Candidiasis und ektodermale Dystrophie. Bisher ist diese Erkrankung nur in Finnland vorgekommen.

Am ausgeprägtesten sind AIE mit Variationen im Major Histocompatibility Complex (MHC) assoziiert [Rose et al., 1999].

Die große genetische Heterogenität, Epistase und inkomplette Penetranz erschweren es, sogenannte Suszeptibilitätsgene zu identifizieren, die für die Anfälligkeit für AIE verantwortlich sind. Genetische Heterogenität beschreibt, dass unterschiedliche genetische Ursachen zum gleichen klinischen Bild führen. Epistase liegt vor, wenn ein Gen die phänotypische Ausprägung eines anderen Gens unterdrückt oder fördert.

Es gibt unterschiedliche Studienansätze um Suszeptibilitätsgene zu identifizieren: familienbasierte Kopplungsstudien, Kandidatengen-Assoziationsstudien und genomweite Assoziationsstudien. Familienbasierte Kopplungsstudien sind gut anwendbar bei monogenetischen Erkrankungen. Dabei werden Satellitenmarker, die eine chromosomale Region von 10-20 Centimorgan „stellvertretend“ abbilden, verwendet. Bei Erkrankungsvererbung innerhalb einer Familie werden mit diesen Satellitenmarkern die Lokalisation der die Krankheit verursachenden Genloci sukzessive eingeengt. Assoziationsstudien ermöglichen die Untersuchung polygen vererbter Erkrankungen. Bei Kandidatengen-Assoziationsstudien kommt es zur DNS-Analyse von Kandidatengenen. Bei genomweiten Assoziationsstudien werden Single Nucleotid Polymorphisms (SNP) analysiert, die ca. alle 10 kb auf dem humanen Genom verteilt sind. So werden in einer Studie mehrere hunderttausend SNPs untersucht.

Es wurden einige sogenannte non-MHC-Suszeptibilitätsgene identifiziert. Das erste, das entdeckt wurde, ist ein Tandem-repeat-Polymorphismus im Promotor des Insulingens, der zur Entwicklung von Diabetes führt [Bell et al., 1984]. Allerdings wurde der genaue Mechanismus bis jetzt noch nicht aufgeklärt. Weiterhin sind Mutationen der Komplementkomponente C1q mit SLE [Walport

et al., 1998] und Mutationen in *NOD2* mit Morbus Basedow [Ogura et al., 2001] assoziiert.

Vergleichbare Gene, die eine Auswirkung auf die Entwicklung von AIE haben, wurden sowohl in Nagetiermodellen wie auch durch klinischen Studien beim Menschen aufgedeckt. Einige dieser Gene beeinflussen mehrere AIE, darunter *PTPN22*, das *Interleukin-2-Rezeptor- $\alpha$ -Gen* (*IL2R $\alpha$* ) und der SNP CT60 im *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (*CTLA4*).

Die Rolle von *PTPN22* als Suszeptibilitätsgen für AIE wird unter 2.2.2 genauer diskutiert.

Für *IL2R $\alpha$*  wurde gezeigt, dass es in der Pathogenese von Diabetes mellitus Typ I [Vella et al., 2005], Morbus Basedow [Brand et al., 2007] und Multipler Sklerose [Hafler et al., 2007] eine Rolle spielt.

Der CT60-SNP im *CTLA4-Gen* spielt eine Rolle in der Krankheitsentwicklung von Morbus Basedow, Thyroiditis und Diabetes mellitus Typ I [Ueda et al., 2003], aber wahrscheinlich nicht bei der MS [Greve et al., 2007]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Genlocus Idd5.1, der das *CTLA4-Gen* enthält, mit einem verstärktem Auftreten von Diabetes mellitus Typ I, jedoch mit einem vermindertem Auftreten von Experimenteller Autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), assoziiert ist [Greve et al., 2004; Wicker et al., 2004]. Bei EAE handelt es sich um eine Krankheit im Mausmodell, die vergleichbar mit MS beim Menschen ist.

## **2.2 Myasthenia gravis und Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22**

### **2.2.1 Myasthenia gravis**

#### **2.2.1.1 Definition**

Bei der Myasthenia gravis (MG) handelt es sich um eine AIE bei der häufig Antikörper gegen die Acetylcholinrezeptoren (AChR) im synaptischen Spalt der Muskelendplatte gebildet werden. Es kommt zur wechselnd ausgeprägten, häufig asymmetrischen Schwäche der quergestreiften Muskulatur. Bei länger anhaltender Belastung der betroffenen Muskelgruppen nimmt diese Schwäche zu. In Ruhe erholt sich die Muskelkraft der betroffenen Muskeln wieder.

#### **2.2.1.2 Epidemiologie**

Die Inzidenz der MG beträgt zwischen 0,25-20 / 1.000.000 Einwohner pro Jahr, die Prävalenz zeigt weltweit gesehen eine breite Variation, von z.B. 50 / 1.000.000 Einwohner pro Jahr in Hong Kong bis zu 200 / 1.000.000 Einwohner pro Jahr in Virginia (USA) [Pekmezović et al., 2006].

Es ist eine Häufung der Neuerkrankungen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr zu beobachten. In dieser Altersgruppe sind ca. 60 % der an MG neuerkrankten Personen weiblich. Ab dem 40. Lebensjahr erkranken Männer und Frauen im gleichen Verhältnis an MG [Pekmezović et al., 2006].

#### **2.2.1.3 Krankheitsbild**

Das Krankheitsbild ist durch abnorme Muskelermüdung und Muskelschwäche geprägt, wobei eine okuläre von einer generalisierten MG unterschieden wird. Übergänge von der okulären zur generalisierten MG sind möglich.

Bei der okulären Form sind die äußeren Augenmuskeln einschließlich des M. Levator palpebrae betroffen. Die Patienten sehen Doppelbilder und leiden häufig an einer Ptose [Sergott, 1994]. Der Krankheitsverlauf der okulären Form

ist milder als der der generalisierten Form, was sich in einem niedrigeren Medikamentenbedarf, häufigeren Remissionen und einer geringeren Assoziation von Thymomen zeigt [Köhler et al., 2003].

Bei der generalisierten Form findet sich häufig eine bulbäre und faziale Symptomatik. Eine Dysarthrie durch eine Schwäche von Pharynx- und Zungenmuskulatur ist möglich. Durch Ermüdung der Gaumensegelmuskulatur kommt es zu einer undeutlichen näselnden Sprache.

Die Patienten können unter einer Schwäche der Kau- und Unterkiefermuskulatur leiden, wodurch sie Schwierigkeiten bei der Nahrungsaufnahme haben, es kommt zur Gewichtsabnahme und häufiger Regurgitation von Flüssigkeit durch die Nase.

Bei einer Schwäche des Kopfhalteapparates sind häufig die Nackenextensoren betroffen. Die Patienten leiden an chronischen Nackenschmerzen, Schultersteifigkeit und Hinterkopfschmerzen [Köhler et al., 2003].

Bei Befall der Extremitätenmuskulatur sind meist die stammnahen, großen Muskelgruppen befallen. Ein Befall der Atemmuskulatur ist lebensbedrohlich, da er zu einer respiratorischen Insuffizienz führt. Bei 6-10 % der Patienten kommt es zur Muskelatrophie [Schimrigk und Samland, 1977].

Eine myasthene Krise ist ein neurologischer Notfall. Es kommt zur akuten respiratorischen Insuffizienz, schweren bulbären Störungen und generalisierter muskulärer Schwäche [Thomas et al., 1997].

#### **2.2.1.4 Verlauf**

Bei ca. 15 % der Patienten beschränken sich die myasthenen Symptome auf den okulären Bereich [Grob et al., 1987]. Bei den restlichen 85 % kommt es nach wenigen Monaten zu einer Generalisation der Symptomatik.

Okuläre und bulbäre Symptomatik treten anfangs häufiger auf und werden mit fortschreitender Krankheitsdauer seltener, während die Schwäche der Rumpf- und Atemmuskulatur in den Vordergrund rückt.

Bei 10-20 % der Fälle tritt eine anhaltende spontane Remission ein.

Als günstige Remissionsfaktoren gelten jüngeres Lebensalter, geringer Schweregrad der Erkrankung und eine frühzeitige Thymektomie [Köhler et al., 2003].

### **2.2.1.5 neonatale Myasthenia gravis**

Bei 10-20 % der Neugeborenen myasthener Mütter kommt es zur neonatalen MG, die sich durch passive Antikörperübertragung der Mutter auf das Kind entwickelt [Papazian, 1992]. Sie macht sich in den ersten 72 h durch einen schlaffen Muskeltonus und Abschwächung von Trinken, Schreien und des Hustenstoßes bemerkbar. Die Symptomatik klingt innerhalb von Wochen ab.

### **2.2.1.6 Begleiterkrankungen**

Ca. 30 % der Patienten [Pekmezović et al., 2006] leiden zusätzlich zur MG an einer weiteren AIE wie Lupus erythematodes [Vaipoulos et al., 1994], aplastische Anämie [Mizobuchi et al., 1998], perniziöse Anämie [Zittoun et al., 1979], Thrombozytopenie [Ho et al., 1992], Sarkoidose [Takanami et al., 1995], Dermatomyositis [Christensen et al., 1995], M. Crohn [Finnie et al., 1994], Colitis ulcerosa [Lossos et al., 1995] oder Alopecia areata [Kubota et al., 1997].

Bei 75 % der Patienten findet sich eine Hyperplasie des Thymus. 8,5-15 % der MG Patienten haben ein Thymom. Umgekehrt findet sich bei 30-40 % der Thymom-Patienten eine MG [Thomas et al., 1999; Wilkins et al., 1999]. 10 % der Patienten haben eine Thyreoiditis und ca. 8 % eine RA.

### **2.2.1.7 neuromuskuläre Übertragung**

Jede Muskelfaser wird nur von einem Motoneuron innerviert. Auf muskulärer Seite der Synapse wird die Membran durch sekundäre Spalten fingerförmig vom primären synaptischen Spalt ausgehend in das Myoplasma eingestülpt. Die AChR sind am Membranbereich der durch die sekundären Spalten gebildeten Falten lokalisiert. Am Grund der Falten finden sich

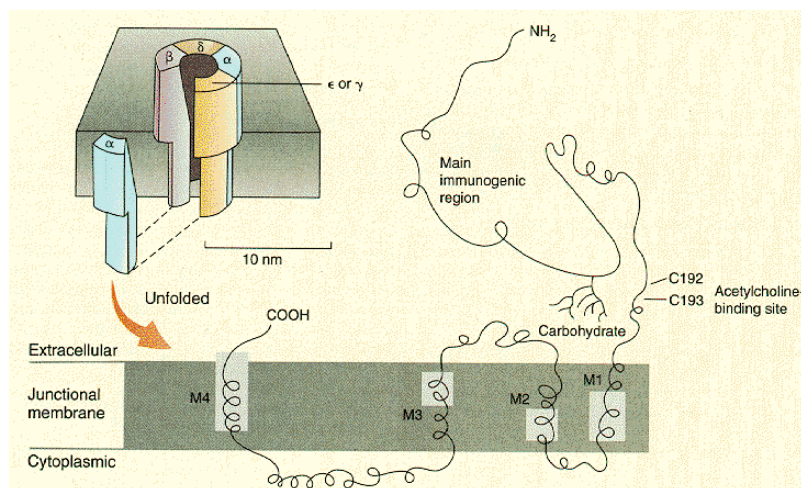


spannungsgesteuerte Natriumkanäle. Die Ausschüttung von Acetylcholin (ACh) ist kalziumabhängig. Präsynaptisch werden bei einem Aktionspotential spannungsgesteuerte Kalziumkanäle geöffnet, Kalzium strömt in die Nervenendigung ein. Das Kalzium führt über einen Signalweg zur Verschmelzung der mit ACh gefüllten Vesikel mit der präsynaptischen Membran. Es kommt zur Ausschüttung von ACh in den synaptischen Spalt. Durch Öffnung von Kaliumkanälen der Präsynapse kommt es zur Repolarisation des Axons.

Der nikotinerge AChR-Ionenkanal des quergestreiften Muskels ist ein kationenselektiver Ionenkanal der aus 5 Untereinheiten besteht: 2  $\alpha$ -Untereinheiten und je eine  $\beta$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit (vgl. Abb. 1).

Die  $\alpha$ -Untereinheit trägt je eine Bindungsstelle für ACh [Kachalsky et al., 1993]. Beide Bindungsstellen müssen besetzt sein, damit sich der Ionenkanal für Millisekunden öffnet und Natriumionen einströmen. Der Endplattenbereich wird depolarisiert und ein muskuläres Aktionspotential entsteht.

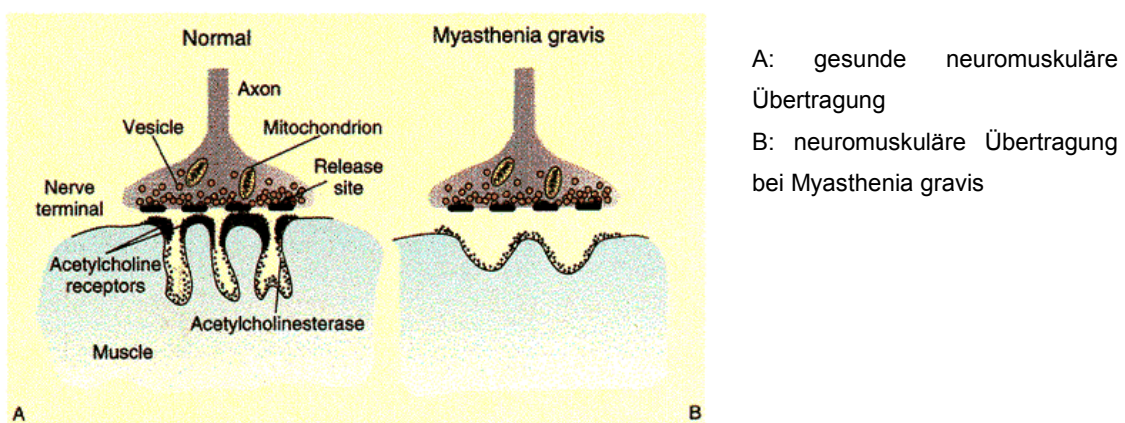
Die ACh-Esterase ist an die Basallamina im primären und in den sekundären synaptischen Spalten gebunden. Sie spaltet das ACh in Cholin und Acetat. Das Cholin wird aktiv von der Nervenendigung aufgenommen und steht zur erneuten Bildung von ACh zur Verfügung [Köhler et al., 2003].



**Abb. 1:** Der Acetylcholinrezeptor [aus Drachman, D. B., 1994]

### 2.2.1.8 Pathogenese

Bei der MG kommt es zur Reduzierung der AChR-Ionenkanaldichte an der muskulären Endplatte [Pestronk et al., 1985] und zur Endplattendestruktion. Der synaptische Spalt zwischen Nervenende und postsynaptischer Muskelmembran wird größer [Engel et al., 1976]. Durch Autoantikörper vernetzte AChR-Ionenkanäle werden schneller endozytiert und abgebaut. Komplementvermittelt kommt es durch die Antikörperbindung zu einer Destruktion des postsynaptischen Apparats mit einer Reduktion des postsynaptischen Fingerapparats (vgl. Abb. 2). Die AChR-Antikörper blockieren direkt den AChR-Ionenkanal [Köhler et al., 2003]. Aus der verringerten Zahl an geöffneten AChR-Ionenkanälen resultiert ein geringeres Potential in der muskulären Endplatte, welches nicht mehr ausreicht ein Aktionspotential zu generieren. Durch eine geringere Zahl an aktivierten Muskelfasern kommt es zur oben beschriebenen Muskelschwäche. Auch bei Patienten mit rein okulärer Symptomatik findet sich ein Rückgang der AchR an den Endplatten der Extremitäten, der jedoch subklinisch bleibt.



**Abb. 2:** Neuromuskuläre Übertragung [aus Drachman, D. B., 1994]

### **2.2.1.9 Bedeutung des Thymus**

Bei MG Patienten ist der Thymus gehäuft morphologisch verändert. Es findet sich eine Thymitis mit lymphofollikulärer Hyperplasie, eine Thymusatrophie oder ein Thymom.

Eine Ursache für diese Assoziation könnte in einem antigenen molekularen Mimikry bestehen: Eigene oder exogene Antigene, die eine Ähnlichkeit zu den Epitopen der AChR-Ionenkanälen aufweisen, aktivieren autoreaktive T-Zellen. Als exogene Antigene können Bestandteile von Herpes simplex Viren oder bakteriellen Infektionen in Frage kommen, bei denen eine Induktion der MG diskutiert wird [Schwimmbeck et al., 1989].

Beim malignen Thymom kommt es zu einer verstärkten Expression von Neurofilamenten, die als autoantigene Determinanten fungieren könnten, da sie ein AChR-ähnliches Epitop ausweisen. Man findet bei Patienten mit einer MG Thymome in 8,5-15 % der Fälle [Wilkins et al. 1999, Loehrer 1999, Otto 1998].

## 2.2.1.10 klinische Klassifikationen und Scores

### 2.2.1.10.1 *Klassifikation nach Ossermann und Genkins*

Zur Beurteilung der Schwere des Erkrankungszustandes der MG hat sich die Klassifikation nach Osserman und Genkins (vgl. Tabelle 1) etabliert.

**Tabelle 1:** Klassifikation der Myasthenia gravis nach Ossermann und Genkins (1971)

<b>Klasse</b>	<b>Klinische Form</b>	<b>Symptomatik</b>
I	Okuläre Form	Ptosis, Diplopie
IIa	Leichte generalisierte Form	Leichte generalisierte Schwäche
IIb	Faziopharyngeale Form	IIa + bulbäre Schwäche
III	Schwere akute generalisierte Form	Akute schwere generalisierte Schwäche, bulbäre Symptome, respiratorische Insuffizienz
IV	Schwere chronische generalisierte Form	Schwere, häufig progrediente generalisierte Schwäche

#### **2.2.1.10.2 *Myasthenia Gravis Score nach Besinger***

Der MG-Score nach Besinger [Besinger et al., 1981] erfasst in 10 Parametern den Krankheitsgrad der MG in der Rumpfmuskulatur, der faziopharyngealen Muskulatur, der Okulomotorik und der Atmung. Mit ihm ist eine genaue Dokumentation des Krankheitsstatus möglich.

#### **2.2.1.11 Diagnostik**

Die Diagnose der MG basiert auf anamnestischen Angaben, neurologischer Untersuchung und elektrophysiologischen sowie immunologischen Testungen.

##### **2.2.1.11.1 *Pharmakologische Testung***

Zur pharmakologischen Testung auf MG wird der kurzwirkende reversible ACh-Esterase-Inhibitor Edrophoniumchlorid (Tensilon®) verabreicht. Es kommt innerhalb von 20-30 sec über einen Zeitraum von 3-10 min zu einer verlängerten Wirkzeit von ACh im synaptischen Spalt und führt damit zur Verbesserung der Impulsübertragung vom Nerv auf den Muskel. Dieser Test kann allerdings auch beim Lambert-Eaton-Syndrom positiv sein, ist also nicht krankheitsspezifisch für MG.

##### **2.2.1.11.2 *repetitive Stimulation mittels Elektromyographie***

Untersucht wird erstens der Musculus trapezius indem der Nervus accessorius stimuliert wird und zweitens ein vom Nervus facialis versorgter Muskel, z.B. der Musculus frontalis mit einer Frequenz von 2-3 Hz.

Die Amplitude der fünften wird mit derjenigen der ersten Muskelantwort verglichen. Eine Amplitudenabnahme größer als 10 % ist sicher pathologisch [Schumm et al., 1984].

### **2.2.1.11.3 Antikörperdiagnostik**

Antikörper, die bei der MG zu finden sind, richten sich gegen ACh, Titin und die Muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase. Bei den Anti-AChR-Antikörpern, die bei 80-90 % der Patienten mit einer generalisierten MG und bei 55-70 % der Patienten mit einer rein okulären MG vorhanden sind [Bilinska M., 2002; Ferrero B. Et al., 1997], unterscheidet man zwischen bindenden, modulierenden und blockierenden Antikörpern [Köhler et al., 2003].

Bindende Antikörper sind gegen einen extrazellulären Abschnitt der  $\alpha$ -Untereinheit des AChR-Ionenkanals gerichtet. Diese Antikörperbindung führt zur Komplementaktivierung und zur Endplattendestruktion. Allerdings korreliert die absolute Höhe der Anti-AChR-Antikörpertiters nicht mit der jeweiligen Schwere der klinischen Symptomatik, da nur ein Teil der polyklonalen Anti-AChR-Antikörper pathogen wirken. Es besteht dagegen intraindividuell eine sehr gute Korrelation zwischen Veränderungen der Anti-AChR-Antikörperkonzentration und dem klinischen Befund. Der Anstieg der Autoantikörper geht häufig um mehrere Wochen einer klinischen Verschlechterung voraus.

Bei an MG-Erkrankten werden neben Anti-AChR-Antikörper auch Antikörper gegen quergestreifte Muskulatur wie z.B. Titin bestimmt [Marx et al. 1997]. Diese Antikörper sind gegen das Titinfragment MGT30 gerichtet [Gautel et al., 1993; Lübke et al., 1999] und kommen mit zunehmendem Lebensalter öfter bei MG Patienten vor. Sie finden sich in ungefähr 10-20 % der Patienten [Yamamoto et al., 2001]. Anti-Titin-Antikörper, die bei MG-Patienten auftreten, gelten als sensitiver Marker für Thymom [Yamamoto et al., 2001]. Bei MG-Patienten mit Thymom korreliert die Krankheitsschwere mit der Konzentration der Anti-Titin-Antikörper. Zum Erkennen eines Thymoms ist die Messung der Anti-Titin-Antikörper sogar sensitiver als die Computertomographie-Untersuchung [Chen XY, 2004]. Die pathogenetische Wertigkeit von Anti-Titin-Antikörpern ist jedoch unklar.

Bei Anti-AChR-negativen Patienten finden sich in 40 % der Fälle Antikörper gegen die Muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase. Klinisch ist diese Form

der MG meist durch oropharyngeale Schwäche und weniger okuläre Symptome charakterisiert [Evoli et al., 2003].

### **2.2.1.12 Therapie**

Die Behandlung der MG stützt sich auf die folgenden Pfeiler [Köhler et al., 2003]:

- Gabe von ACh-Esterase-Inhibitoren, die die neuromuskuläre Übertragung verbessern
- Immunsuppressive oder immunmodulatorische Therapie zur Reduktion der durch die Antigen-Antikörper-Komplexe ausgelösten Entzündungsreaktion
- Interventionelle Therapiemaßnahmen zur Behandlung akuter Verschlechterungen wie einer Myasthenen Krise, z.B. den therapeutischen Plasmaaustausch mittels Plasmapherese oder Immunadsorption [Shibuya et al., 1994]
- Thymektomie

#### **2.2.1.12.1 Acetylcholinesterase-Inhibitoren**

ACh-Esterase-Inhibitoren binden in der Nähe der katalytischen Einheit der ACh-Esterase und werden dort im Vergleich mit ACh deutlich langsamer hydrolysiert. Die Carbamylgruppe wird kovalent an die ACh-Esterase übertragen und hemmt die Enzymaktivität für Stunden. Das ACh-Angebot im synaptischen Spalt steigt und das ACh hat mehr Zeit die Bindungsstellen der postsynaptischen Membran zu besetzen. Der gebräuchlichste Wirkstoff ist Pyridostigminbromid (Mestinon®) in Dosen bis 300 mg/d.

#### **2.2.1.12.2 *Immunsuppressive Therapie***

Als Wirkstoffe stehen in der immunsuppressiven Therapie der MG Kortikosteroide und Zytostatika zur Verfügung. Kortikosteroide werden dabei selten als Monotherapie eingesetzt. Azathioprin ist das am häufigsten eingesetzte Zytostatikum in der MG-Therapie und seit 2004 für die MG-Behandlung zugelassen [www.dgn.org]. Bei einer Kombinationstherapie von Azathioprin und Kortikosteroiden dient Azathioprin zur Reduktion der Kortisondosis und damit zur Verringerung der Nebenwirkungen durch Kortison. Bei der Kombinationstherapie werden längere Remissionen beobachtet [Palace et al., 1998].

#### **2.2.1.12.3 *Thymektomie***

Der Thymus spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der MG. In einer Studie mit 129 Patienten konnte gezeigt werden, dass es 2 Jahre nach einer Thymektomie bei 23,2 % der Patienten zur kompletten und bei 66,6 % der Patienten zur partiellen Remission kam. Lediglich bei 10,1 % zeigte sich keine Besserung der myasthenen Symptomatik [Gellert et al., 2005]. Laut Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie besteht bei Nachweis eines Thymoms immer eine Operationsindikation. Bei Patienten mit einer generalisierten Anti-AChR-Antikörper-positiven MG ohne Thymom stellt die Thymektomie bei Patienten zwischen 15 bis 50 Jahren eine Therapieoption dar. Bei Kindern bis 14 Jahren sollte die Thymektomie erst nach Versagen der medikamentösen Therapie in Erwägung gezogen werden. MG-Patienten ohne nachweisbare Anti-AChR-Antikörper aber mit Antikörpern gegen die Muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase scheinen nicht von einer Thymektomie zu profitieren.



### 2.2.2 Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22

Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 (*PTPN22*) kodiert für das Protein Lymphoid Tyrosine Phosphatase (LYP), eine 110 kDa große Protein Tyrosin Phosphatase, die aus 807 Aminosäuren besteht. Lyp interagiert mittels seines N-terminalen prolinreichen Motivs mit dem C-Ende der Tyrosinkinase C-terminal Src Kinase und reguliert die T-Zell-Rezeptor-vermittelte T-Zell-Aktivierung [Cloutier and Veillette, 1996]. LYP gehört zu den wichtigsten Inhibitoren der T-Zell-Aktivierung und findet sich vorwiegend im Zytoplasma der Zelle [Gjörloff-Wingren et al., 1999; Cloutier and Veillette, 1999].

Der *PTPN22*-Polymorphismus rs2476601 wurde als pathogenetischer Faktor für mehrere AIE nachgewiesen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ I [Bottini et al., 2004; Onengut-Gumuscu et al., 2004; Smyth et al., 2004; Ladner et al., 2005], RA [Begovich et al., 2004; Lee et al., 2005], juvenile idiopathische Arthritis [Viken et al., 2005], SLE [Kyogoku et al., 2004], M. Basedow [Smyth et al., 2004; Velaga et al., 2004], generalisierte Vitiligo [Cantón et al., 2005] und Wegnersche Granulomatose [Jagiello et al., 2005]. Bei MS [Begovich et al., 2005], Psoriasis [Nistor et al., 2005], Morbus Crohn [van Oene et al., 2005; Wagenleiter, 2005; Hradsky et al., 2008], Colitis Ulzerosa [Prescott et al., 2005], Zöliakie [Rueda et al., 2005], Primär Sklerosierende Cholangitis [Viken et al., 2005], primäre biliäre Zirrhose [Milkiewicz et al., 2006], Hashimoto Thyreoiditis und Morbus Addison spielt der Polymorphismus allerdings keine pathogenetische Rolle. Im Jahr 2006 wurde dazu eine Metaanalyse durchgeführt, die 29 Studien beinhaltet. Diese bestätigt die oben genannten Ergebnisse [Lee et al., 2007]. Generell lässt sich sagen, dass der SNP mit den AIE assoziiert ist, bei denen Autoantikörper zirkulieren.

Bei dem untersuchten *PTPN22*-Polymorphismus handelt es sich um einen SNP an der Position 1858. Anstelle von Cytosin findet sich die Base Tyrosin. Dies hat einen Austausch von Arginin in Tryptophan innerhalb des *PTPN22*-Proteins zur Folge. Die *PTPN22* 1858\*C/T Substitution liegt in einer von vier Prolinreichen SH3-Bindungsstellen des Proteins und führt dazu, dass LYP nicht an die Tyrosinkinase Csk bindet [Bottini et al., 2004]. Dadurch kommt es zu einer

verstärkten intrinsischen Phosphatasenaktivität. Es entstand die Hypothese, dass die verstärkte intrinsische Phosphatasenaktivität zu einer geringeren T-Zell-Rezeptor-Inhibition und dadurch zu einer steigenden T-Zell-Aktivierung führen würde [Begovich et al., 2004]. Neuere Studien zeigen, dass das *PTPN22 T-Allel* einen gesteigerten inhibitorischen Effekt des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs bewirkt [Vang et al. 2005]. Stimulierte T-Zellen, die das *PTPN22 T-Allel* aufweisen, zeigen eine geringere Calciummobilisation und IL-10-Konzentration als T-Zellen mit *PTPN22 C-Allel* [Rieck et al., 2007]. Ebenso wird das Verhältnis von Memory-T-Zellen zu naiven T-Zellen zu Gunsten der Memory-T-Zellen in heterozygoten Personen, die ein *PTPN22 T-Allel* aufweisen, im Vergleich zu *PTPN22 C-Allel* homozygoten Trägern, verschoben [Rieck et al., 2007].

LYP wird nicht nur in T- sondern auch in B-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert. So findet sich auch eine geringere Calciummobilisation in Memory-B-Zellen von Personen, die das T-Allel aufweisen [Rieck et al., 2007].

Da sich die *PTPN22 1858\*C/T* Substitution nur sehr selten in asiatischen Populationen findet, spielt der *PTPN22*-Polymorphismus bei dortigen AIE keine Rolle. Außerdem kommt diese Variante auch häufig in den gesunden Kontrollproben z.B. in 10 % der gesunden Probanden einer U.S. Kohorte vor [Velaga et et., 2004].

### **2.2.3 Fragestellung**

Die *PTPN22 1858\*C/T* Substitution wurde als pathogenetischer Faktor für mehrere AIE nachgewiesen.

Es wird untersucht, ob MG ebenfalls mit dem *PTPN22* SNP 1858T assoziiert ist. Desweiteren soll eine mögliche Assoziation mit Subphänotypen (definiert durch das Vorhandensein eines Thymoms oder dem Antikörperstatus) der MG untersucht werden. Eine mögliche Assoziation wurde vor kurzem in französischen MG Patienten [Vandiedonck et al., 2006] und desweiteren in einer schwedischen Studie [Lefvert et al., 2008] unterstützt.

## **2.3 Multiple Sklerose / Malaria und der Neutrophil cytosolic factor 1**

### **2.3.1 Multiple Sklerose**

#### **2.3.1.1 Definition**

Bei der MS handelt es sich um eine chronisch entzündliche AIE des Zentralnervensystems, die sich meist im frühen Erwachsenenalter manifestiert. Genetische und Umweltfaktoren beeinflussen die Entstehung der MS. Es kommt zu entzündlich-entmarkenden Läsionen im zentralen Nervensystem. Deren Polytopie spiegelt sich in einem zumeist ausgeprägt heterogenen Krankheitsbild wider. Durch eine große Symptom- bzw. Befundvielfalt kommt es häufig zu differentialdiagnostischen Schwierigkeiten.

#### **2.3.1.2 Epidemiologie**

Bei MS handelt es sich um die häufigste im jungen Erwachsenenalter auftretende neurologische Erkrankung. Weltweit sind ca. 1,2 Millionen Menschen an MS erkrankt, davon ca. 100.000-120.000 in Deutschland [Hein et al., 2000]. Die Inzidenz in Deutschland beträgt 3,5-5 / 100.000 Einwohner pro Jahr [Flachenecker et al., 2005].

Frauen haben ein 1,9-3,1fach erhöhtes Risiko als Männer an MS zu erkranken [Fernald et al., 2005]. Die Prävalenz ist in äquatornahen Breitengraden extrem gering, während sie mit Äquatorferne immer weiter ansteigt, in Mitteleuropa findet man eine Prävalenz von 30-60 / 100.000 Einwohner [Lauer, 1994] und in Nordeuropa eine Prävalenz von > 100 / 100.000 Einwohner [Gold et al., 2004].

Bei erstgradig Verwandten Erkrankter liegt das Erkrankungsrisiko 20-40mal höher als in der Normalbevölkerung. Die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen beträgt 35 % [Robertson et al., 1996]. Dies spiegelt den genetischen Einfluss in der Ätiologie der Erkrankung wider.

Migrationsstudien haben gezeigt, dass bei einer Migration vor dem 15. Lebensjahr das Erkrankungsrisiko des Zuzuglandes übernommen, bei Migration nach dem 15. Lebensjahr das Erkrankungsrisiko des Ausgangslandes beibehalten wird [Gale et al., 1995].

### **2.3.1.3 Krankheitsbild**

Zur Auslösung der Symptome von MS kommt es durch Demyelinisierungen mit Leitungsverlangsamung, Leitungsblöcken oder axonalen Schäden [Gold et al., 2004]. Meist kommt es zum Ausbruch der ersten Symptome zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr. Zu den typischen Initialsymptomen, die bei mehr als 40 % der MS-Patienten auftreten, gehören Sehstörungen, Lähmungen, Sensibilitäts- und Koordinationsstörungen [Poser et al., 1979]. Im weiteren Verlauf kommt es bei ca. 60 % der Patienten zu urologischen Störungen und bei ca. 50 % zu neuropsychologischen Auffälligkeiten, wie z.B. Aufmerksamkeits- und Informationsverarbeitungsstörungen [Rao et al. 1991a und b]. Welche Symptome entstehen, hängt von der Lokalisation der Läsionen im zentralen Nervensystem ab. Bei Kleinhirnläsionen kann die Charcot-Trias beobachtet werden, die sich aus Intentionstremor, Nystagmus und skandierender Sprache zusammensetzt.

Bei Befall sensibler Bahnen können neuralgieforme Schmerzen und Parästhesien auftreten, z.B. eine Trigeminalneuralgie. Ein Befall motorischer Bahnen imponiert durch Lähmungen. Die Patienten können auch depressive Symptome entwickeln [Sadovnick et al. 1996].

### **2.3.1.4 Verlaufsformen**

Man unterscheidet einen initial schubförmigen von einem chronisch progredienten Verlauf der MS.

Bei ca. 85 % der Patienten beginnt die MS mit einem schubförmig remittierenden Verlauf, bei dem sich Phasen der klinischen Verschlechterung, Remission und Stabilität ablösen [Thompson et al., 1997].

Bei einem Schub handelt es sich um akute, ohne assoziierte Infekte oder Fieber auftretende neurologische Ausfälle, bzw. Verschlechterung vor-bestehender Symptome, die mindestens 24 h lang anhalten [Gold et al., 2004]. Den Symptomen muss eine entzündlich-entmarkende Schädigung des zentralen Nervensystems zugrunde liegen. Zwischen zwei Schüben müssen definitionsgemäß mindestens 30 Tage liegen. Die durchschnittliche Schubdauer beträgt einige Tage bis wenige Wochen. Nach der Verschlechterung kann es zur kompletten Rückbildung oder einer Teilremission der Symptome kommen. In 30-50 % der Fälle mit schubförmigen Verlauf gehen diese innerhalb von zehn Jahren in einen sekundär chronisch progredienten Verlauf über [Weinshenker et al., 1989].

Beim chronisch progredienten Verlauf der MS kommt es definitionsgemäß zu einer mehr oder weniger rasch zunehmenden Verschlechterung des neurologischen Zustands ohne dass es zu Remissionen kommt. Es wird dabei eine kontinuierliche Verschlechterung der Symptome über mindestens sechs Monate gefordert [Gold et al., 2004].

Neben den bisher genannten Verlaufsformen gibt es fulminante Verlaufsformen, wie z.B. die Marburg-Variante der MS und die Neuromyelitis optica (Devic Syndrom).

### **2.3.1.5 Diagnosekriterien**

2001 wurden die McDonald-Kriterien von einem internationalen Expertengremium zur Diagnose der MS vorgeschlagen, die sowohl klinische und bildgebende Befunde (Magnetresonanztomographie (MRT)) beinhaltet [McDonald et al., 2001]. Paraklinische Befunde wie Liquordiagnostik und evozierte Potentiale wurden ebenfalls berücksichtigt, jedoch hatten diese gegenüber bildgebenden Befunden weniger Gewicht. 2005 wurden die McDonald-Kriterien überarbeitet, um ihre Empfindlichkeit und Spezifität zu verbessern [Polman et al., 2005]. Der Vorteil der revidierten McDonald-Kriterien liegt in der erleichterten Diagnosestellung der MS. Eine MS kann aufgrund bildgebender Befunde nun auch bei Vorliegen nur eines klinischen Ereignisses

diagnostiziert werden, wenn eine zeitliche und räumliche Dissemination der Läsionen z.B. bildgebend nachweisbar ist (vgl. Tabelle 2). Zur Diagnose der MS müssen differentialdiagnostisch ähnliche Krankheitsbilder (z.B. Kollagenosen, Vaskulitis, Borreliose oder Sarkoidose) ausgeschlossen sein. Eine MS liegt vor, wenn die Kriterien erfüllt sind und keine bessere Erklärung für die klinischen Symptome bestehen. Eine mögliche MS liegt vor, wenn der Verdacht besteht, die Kriterien jedoch nicht vollständig erfüllt sind.

**Tabelle 2:** revidierte diagnostische Kriterien der Multiplen Sklerose [nach Polman et al., 2005]

Klinische Präsentation	Zusätzliche Parameter, die für eine MS-Diagnose benötigt werden
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Zwei oder mehr Schübe</li> <li>* Zwei oder mehr objektivierbare klinisch evidente Läsionen</li> </ul>	Keine; klinische Evidenz ist ausreichend
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Zwei oder mehr Schübe</li> <li>* Eine objektivierbare klinisch evidente Läsion</li> </ul>	Disseminierung im Raum, Nachweis durch: <ul style="list-style-type: none"> <li>* MRT</li> <li>* oder ein positiver Liquorbefund plus zwei oder mehr MS-typische MRT-Läsionen</li> <li>* oder Abwarten eines weiteren Schubes, der durch eine Läsion an einer anderen Lokalisation verursacht ist</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Ein Schub</li> <li>* Zwei oder mehr objektivierbare klinisch evidente Läsionen</li> </ul>	Disseminierung in der Zeit, Nachweis durch: <ul style="list-style-type: none"> <li>* MRT</li> <li>* oder zweiten klinischen Schub</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Ein Schub</li> <li>* Eine objektivierbare klinisch evidente Läsion (monosymptomatische Präsentation, klinisch isoliertes Syndrom)</li> </ul>	Disseminierung im Raum, Nachweis durch: <ul style="list-style-type: none"> <li>* MRT</li> <li>* oder positiver Liquorbefund plus zwei oder mehr MS-bedingte MRT-Läsionen</li> </ul> <b>und</b> Disseminierung in der Zeit, Nachweis durch: <ul style="list-style-type: none"> <li>* MRT</li> <li>* oder zweiten klinischen Schub</li> </ul>
Schleichende neurologische Progression (PP-MS)	Kontinuierliche klinische Progression (retrospektiv oder prospektiv bestimmt) über ein Jahr <b>und</b> zwei der folgenden Punkte treffen zu: <ul style="list-style-type: none"> <li>* positive MRT des Gehirns (neun T2-Läsionen oder vier oder mehr T2-Läsionen mit positivem visuell evoziertem Potential)</li> <li>* positive MRT des Rückenmarks (zwei oder mehr T2-Läsionen)</li> <li>* positiver Liquorbefund</li> </ul>

### Legende zu Tabelle 2:

- Ein positiver MRT-Befund liegt vor, wenn drei der folgenden Kriterien zutreffen:
  - o eine Gadolinium-anreichernde Läsion oder neun hyperintense Läsionen im T2-gewichteten Scan (sofern keine Gadolinium-anreichernde Läsion vorhanden ist)
  - o mindestens eine infratentorielle Läsion
  - o mindestens eine juxtakortikale Läsion
  - o mindestens drei periventrikuläre Läsionen
- Ein positiver Liquorbefund ist definiert als ein Vorliegen von oligoklonalen Banden im Liquor (aber nicht im Serum) oder als ein erhöhter IgG-Index
- Der Nachweis einer zeitlichen Dissemination muss eine der folgenden Kriterien erfüllen:
  - o Nachweis von Gadolinium-Anreicherung frühestens drei Monate nach dem Beginn des ersten klinischen Ereignisses, allerdings nicht an der Stelle, die mit dem ersten Ereignis korrespondiert (und damit diese Läsion für das ursprüngliche klinische Ereignis verantwortlich gemacht werden kann)
  - o Nachweis einer neuen T2 Läsion die zu einem beliebigen Zeitpunkt auftritt, im Vergleich zu einem Referenzscan, der mindestens 30 Tage nach Beginn des ersten klinischen Ereignisses aufgetreten ist
- Positive visuell evozierte Potentiale: Latenzverzögerung bei gut erhaltenem Potentialverlauf

### 2.3.1.6 Prognose

Meist kommt es im natürlichen Verlauf zu einem Rückgang der klinischen Schubrate [Matthews, 1991]. In den ersten Jahren haben die MS-Patienten ca. 1,8 Schübe pro Jahr, diese Zahl nimmt in den folgenden Jahren bis zu 80% ab [Weinshenker et al., 1987].

In den meisten Fällen bildet sich der überwiegende Teil der Symptome eines Schubes in den ersten vier Wochen zurück, länger als drei Monate bestehende Symptome haben eine geringe Rückbildungstendenz, nach sechs Monaten gibt es in 95 % der Fälle ein permanentes Defizit [Ellison et al., 1994].

Ungünstige prognostische Zeichen sind ein später Krankheitsbeginn und frühe motorische oder zerebelläre Zeichen [Poser et al., 1986], eine rasche initiale Schubfolge, eine lange Dauer des Schubes, eine schlechte Rückbildung nach den ersten Schüben und initial multiple MRT-Läsionen [Brex et al., 2002].

Günstige prognostische Zeichen sind eine erhaltene Gehfähigkeit, ein Alter < 35 Jahre bei Beginn der Erkrankung, ein monosymptomatischer Beginn, eine kurze Dauer des letzten Schubes und das Auftreten ausschließlich sensibler Symptome [Phadke, 1990; Runmarker et al., 1993; Runmarker et al., 1995, Gold et al., 2004].

Zu einer vorzeitigen Berentung kommt es bei ca. 33 % der Erkrankten [Flachenecker et al., 2005].



### **2.3.1.7 Pathogenese**

Bei der heute vorherrschenden Sichtweise über die Entstehung der MS handelt es sich um ein heterogenes Krankheitskonzept. Die MS ist eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung, die sowohl die weiße Substanz wie auch den Kortex betreffen kann [Bo et al., 2003; Dehmeshki et al., 2003; Albert et al., 2007]. Kortikale Läsionen kommen vor allem bei Patienten mit progressiv verlaufender MS vor [Kutzelnigg et al., 2005]. Der Durchmesser der Läsionen schwankt zwischen einem Millimeter und mehreren Zentimetern. Typisch sind periventrikuläre Entmarkungsherde und radial nach außen angeordnete Läsionen, die dem Verlauf der Blutgefäße folgen. Es kommt zur perivenösen Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen ins Hirnparenchym. In den Läsionen kommt es zur Aktivierung von Makrophagen und Mikroglia. Es findet sich eine Demyelinisierung mit verschiedenen Stadien der Remyelinisierung, ein Axonverlust und eine Gliose mit Proliferation von Astrozytenfortsätzen.

Im frühen Krankheitsverlauf der schubförmigen MS treten akute axonale Schäden auf, wahrscheinlich als Folge der Demyelinisierung. Diese werden dabei aber häufig durch die Plastizität des Nervensystems kompensiert [Kuhlmann et al., 2002]. Die Entstehung von axonalem Schaden ist für die progrediente Behinderung von MS-Patienten entscheidend.

In der weißen Substanz des Rückenmarks von MS-Patienten mit sekundär progressivem Verlauf kann stellenweise eine Reduktion der Axondichte von bis zu 57 % nachgewiesen werden, wobei sich das Rückenmark in konventionellen Röntgenaufnahmen unauffällig darstellt [Lovas et al., 2000]. Die indirekte Messung der axonalen Schädigung mittels MRT in MS-Patienten korreliert mit dem Ausmaß neurologischer Funktionseinschränkung [de Stefano et al., 2001]. Ein weiterer Vorhersageparameter für eine neurologische Funktionseinschränkung ist eine generelle Hirnvolumenminderung, die höchstwahrscheinlich den Verlust von Axonen widerspiegelt [Zivadinov et al., 2004].

Ein direkter zytotoxischer Angriff auf Axone wird u.a. als Pathogenese diskutiert [Neumann et al. 2002].

Bei einem Entstehungsmodell der entzündlichen Läsionen kommt es zu einer Aktivierung von potentiell pathogenen T-Lymphozyten im peripheren Immunsystem, z.B. im Rahmen einer Infektion. Lymphozyten und Makrophagen [Prineas et al., 1978; Lucchinetti et al., 1996; Hafler, 2004] dringen, manchmal zusammen mit Antikörpern und Komplement [Genain et al., 1999; O'Connor et al., 2005], ins Nervensystem ein und bringen eine Entzündungsreaktion in Gang. Üblicherweise jedoch werden die Antikörper lokal im zentralen Nervensystem von B-Lymphozyten gebildet. Die Entzündung wird durch Apoptose im Nervensystem terminiert. Die Mikroglia ist für zentrale Abräumreaktionen der apoptotischen Fragmente zuständig.

Folgende potentielle Autoantigene im zentralen Nervensystem werden diskutiert: Proteolipidprotein, Basisches Myelinprotein, Myelin-assoziiertes Glykoprotein, Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein [Egg R et al. 2001], Protein-S-100, Zyklonukleotidphosphodiesterase.

Einige Ergebnisse sprechen dafür, dass zum Teil die Entzündungen nicht der primäre pathogenetische Faktor sondern die Folge einer primären Oligodendrozyten- oder Neuronenschädigung sein könnte. So wurde in einer Studie von neu entstehenden Läsionen in einem Teil der Patienten keine oder nur eine geringe Lymphozyteninfiltration beobachtet [Barnett et al., 2004]. In einer weiteren Studie wurde in Läsionen der grauen Substanz ein deutlich geringeres Ausmaß an eingewanderten Entzündungszellen, verglichen mit Läsionen der weißen Substanz, beobachtet [Peterson et al., 2001]. Diese Ergebnisse führen zur Hypothese, dass es sich bei Unterformen der MS um eine primär neurodegenerative Erkrankung handeln könnte.

Initial wurde berichtet, dass MS mit bestimmten humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) der Klasse I assoziiert sei [Bertrams et al., 1972; Naito et al., 1972]. Spätere Studien zeigten, dass das HLA-DR2-Allel der Klasse II viel stärker mit MS assoziiert ist [Compston et al., 1976; Haines et al., 1998]. In einer Studie mit kaukasischen Familien, die an MS erkrankten, zeigte sich, dass

das HLA-DR2-Allel mit einer frühen klinischen MS-Manifestation assoziiert ist [Barcellos et al., 2002].

In einer genomweiten Assoziationsstudie bei MS-Patienten aus Großbritannien und den Vereinigten Staaten von Amerika wurden zwei SNPs im Interleukin-2-Rezeptor- $\alpha$ -Gen, ein SNP im Interleukin-7-Rezeptor- $\alpha$ -Gen und mehrere SNPs im HLA-DRA-Lokus auf Chromosom 6p entdeckt, die hochsignifikant mit MS assoziiert sind [Hafler et al., 2007]. In einer weiteren genomweiten Assoziationsstudie bei MS-Patienten aus Spanien und einer Replikationskohorte von MS-Patienten aus den Vereinigten Staaten von Amerika [Comabella et al., 2008] konnte die Assoziation des HLA-Lokus auf Chromosom 6 repliziert werden. Es zeigten sich weitere Assoziationen von SNPs mit MS. Der SNP mit der nächstgrößten Assoziation befindet sich in einer unkommentierten Region von Chromosom 13. Die jeweilige Odds Ratio (OR) der SNPs in den genomweiten Assoziationsstudien kann interessanterweise jedoch nur einen Bruchteil des genetisch vererbten Risikos erklären. Es weist kein Gen, abgesehen vom MHC II, eine überproportional wichtige Rolle bei der Entstehung der MS auf.

Eine Übertragung im Sinne der Infektiosität konnte mittels Adoptionsstudien einer kanadischen Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden [Ebers et al., 1995].

### **2.3.1.8 Diagnostik**

#### ***2.3.1.8.1 Liquordiagnostik***

Bei ca. einem Drittel der MS-Patienten findet sich eine erhöhte Zellzahl im Liquor, dabei handelt es sich meist um eine lymphozytäre Pleozytose (zw. 5-50 pro  $\mu$ l). Meist sind dabei die CD4 positiven T-Helferzellen erhöht. Im Verlauf der MS gibt es einen Trend zur Abnahme der Entzündungszellen im Liquor. Es kommen oligoklonale Immunglobulin-G-Banden im Liquor, aber nicht im Serum, bei > 90 % der Patienten vor. Trotz dieser häufigen Befunde liefert der Liquor keine relevanten Parameter für die Prognose [Gold et al., 2004].

#### ***2.3.1.8.2 Elektrophysiologische Diagnostik***

Bei visuell, akustisch, somatosensibel und motorisch evozierten Potentialen kann sich eine Verzögerung der Reizantwort zeigen.

#### ***2.3.1.8.3 Kernspintomographie***

Typisch ist das Auftreten hyperintenser Läsionen im T2-gewichteten Bild mit periventrikulärer als auch infratentorieller Lokalisation. Das MRT kann durch den Einsatz von Gadolinium alte, nicht gadoliniumaufnehmende und floride, gadoliniumaufnehmende Läsionen, unterscheiden und macht es damit möglich, die Dissemination der MS im Zeitverlauf darzustellen [Heun et al. 1988; Miller et al. 1993]. Bei über 95 % der Patienten mit definitiver MS können Läsionen in der weißen Substanz dargestellt werden, wobei davon ausgegangen wird, dass nur ca. 20 % der Läsionen im kranialen Kernspintogramm mit Symptomen beim Patienten einhergehen [Gold et al., 2004].

#### ***2.3.1.8.4 Skalen zur Abschätzung der Behinderung***

Das Ausmaß des neurologischen Defizits wird durch die "Expanded Disability Status Scale" (EDSS) [Kurtzke, 1983] bzw. den Multiple Sclerosis Functional Composite Score [Rudick et al., 2002] objektiviert.

#### **2.3.1.9 Therapie**

Die Hauptziele der Behandlung bestehen in einer Reduktion der entzündlichen Krankheitsaktivität und einer Stabilisierung der funktionellen Einschränkung auf niedriger Behinderungsstufe sowie einer stadiengerechten optimalen Behandlung von krankheitsassoziierten Symptomen.

Zur Behandlung der schubförmigen MS stehen Glukokortikoide, Interferon- $\beta$ 1a [Cohen et al. 2001] und Interferon- $\beta$ 1b [Goodkin D, 2000], Glatirameracetat (Copolymer-1) [Comi et al., 2001], intravenöse Immunglobuline (IVIg) [Achiron

et al., 1998] und Immunsuppressiva wie z.B. Natalizumab, Mitoxantron [Cursiefen et al., 2000], Azathioprin [Yudkin et al., 1991] oder Cyclophosphamid [Comabella et al., 1998] zur Verfügung.

Nach der Immunmodulatorischen Stufentherapie werden als Basistherapeutika Interferon- $\beta$  oder Glatirameracetat eingesetzt. Azathioprin und IVIg dienen als Reservetherapeutika oder einer speziellen Indikationsstellung. Bei Eskalation sollte auf Natalizumab, Mitoxantron oder Cyclophosphamid umgestellt werden.

Interferonpräparate verzögern bereits bei Gabe nach dem ersten MS-verdächtigen Ereignis die Zeit bis zum Auftreten weiterer Schübe und die Krankheitsprogression im MRT [Jacobs et al., 2000; Comi et al., 2001a]. Bei Interferonpräparaten treten zu Beginn der Behandlung häufig grippeähnliche Symptome wie Fieber, Schüttelfrost oder Myalgien auf.

Auch bei Glatirameracetat findet sich eine Reduktion der Schubrate [Johnson et al., 2000] und eine Reduktion entzündlicher Läsionen im MRT [Comi et al., 2001b]. Es zeigt sich eine ähnliche Reduktion der Schubrate wie bei Interferonpräparaten [Khan et al., 2001].

Azathioprin wird auf Grund unbefriedigender Studienlage nur als Reservepräparat in der Basistherapie der schubförmigen MS [Goodin et al., 2002], bei Koinzidenz von MS mit anderen AIE oder bei Unverträglichkeit von Interferon verabreicht.

IVIg werden bei Unverträglichkeit oder Kontraindikationen der anderen Therapeutika eingesetzt, haben aber derzeit noch keine Zulassung für MS. Auch IVIg verringern nach dem ersten Schub die Zeit bis zum Auftreten weiterer Schübe und reduzieren entzündliche Läsionen, die im MRT nachgewiesen werden [Achiron et al., 2004].

Seit neuerer Zeit kann Natalizumab als Monotherapie angewandt werden. Bei Natalizumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen die  $\alpha$ 4-Integrine der Leukozyten. Durch Natalizumab kann die Adhäsion und Transmigration der Leukozyten ins Gewebe verhindert werden. Es resultiert eine Reduktion der Schubrate, der Gadoliniumläsionen und neu auftretender T2-Läsionen im MRT [Polman et al., 2006]. Jedoch kommt es unter Behandlung mit Natalizumab in seltenen Fällen zu einer progressiven multifokalen

Leukoenzephalopathie, die durch den JC-Virus ausgelöst wird [Langer-Gould et al., 2006]. Die Durchseuchungsrate der Bevölkerung mit dem JC-Virus beträgt 70-90 % [Padgett et al., 1973]. Das Risiko eine progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie unter achtzehnmonatiger Natalizumab-therapie zu entwickeln wird mit 0,1 % angegeben. Die Langzeitriskien sind jedoch noch nicht bekannt [Yousry et al., 2006].

Die Therapie der Wahl für einen akuten MS-Schub ist eine Hochdosis-Kurzzeitpulstherapie mit Prednisolon oder Methylprednisolon [Miller DM et al. 2000].

Bei der primär-progredienten Verlaufsform der MS ist bisher keine gesicherte immunmodulatorische Therapie bekannt. Eine Interferon- oder Glatirameracetat-Therapie zeigt bei der primär-progredienten Verlaufsform der MS keine Reduktion der Progression. Es werden repetitive Glukokortikoid-Pulstherapien empfohlen [www.dgn.org].

Zur Zeit befindet sich Fingolimod, ein sogenanntes „small molecule“, zur Hemmung der Zellmigration in der Phase III zur Zulassung für schubförmige MS. Fingolimod reduziert die MRT-Läsionen und die Krankheitsaktivität von MS-Patienten [Kappos et al., 2006]. Der Vorteil an Fingolimod ist, dass es sich um eine orale Therapie handelt.

Wegen der Heterogenität der MS-Krankheitsentstehung lassen sich nicht alle Patienten mit oben aufgeführten Mitteln zufriedenstellend im Sinne einer Schubratenverringernug und Läsionsreduktion im MRT behandeln.

## **2.3.2 Malaria**

### **2.3.2.1 Definition**

Malaria ist eine Infektionskrankheit, die durch verschiedene Plasmodienarten ausgelöst wird. Für den Menschen relevant, da humanpathogen, sind *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale*. Malaria tropica wird durch *Plasmodium falciparum*, Malaria quartana durch *Plasmodium malariae* und Malaria tertiana durch *Plasmodium vivax* und *Plasmodium ovale* ausgelöst. Alle genannten Plasmodienarten werden durch die weiblichen Anopheles-Mücken übertragen. Die meisten Infektionen werden durch den Erreger *Plasmodium falciparum* verursacht.

### **2.3.2.2 Epidemiologie**

Die Malaria ist die häufigste Tropenkrankheit, an der nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) weltweit jährlich zwischen 300 und 500 Millionen Menschen erkranken. Etwa 40 % der Weltbevölkerung leben in Malariagebieten. 90 % der Erkrankten leben in Afrika südlich der Sahara. Die meisten Malariafälle davon werden durch *Plasmodium falciparum* verursacht [Kayser et al., 2005]. 1,5-2,7 Millionen Menschen sterben nach Angaben des Robert-Koch-Instituts in Berlin weltweit jährlich an Malaria, darunter eine Million Kinder in Afrika. In Mitteleuropa tritt Malaria im Rahmen einer Reisekrankheit auf.

### **2.3.2.3 Entwicklungszyklus des Parasiten**

Innerhalb des Entwicklungszyklus der Plasmodien findet ein Generationswechsel und ein obligater Wirtswechsel statt. Die weibliche Anophelesmücke (Familie der Culicidae) überträgt die Plasmodien als spindelförmige Sporozoiten auf den Menschen, wo sie nach kurzem Aufenthalt in der Blutbahn in das Leberparenchym eindringen. Zur Infizierung reichen dabei schon zehn

Sporozoiten aus. In den Leberparenchymzellen vermehren sie sich ungeschlechtlich durch Teilung (Schizogonie) und bilden präerythrozytäre Schizonten. Diese Schizonten zerfallen und gelangen als Merozoiten wieder in die Blutbahn, wo sie in Erythrozyten eindringen. Im Erythrozyten bilden die Merozoiten sogenannte Ringformen bzw. Trophozoiten. Diese vermehren sich dort durch Zellteilung und bilden Schizonten. Diese rupturieren und entlassen Merozoiten ins Blut. Bei *Plasmodium falciparum* finden sich ca. 6-36 Merozoiten in einem Schizonten. Die Merozoiten befallen wiederum Erythrozyten und der Kreislauf der Plasmodienvermehrung beginnt von vorn. Einige Merozoiten differenzieren sich zu männlichen Mikro- bzw. zu weiblichen Makrogametozyten. Diese werden durch eine Mücke aufgenommen, bilden dort durch Vermehrung Sporozoiten und können sich so auf einen weiteren Organismus verbreiten [Kayser et al., 2005].

#### **2.3.2.4 Krankheitsbild**

Man muss hier zwischen Menschen unterscheiden, die schon einmal an einer Malaria litten und somit eine gewisse Immunität entwickelten [MacDonald, 1957] und denen, die zum ersten Mal daran erkranken.

Im Falle einer Infektion erkranken die Menschen mit dem positiven Immunitätsstatus nur milde und oft sogar asymptomatisch an der Malaria. Sie entwickeln Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Fieber, Bauchschmerzen, Erbrechen und Durchfall.

Bei den Ersterkrankten mit negativem Immunitätsstatus unterscheidet man zwischen einer einfachen und einer komplizierten Verlaufsform.

Laut Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) [www.dtg.org] ist die Malaria als kompliziert einzustufen wenn eines der Symptome wie Bewusstseinsintrübung, zerebraler Krampfanfall, respiratorische Insuffizienz, unregelmäßige Atmung, Hypoxie, Hypoglykämie (BZ < 40 mg/dl), Schocksymptomatik, Spontanblutungen, Azidose (base deficit > 8 mmol/l), Hyperkaliämie (> 5,5 mmol/l), Ikterus, Niereninsuffizienz, Transaminasenerhöhung, Ikterus (Bilirubin > 3 mg/dl) oder



Hyperparasitämie (> 5% der Erythrozyten von Plasmodien befallen oder > 100000 Plasmodien/ $\mu$ l) besteht.

### **2.3.2.5 Therapie**

Zunehmende Resistenzen der Erreger erschweren die Therapie der Malaria. Nach den aktuellen Therapieleitlinien der deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit e.V. [[www.dtg.org](http://www.dtg.org)] werden eine Malaria tertiana und Malaria quartana mit Chloroquin oral behandelt, bei Herkunft des Patienten aus Indonesien oder der Pazifikregion soll die Malaria tertiana wegen möglicher Chloroquin-Resistenz mit Mefloquin behandelt werden.

Die unkomplizierte Malaria tropica wird, falls keine Chloroquinresistenz besteht, mit Chloroquin oral behandelt (zur Zeit nur Mittelamerika inkl. Haiti und Dominikanische Republik). Bei Chloroquin-Resistenz startet man eine orale Therapie mit Mefloquin oder Atovaquon/Proguanil oder Artemether/Lumefantrin. Das Mittel der Wahl bei der komplizierten Malaria tropica ist Chinin. Alternativ kann die Gabe von Artesunat erwogen werden. Die Behandlung der komplizierten Malaria tropica sollte falls möglich auf einer Intensivstation erfolgen [[www.dtg.org](http://www.dtg.org)].

### **2.3.3 Reaktive Sauerstoffmetabolite**

Die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS) ist Teil der angeborenen Immunabwehr gegen Pathogene [Rosen, Pou et al., 1995]. Ebenso sind sie an Signalwegen der Zelle beteiligt [Katama und Hirata, 1999] und können auch bei Krankheiten, wie z.B. beim Katarakt, der Atherosklerose, dem M. Parkinson, an Reperfusionsschäden und an Schockzuständen [Elstner, 1991] involviert sein. Während einer aktiven Malaria können ROS, die von Monozyten und Makrophagen gebildet werden, zu einer besseren Parasitenbekämpfung beitragen, führen dabei aber auch zu einem schwereren Krankheitsverlauf, v.a. was die begleitende Anämie betrifft [Greve et al., 1999; Greve et al., 2000]. Die

Länge eines TA-Repeats in der Promotorregion des Proteins gp91-phox beeinflusst die Promotoraktivität dieses Gens, wodurch die Aktivität der Nicotinamidadenindinucleotidphosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) reguliert wird. Die Länge dieses TA-Repeats ist assoziiert mit der Schwere von Malaria [Uhlemann, Szlezak et al., 2004].

In einem Arthritismodell in Ratten konnte nachgewiesen werden, dass eine geringere intrinsische ROS-Freisetzung sich fördernd auf die Krankheitsentwicklung auswirkt [Olofsson et al., 2003].

Bei der MS sind ROS als Mediatoren an Demyelinisierung und Axonschädigung beteiligt [Smith, Kapoor et al. 1999; Gilgun-Sherki, Melamed et al., 2004]. Ebenso wurde eine erhöhte respiratorische Antwort in Leukozyten von MS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen [Ferreti, Bacchetti et al. 2006]. Die ROS führen zu oxidativem Stress und schädigen Lipide, Proteine und Nukleinsäuren, wodurch es zur Nekrose oder Apoptose der Zellen kommt. Als oxidativer Stress wird das Missverhältniss zwischen der Produktion von ROS und der Produktion von Antioxidantien, die die Zelle selbst vor ROS schützen soll, bezeichnet. Dieser oxidative Stress kann in MS-Plaques nachgewiesen werden. So ist dort die Aktivität der freien Radikale gesteigert, während Antioxidantien wie Glutathion, Harnsäure und Alpha-Tocopherol vermindert sind [Langemann H et al., 1992]. Besonders Oligodendrozyten sind anfällig für oxidativen Stress, da sie eine relativ geringe Abwehr des oxidativen Stresses durch Antioxidantien haben. So sind untergegangene Oligodendrozyten zu einem frühen Zeitpunkt in vielen demyelinisierten MS-Läsionen anzutreffen [Bruck W et al., 1994; Prineas JW et al., 1993]. Bei an EAE erkrankten Mäusen kann gezeigt werden, dass das neurologische Defizit durch verringerte Konzentration der ROS gemindert wird [Smith KJ et al., 1999]. Eines der Schlüsselenzyme in der Produktion von ROS ist die NADPH-Oxidase, deren Mechanismus unter 2.3.4.2 genauer erläutert wird.

ROS führen zur Zerstörung von Proteinen, Veränderung von Hyaluronsäuren und Kollagen, Spaltung von Nukleinsäuren und Erhöhung der Zellmembranpermeabilität [Campbell, 1988]. Bei Bakterien wird die DNS-Synthese gehemmt [Rosen et al., 1993].

## 2.3.4 Neutrophil cytosolic factor 1

### 2.3.4.1 Definition

Beim Neutrophil cytosolic factor 1 (*NCF1*) Gen handelt es sich um ein Gen auf Chromosom 7 am Gen-Locus 7q11.23. Es kodiert für das Protein Protein47-Phagozytenoxidase (p47-phox), einem Teil der NADPH-Oxidase. Dabei handelt es sich um ein Coenzym, das an einigen Stoffwechselreaktionen als Wasserstoffdonor oder -akzeptor beteiligt ist.

Eine Mutation im *NCF1*-Gen ist zu 20 % für die Entstehung der chronischen Granulomatose, bei der die Funktion der neutrophilen Granulozyten gestört ist, verantwortlich. Die weitaus häufigste Mutation, die in 70 % der Fälle zur Entstehung der chronischen Granulomatose führt, betrifft das Glykoprotein 91-phox (gp91-phox), ebenso wie p47-phox ein Teil der NADPH-Oxidase. Die Patienten leiden gehäuft an bakteriellen Infektionen oder Pilzinfektionen, da die NADPH-Oxidase nicht mehr oder nur in geringem Maße arbeitet. Die chronische Granulomatose hat eine Inzidenz von 1 zu 200.000 Neugeborenen und wird autosomal rezessiv vererbt.

### 2.3.4.2 NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase wird durch stimulierte zur Phagozytose fähige Zellen wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen aktiviert und reduziert Sauerstoff zum Superoxidanion, während NADPH oxidiert wird. Es kommt also zu einem Elektronentransfer von NADPH zum Sauerstoffmolekül:



Das Superoxidanion bildet den Ausgangspunkt für die Bildung anderer Sauerstoffradikale. Aus Superoxid bildet sich durch Protonierung das

Hydroperoxidradikal, das mit einem anderen Superoxidanion zu Wasserstoffperoxid reagiert.

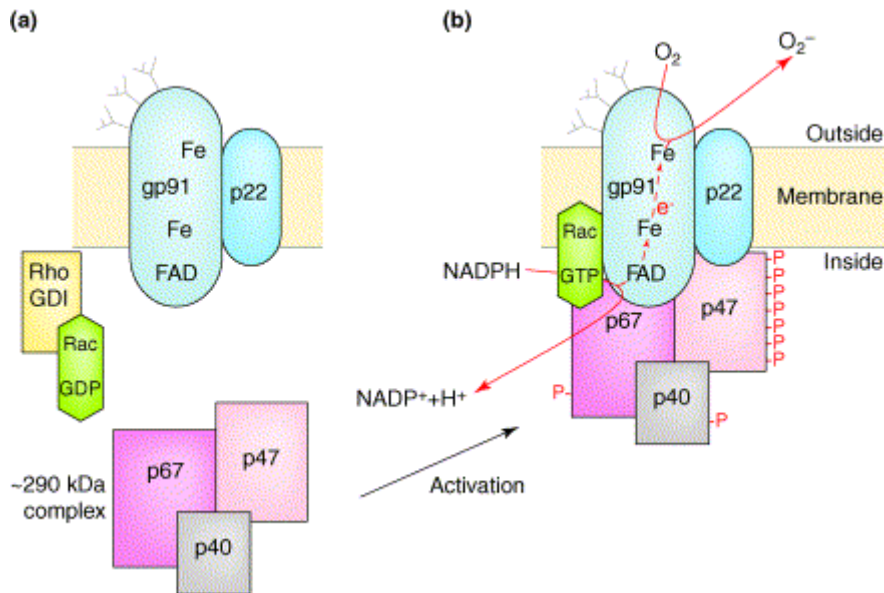
Die NADPH-Oxidase besteht aus den Proteinen CYBB (gp91-phox), CYBA (p22-phox), NCF-1 (p47-phox), NCF-2 (p67-phox) und NCF-4 (p40-phox). Die Zahlen innerhalb der Proteinnamen geben das Gewicht der Komponenten in Kilodalton an (vgl. Abb. 3).

Bei Infektionen durch Bakterien, Pilze und Viren kommt es zu einer Aktivitätssteigerung der NADPH-Oxidase, z.B. wird die NADPH-Oxidase indirekt durch Lipopolysaccharide [Frank et al., 1998] stimuliert. Aber auch durch Zytokine und Entzündungsmediatoren wie Interleukin 8 und Leukotrien B-4 oder durch Zellstimulantien wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) oder den plättchenaktivierenden Faktor wird die NADPH-Oxidase stimuliert.

#### **2.3.4.3 *NCF1*-Gen und Pseudogene**

Das Auftreten von AIE wie RA, Experimentelle Autoimmune Neuritis und EAE in Tiermodellen ist durch genetische Variationen von *Ncf1* beeinflusst. Mäuse mit einem mutierten *Ncf1*-Protein bekommen eine schwerere kollageninduzierte Arthritis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ebenso erkranken Mäuse mit mutiertem *Ncf1*-Protein stärker an Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein-induzierter EAE [Hultqvist et al., 2004; Hultqvist and Holmdahl, 2005].

Mutationen im humanen *NCF1*-Gen sind für 20 % der Fälle von septischer Granulomatose verantwortlich. Innerhalb dieser Mutationen beruhen 95 % auf einer GT-Deletion ( $\Delta$ GT) am Anfang des Exons 2. Diese GT-Deletion bewirkt einen vorzeitigen Transkriptionsabbruch.



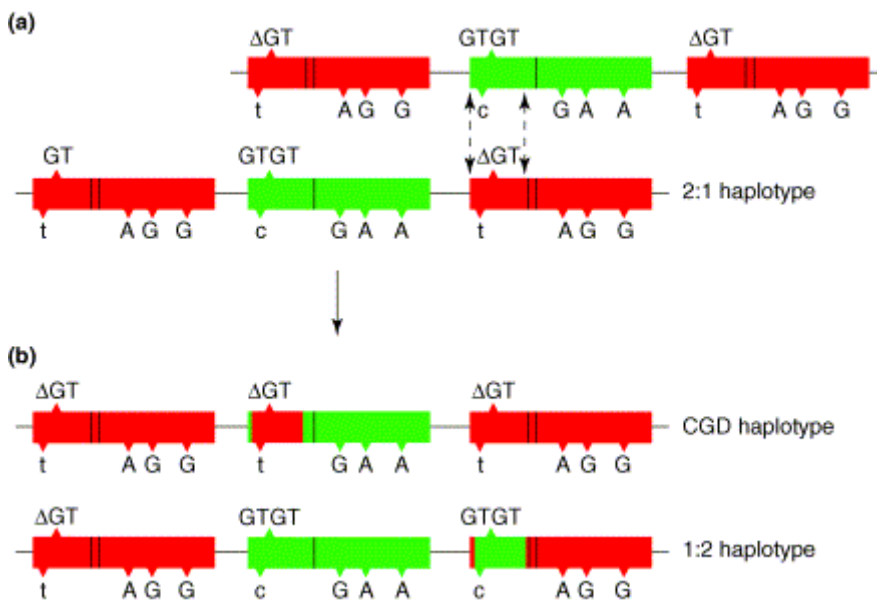
FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid  
 Fe = Eisen  
 GDI = Guanosindiphosphat dissociation inhibitor  
 GDP = Guanosindiphosphat  
 GTP = Guanosintriphosphat  
 NADPH = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat

Die NADPH-Oxidase wird bei Aktivierung aus ihren zytosolischen Einheiten p40-phox, p47-phox, p67-phox und den membranständigen Einheiten gp91-phox und p22-phox zusammengesetzt. Zur Aktivierung ist eine Interaktion zwischen p47-phox und den membranständigen Einheiten nötig. Zunächst muss sich das Rac-Protein vom Rho GDI Protein lösen und in einen mittels GTP aktivierten Zustand übertreten. Dann kann dieses in Assoziation zur Plasmamembran treten. Beim Plasmakomplex bedarf es mehrerer Phosphorylierungen, damit dieser sich mit den membranständigen Einheiten verbindet. Die aktivierte NADPH-Oxidase produziert Superoxidanionen, die in phagozytäre Vesikel bzw. in den Extrazellulärraum abgegeben werden [Heyworth et al., 2003].

**Abb. 3:** Aktivierung der NADPH-Oxidase [aus Heyworth et al. 2003]

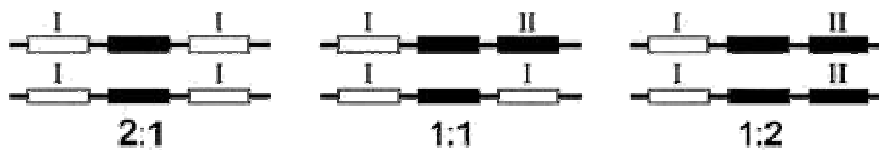
Im Genom des Menschen finden sich je zwei Pseudogene ( $\psi NCF1$ ) pro  $NCF1$ -Gen. Sie sind zu 98 % mit dem  $NCF1$ -Gen identisch und befinden sich in derselben Region 7q11.23 auf Chromosom 7 [Heyworth, Cross et al., 2003]. Man unterscheidet bei den Pseudogenen das *Typ I*  $\psi NCF1$ , welches die GT-Deletion am Beginn von Exon 2 enthält und das *Typ II*  $\psi NCF1$ , welches keine GT Deletion enthält [Heyworth, Noack et al., 2002]. In der Bevölkerung findet man meist zwei verschiedene Haplotypen, den verbreiteteren Haplotyp mit zwei Kopien von *Typ I*  $\psi NCF1$  und einer Kopie von  $NCF1$  und den weniger verbreiteteren Haplotyp mit jeweils einer Kopie von *Typ I* und *Typ II*  $\psi NCF1$  und einer Kopie des funktionellen Gens [Heyworth et al., 2002].

Das gehäufte Auftreten der  $\Delta GT$ -Mutation bei der chronischen Granulomatose lässt sich hypothetisch durch Rekombinationsereignisse zwischen  $NCF1$  und *Typ I*  $\psi NCF1$  erklären (vgl. Abb. 4). Aufgrund ihrer Nähe und ihrem hohen Grad an Ähnlichkeit könnte es öfter zu solchen Rekombinationsereignissen kommen. *Typ II*  $\psi NCF1$  entsteht wahrscheinlich bei der Rekombination zwischen  $NCF1$  und *Typ I*  $\psi NCF1$ .



**Abb. 4,** Modell eines möglichen Crossovers zwischen  $NCF1$  und *Typ I*  $\psi NCF1$  [aus Heyworth et al., 2003]

Da bei *NCF1* und *Typ II  $\psi$ NCF1* die  $\Delta$ GT-Mutation fehlt, lassen sich *NCF1* und *Typ II  $\psi$ NCF1* über die Basenanzahl des Exons 2 nicht auseinander halten. Es lassen sich Quotienten zwischen *NCF1* und *Typ II  $\psi$ NCF1* einerseits (beide ohne  $\Delta$ GT am Beginn von Exon 2) und *Typ I  $\psi$ NCF1* (mit  $\Delta$ GT am Beginn von Exon 2) andererseits bilden (vgl. Abb. 5). Man erhält einen Quotienten von 2:1 wenn im Genom vier *Typ I  $\psi$ NCF1*-Gene vorhanden sind, einen Quotienten von 1:1 bei drei *Typ I  $\psi$ NCF1* und einem *Typ II  $\psi$ NCF1* und einen Quotienten von 1:2 bei jeweils zwei Genen vom *Typ I  $\psi$ NCF1* und *Typ II  $\psi$ NCF1*. Allerdings bergen heterozygot an chronischer Granulomatose Erkrankte ein mögliches Fehlerpotential, da diese nicht durch die Quotientenbildung entdeckt werden können. Theoretisch sind auch Quotienten von 1:5 möglich.



**Abb. 5:** mögliche Genotypen von *NCF1* und  *$\psi$ NCF1* [aus Heyworth et al., 2002]

Bisher ist noch nicht geklärt, ob das *Typ II  $\psi$ NCF1* funktionell aktiv ist und sich auf die individuelle *NCF1*-Expression, die ROS-Produktion oder die Anfälligkeit für Infekte und AIE auswirkt. Falls es transkribiert wird, würde sich ein resultierendes Protein nur an zwei Aminosäurepositionen von dem Wildtyp-Protein unterscheiden und zwar an den Positionen Arg90His und Asn166Asp. In einer früheren Studie hatten neutrophile Granulozyten von Personen mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von 1:2 76 % mehr p47-phox-Protein als Individuen mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von 2:1 [Heyworth et al., 2003]. Dies könnte bedeuten, dass das *Typ II  $\psi$ NCF1* in ein p47-phox Protein translatiert wird.

#### **2.3.4.4 NCF1 und Autoimmunerkrankungen**

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im *NCF1-Gen* zu gesteigerter ROS-Produktion und stärkerer Arthritis führt [Hultqvist et al., 2005]. Beim Menschen wurde bereits bei einer kleinen Anzahl von 138 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und M. Crohn im Vergleich mit 37 gesunden Kontrollen der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotient gemessen. Dabei wurde ein höherer 1:1  $\Delta$ GT/GTGT-Quotient bei den Erkrankten festgestellt, besonders bei denen, die an Morbus Crohn litten [Harbord et al., 2003]. Dies konnte allerdings in einer größeren Studie mit 488 Patienten und 181 Kontrollen nicht repliziert werden [Suraweera et al., 2004].

#### **2.3.5 Fragestellung**

Zielsetzung der Arbeit ist erstens die Untersuchung einer möglichen Assoziation des  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit dem Auftreten von MS, zweitens zu zeigen, dass das Typ II  $\psi$ *NCF1*-Gen funktionell aktiv ist und drittens wird die mögliche Assoziation des  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit der Kapazität zur Produktion von ROS im Blut von Malariapatienten untersucht.



## **3 Material und Methoden**

### **3.1 *Myasthenia gravis* und *PTPN22***

#### **3.1.1 Patienten**

Es wurde von 134 MG-Patienten aus Deutschland und 148 MG-Patienten aus Ungarn Serum und DNS verwendet.

Als Kontrollproben wurde von 199 Probanden aus Deutschland und 180 Probanden aus Ungarn DNS verwendet.

#### **3.1.2 Material und Geräte**

##### **3.1.2.1 SNP Genotypisierung**

2fach Taqman Universal Master Mix	(Promega, Madison, USA)
20fach SNP-Genotyping-Mix	(Applied Biosystems, Foster City, USA)
Nucleasefreies Wasser	(Promega, Madison, USA)
Endotoxinfreies Wasser	(Millipore, Billerica, USA)
96-Loch-Platte	(4titude, Ockley, UK)
Pipettenspitzen	(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
PTC-200 PCR	(MJ-Research, Waltham, USA)
ABI prism 7000 sequence detection system	(Applied Biosystems, Foster City, USA)

##### **3.1.2.2 Anti-Titin-Antikörper-Elisa**

Anti-Titin-ELISA-Kit	(DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Deutschland)
----------------------	--

Pipetten	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Schüttler Vibrax VXR basic	(IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

### **3.1.2.3 Anti-AChR-Antikörper-Radioimmunoassay**

Anti-AChR-Antikörper-Radioimmunoassay-Kit	(IBL GmbH, Hamburg, Deutschland)
Pipetten	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Vortex-Mischer	(Scientific Industries, Bohemia, USA)
Zentrifuge ZK 364, Nr. 7749	(Kontron-Hermle, St. Leon-Rot, Deutschland)
Multi-Crystal-Gamma-Counter LB 2104	(Berthold Technologies GmbH & Co KG, Bad Wildbad, Deutschland)

### **3.1.3 Methoden**

#### **3.1.3.1 SNP Genotypisierung**

##### ***3.1.3.1.1 SNP-Genotyping-Mix***

Im SNP-Genotyping-Mix sind ein Forward-Primer und ein Reverse-Primer zur Amplifizierung der Zielregion und zwei TaqMan „minor groove binder“-Sonden (MGB-Sonden) zur Unterscheidung der unterschiedlichen Allele enthalten. Eine MGB-Sonde ist jeweils am 5'Ende markiert mit einer Reporterfärbung: eine VIC-Färbung und eine FAM-Färbung. Der MGB erhöht die Schmelztemperatur der Sonden. Dadurch ist es möglich kürzere Sonden einzusetzen. Die Sonde mit der VIC-Färbung ist komplementär zu Allel eins und die Sonde mit der FAM-

Färbung komplementär zu Allel zwei. Außerdem befindet sich noch ein nichtfluoreszierender Quencher am 3'Ende der Probe.

### ***3.1.3.1.2 Taqman Universal Master Mix***

Der Taqman Universal Master Mix beinhaltet die Taq-DNA-Polymerase, die die DNS verlängert, Desoxyribonukleosidtriphosphate als Bausteine zur Verlängerung der DNS und Magnesiumchlorid. Magnesiumchlorid wird benötigt um die Phosphatreste, die bei der Reaktion anfallen, ionisch auszugleichen.

### ***3.1.3.1.3 Polymerase Kettenreaktion – Prinzip***

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wird zur Vervielfältigung kurzer DNS-Stücke eingesetzt. Eine PCR besteht aus mehreren Schritten:

1. Denaturierung: Durch Erhitzen der Probe trennt sich die doppelsträngige DNS in zwei Einzelstränge.
2. Primeranlagerung: Die Primer sind ca. 20 Basenpaare lange Basensequenzen, die sich an den Anfang und das Ende der zu vermehrenden DNS-Sequenz anlagern.
3. Kettenverlängerung: Die DNS-Polymerase verlängert den Primer mit den jeweiligen komplementären Nukleotiden.

Dieser Zyklus wird nun 25-40mal wiederholt. Es kommt dabei zur exponentiellen Vermehrung der DNS.

### ***3.1.3.1.4 Genotypisierung – Prinzip***

Jede TaqMan-MGB-Sonde bindet spezifisch an eine Sequenz innerhalb des in der PCR vervielfältigten DNS-Stückes.

Bei intakter Sonde befindet sich das Farbmolekül in räumlicher Nähe zur Quencher-Färbung. Die Quencher-Färbung unterdrückt die Reporter-Färbung

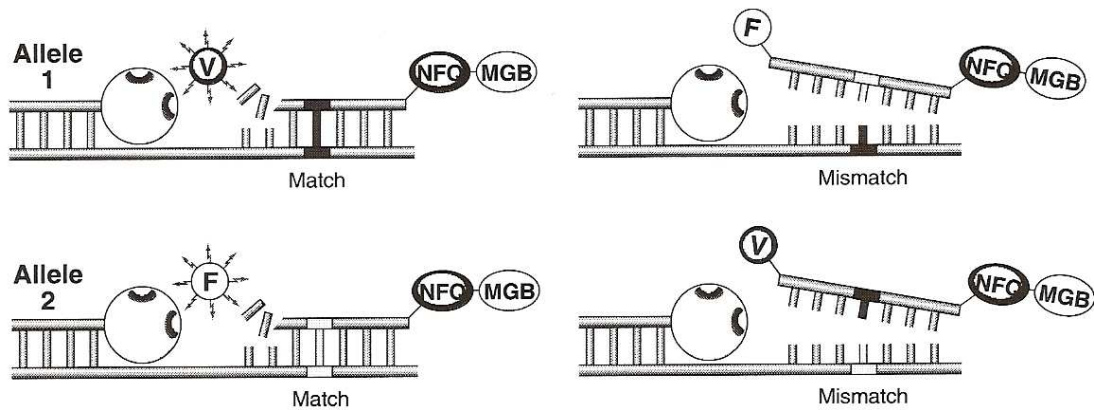
(VIC- oder FAM-Färbung) durch den „Förstertyp Energietransfer“ (Förster resonance energy transfer (FRET)).

Dieser besagt, dass ein Donor-Fluorochrom (Reporter), welches durch eine Lichtquelle angeregt wird, einen Teil seiner Energie an ein Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) abgibt. Wenn sich nun der Abstand zwischen Donor und Akzeptor vergrößert, nimmt das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab während das des Donors zunimmt.

Die Taq-DNS-Polymerase spaltet nur Sonden, die mit der DNS hybridisiert sind. Durch die Spaltung wird die Reporter-Färbung von der Quencher-Färbung getrennt, die fluoreszierende Wirkung wird verstärkt. Somit kommt es nur zum Ansteigen des fluoreszierenden Signals, wenn die amplifizierte Target-Sequenz komplementär zur Probe ist. Durch den Einsatz zweier verschiedener Donor-Fluorochrome an unterschiedlichen DNS-Sequenzen, die für die zwei Allele spezifisch sind, kann durch die Messung des Fluoreszenzsignals nun ein Rückschluss gemacht werden, welche Allele in der jeweiligen DNS enthalten sind.

Falls die Probe nicht genau zur DNS-Sequenz passt, verringert dies die Effizienz der Hybridisierung. Außerdem kann die Taq-DNS-Polymerase die Probe verlegen ohne sie zu spalten, wodurch kein fluoreszierendes Signal ausgesandt wird.

Ein VIC-Signal würde also Homozygotie für Allel 1, ein FAM-Signal für Allel 2 bedeuten. Wenn man beide Signale detektiert spricht dies für eine Heterozygotie (vgl. Abb. 6).



NFQ = nicht fluoreszierender Quencher  
MGB = minor groove binder  
V = VIC Färbung  
F = FAM Färbung

Die fluoreszierenden Sonden sind durch einen Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) unterdrückt. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNS-Strang, die Reporter-Fluoreszenz bleibt zunächst unterdrückt. Die Taq-Polymerase baut während eines PCR-Zyklus das 5' Ende der Sonde ab. Der abgespaltene Reporter ist jetzt zur Fluoreszenz befähigt und detektierbar.

**Abb. 6:** Genotypisierungsprinzip [Taqman SNP Genotyping Assays, Protocol, Applied Biosystems, [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)]

### 3.1.3.1.5 Polymerase Kettenreaktion – Durchführung

Es wurde ein 10 µl PCR-Ansatz gewählt, der aus folgenden Komponenten bestand:

- 2fach Taqman Universal Master Mix      5 µl
- 20fach SNP-Genotyping-Mix              0,5 µl
- Nukleasefreies Wasser                    3,5 µl
- DNS    1 µl

DNS-Proben aus Deutschland wurden 1:25, DNS-Proben aus Ungarn 1:10 mit endotoxinfreiem Wasser verdünnt. Die deutschen Proben wurden stärker verdünnt, da die in ihnen enthaltene DNS höher konzentriert war.

Die PCR wurde in einem Thermocycler in einer 96-Loch-Platte durchgeführt. Dabei wurde als Kontrollen eine Wasserkontrolle und eine Positiv-Kontrolle jeweils für das erste Allel, für das zweite Allel und für die Heterozygotie auf jeder Platte durchgeführt.

Zunächst wurde der Ansatz für 10 min bei 95 °C denaturiert. Dann erfolgten 40 Zyklen mit jeweils 15 sec Denaturierung bei 92 °C und 1 min Primeranlagerung und Kettenverlängerung bei 60 °C. Nach den 40 Zyklen wurden die Proben auf 4° C heruntergekühlt.

Nun wurde die Fluoreszenz in den jeweiligen Ansätzen mit dem „ABI prism 7000 sequence detection system“ gemessen.

### **3.1.3.2 Anti-Titin-Antikörper-ELISA**

#### ***3.1.3.2.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest – Prinzip***

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Zu detektierende Antikörper oder Antigene werden zunächst mit einem Enzym markiert. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens bzw. des Antikörpers.

#### ***3.1.3.2.2 Anti-Titin-Antikörper-ELISA***

Der Anti-Titin-Antikörper-ELISA ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay.

Zunächst wurden die Humansenen aufgetaut und alle Bestandteile des Kits auf Zimmertemperatur gebracht. Bei jedem Versuch wurden 100 µl eines Kalibrators, einer Positiv- und einer Negativkontrolle auf die Platte aufgebracht. Die Patientenproben wurden eins zu hundert mit dem im Kit enthaltenen Patientenprobenverdünnungspuffer verdünnt und dann ebenfalls jeweils 100 µl pro Well auf die Platte aufgebracht. Nun wurde die Platte 60 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit binden Anti-Titin-Antikörper aus den verdünnten Patientenproben an rekombinantes Titin-

Fragment (MGT30-Peptid), das auf der Oberfläche der Mikrotiterplattenvertiefungen immobilisiert ist.

Nun wurde die Platte mit dem beigefügten Waschpuffer viermal gewaschen. Dadurch werden die ungebundenen Bestandteile der Probe entfernt und nur die gebundenen Anti-Titin-Antikörper der Proben verbleiben auf der Platte.

Als nächstes wurden jeweils 100 µl von peroxidasemarkiertem Protein A beigefügt. Das peroxidasemarkierte Protein A bindet an die Anti-Titin-Antikörper, allerdings nicht an der Antigen-spezifischen Stelle. Es entsteht der Antikörper-Antigen-Protein A-Peroxidase-Komplex. Die Platte wurde erneut 30 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Platte nochmals mit dem Waschpuffer viermal gewaschen. Dadurch werden ungebundene überschüssige Bestandteile des Enzymkonjugats entfernt. Nur die Antikörper-Antigen-Protein A-Peroxidase-Komplexe verbleiben auf der Platte. Es wurden 100 µl Tetramethylbenzidin als Peroxidase-Substrat zugefügt, danach wurde die Platte 20 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Peroxidase wandelt das Tetramethylbenzidin in einen blauen Farbstoff um. Das Zufügen einer Stopplösung, in der Schwefelsäure enthalten ist, bewirkt einen Farbumschlag nach gelb. Die unterschiedliche Extinktion der Ansätze wurde nun bei 450 nm gemessen und mit Hilfe des Kalibrators nach folgender Regel ausgewertet:

$$\text{Faktor}_{\text{Probe}} = \text{Optische Dichte}_{\text{Probe}} / \text{Optische Dichte}_{\text{Kalibrator}}$$

Als Anti-Titin-Antikörper-positiv wurden Faktoren  $\geq 2$  gewertet.

### **3.1.3.3 Anti-AChR-Antikörper-Radioimmunoassay**

Die Anti-AChR-Antikörperkonzentration wurde mittels eines Radioimmunoassays gemessen. Dabei werden AChR aus humanem Muskelgewebe in diesem Test als Antigen verwendet. Die Rezeptoren sind mit  $^{125}\text{I}$ -alpha-Bungarotoxin radioaktiv markiert. Dabei handelt es sich um ein Schlangengift, das hoch affin an den Rezeptor bindet. Bei der Inkubation mit den Patientenproben binden die AChR-Autoantikörper der Patienten an die markierten Rezeptoren, dabei bilden sich Immunkomplexe, die mit einem zugegebenen Anti-human-IgG-Antiserum präzipitiert werden. Die im Präzipitat vorhandene Radioaktivität wird mittels eines Gammacounters gemessen und ist direkt proportional zur Konzentration der Anti-AChR-Antikörper der Probe. Mittels einer Standardkurve, die durch im Assay beigefügte Kalibrationsproben ermittelt wird, lässt sich die Konzentration der Proben ablesen. Der Kit verfügt laut Herstellerangaben über eine Spezifität von 93,3 % und eine Sensitivität von 100 %.

### **3.1.3.4 Statistische Analyse**

Die erzielten Daten wurden mittels der Software JMP5 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) für Windows XP (Microsoft, Seattle, USA) statistisch verarbeitet. Es wurde dabei der Chisquare-Test angewandt. Die Metaanalyse wurde mittels der Software RevMan (Version 4.2 for Windows. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2003) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten  $< 0,05$  angenommen.



## **3.2 NCF1 und Multiple Sklerose / Malaria**

### **3.2.1 Patientengut**

Zum Vergleich der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten wurde die DNS von 265 MS-Patienten der neurologischen Abteilung der Universität Tübingen, Deutschland, und von 187 MS-Patienten der neurologischen Abteilung der medizinischen Universität Lodz, Polen, untersucht. Alle Patienten gelten nach den Poser- oder McDonald-Kriterien als an MS erkrankt.

Als Kontrollproben dienten die DNS von 191 Teilnehmern der Dortmunder Gesundheitsstudie, Deutschland, und die DNS von 184 nicht erkrankten Personen aus der Region Lodz, Polen.

Klinische Daten waren von 217 deutschen MS-Patienten erhältlich und auswertbar.

Für die Durchflusszytometrie wurden Zellen zweier Labormitarbeiter verwendet. Es wurden ebenso 90 an Hypertonie, 86 an schwerer Malaria und 66 an milder Malaria erkrankte Kinder aus Gabun hinsichtlich ihres  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten getestet. Die DNS dieser Kinder wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. B. Greve, 1999 am Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen, Deutschland, gewonnen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde bei den gabunesischen Kindern die ROS-Produktion im Vollblut und in separierten Granulozytenlösungen gemessen. Dabei wurden die Zellen auch mit PMA, N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin und Tumor-Nekrose-Faktor stimuliert [Greve et al., 2000]. Die ROS-Produktion wurde bei Aufnahme in die Studie, bei manchen Kindern während der Rekonvaleszenz (nach einem Monat) und im gesunden Zustand nach sechs Monaten gemessen.

### 3.2.2 Material und Geräte

#### 3.2.2.1 DNS-Separation aus humanem Vollblut

FlexiGene DNA Kit	(Qiagen, Hilden, Deutschland)
100 % Isopropanol	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
70 % Ethanol	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Pipetten	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	(Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Tischzentrifuge bis 2 ml 5417R	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge bis 50 ml Multifuge 3 S-R	(Heraeus, Hanau, Deutschland)
Wasserbad	(VWR, Darmstadt, Deutschland)
Vortex mixer	(Scientific Industries, Bohemia, USA)

#### 3.2.2.2 NCF1 Genotypisierung

2fach Taqman Universal Master Mix	(Promega, Madison, USA)
Forward Primer: 2LB2Fam-markiert	(biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland)
Sequenz: 5'- GTG CAC ACA GCA AAG CCT CT -3'	
Reverse Primer: 2RB2	(biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland)
Sequenz: 5'-CTA AGG TCC TTC CCA AAG GGT -3'	
Endotoxinfreies Wasser	(Millipore, Billerica, USA)
PTC-200 PCR	(MJ-Research, Waltham, USA)

### 3.2.2.3 Agarose – Gelelektrophorese

Agarose	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid 10 mg/ml	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
0,5fach TBE Puffer	
89mM Tris-Base	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
89mM Borsäure	
20mM Ethylendiamintetraacetat	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
pH 8,0	
Ladepuffer Blue juice	(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
1 kb Plus DNA Ladder	(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Laborwaage	(Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland)
Mikrowelle	(Moulinex, Solingen, Deutschland)
Elektrophoresegelkammer	(Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland)

### 3.2.2.4 Zellseparation von Mono- und Granulozyten

Histopaque 1119	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
Biocoll (Ficoll) Separating Solution 1.077 g/ml	(Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS)	(Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
10fach PBS	(Lonza, Basel, Schweiz)
Endotoxinfreies Wasser	(Millipore, Billerica, USA)
Zentrifugenröhrchen, konisch (50 ml)	(Greiner bio-one,

Einmalpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml), steril	Frickenhausen, Deutschland) (Costar, Bodenheim, Deutschland)
Pipetten	(Eppendorf AG, Hamburg Deutschland)
Tischzentrifuge bis 50 ml Multifuge 3 S-R	(Haereus, Hanau, Deutschland)

### **3.2.2.5 Zählung und Verdünnung der polymorphnukleare Zellen und mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

Zählkammer nach Neubauer (Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm <sup>2</sup> )	(Karl Hecht KG, Sondheim / Rhön, Deutschland)
Pipetten & Pipettenspitzen	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Rotilabo-Mikrotest-Platten aus Polystyrol	(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau-Lösung	(Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
Mikroskop Type 120	(Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland)

### **3.2.2.6 Markierung eines Antikörpers mit R-Phycoerythrin**

R-Phycoerythrin Conjugation Kit p47-phox (D-10) : sc-17845	(Martek, Columbia, USA) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA)
Mouse IgG1 R-Phycoerythrin Conjugate	(Martek, Columbia, USA)
Pipetten	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Cups	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Eppendorf 5417R	(Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

Schüttler Vibrax VXR basic (IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)

### 3.2.2.7 Bradford-Test

Coomassie Plus Protein-Assay Reagenz (Pierce, Rockford, USA)  
Bovines Serumalbumin (BSA) 2 mg/ml (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
D-PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)  
Spektrophotometer (Wallac) (Perkin Elmer, Waltham, USA)

### 3.2.2.8 Färbung von Mono- und Granulozyten mit R-PE-markiertem p47-phox (D-10)-Antikörper

Fixation/Permeabilization Diluent (eBioscience, San Diego, USA)  
Fixation/Permeabilization Concentrate (eBioscience, San Diego, USA)  
10fach Permeabilization Buffer (eBioscience, San Diego, USA)  
Endotoxinfreies Wasser (Millipore, Billerica, USA)  
R-PE-P47-phox (D-10)-Antikörper siehe 2.2.2.6  
Isotype-Kontrolle (Martek, Columbia, USA)  
96-Well-Platte (4titude, Ockley, UK)  
Zentrifuge Eppendorf 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

## 3.2.3 Methoden

### 3.2.3.1 DNS-Separation aus humanem Vollblut

Die Blutproben wurden durch Ethylendiamintetraacetat an ihrer Gerinnung gehindert und auf Eis gestellt. Zunächst wurden 25 ml eines Lysepuffers zu 10 ml Vollblut gegeben und durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Diese Suspension wurde für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Durch den Lysepuffer

bildet sich ein Pellet aus Zellkernen und Mitochondrien. Der Überstand wurde abgekippt und das umgedrehte Falcon 2 min auf ein Zelltuch gestellt um restliche Flüssigkeiten zu entfernen.

Nun wurde dem Pellet 5 ml Denaturationspuffer zugefügt und durch Vortexen wurde es darin vollständig gelöst. Die entstandene Lösung wurde dreimal invertiert und in einem Wasserbad bei 65 °C für 10 min inkubiert. Im Denaturationspuffer befindet sich ein Salz und eine QIAGEN-Protease, die noch vorhandene Proteine spaltet und zerstört. Während der Inkubation verändert die Lösung ihre Farbe von rot zu olivgrün. Dies zeigt den Proteinverdau an.

Durch Zufügen von 5 ml Isopropanol 100 % und mehrmaligem Invertieren wurde die DNS sichtbar. Nun wurde für 3 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das umgedrehte Falcon wieder auf ein Zelltuch gestellt um restliche Flüssigkeiten zu entfernen. Die DNS wurde nun in 70 % Ethanol gewaschen. Dazu wurde 5 ml Ethanol zugefügt und die Lösung für 5 sec gevortext. Dann wurde die Lösung 3 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Falcon nochmals umgedreht ca. 5 min auf ein Zelltuch gestellt. Die DNS wurde 5 min lang getrocknet und in 1 ml Hydrationspuffer (10 mM TrisCl, pH 8,5) gelöst. Diese Lösung wurde für eine Stunde bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die DNS eingefroren.

### **3.2.3.2 NCF1 Genotypisierung**

#### ***3.2.3.2.1 Taqman Universal Master Mix***

Siehe 3.1.3.1.2

### 3.2.3.2.2 *Polymerase Kettenreaktion*

Es wurde ein 12,5 µl PCR-Ansatz gewählt, der aus folgenden Komponenten bestand:

- 2fach Taqman Universal Master Mix      6,25 µl
- Forward Primer                              0,25 µl
- Reverse Primer                                0,25 µl
- Nukleasefreies Wasser                    4,75 µl
- DNS    1     µl

Die PCR wurde in einem Thermocycler in einer 96-Loch-Platte durchgeführt. Dabei wurde als Kontrollen eine Wasserkontrolle und jeweils eine Positiv-Kontrolle für die  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten 2:1, 1:1 und 1:2 auf jeder Platte durchgeführt.

Zunächst wurde der Ansatz für 2 min bei 95 °C denaturiert. Dann erfolgten 35 Zyklen mit jeweils 130 sec Denaturierung bei 95 °C, 30 sec Primeranlagerung bei 50 °C und 30 sec Kettenverlängerung bei 72 °C. Nach den 35 Zyklen wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt.

### 3.2.3.2.3 *Genotypisierung*

Nun wurden die erhaltenen PCR-Produkte im Verhältnis 1:30 mit endotoxinfreiem Wasser verdünnt.

Die Ermittlung der Sequenzlänge wurde durch die Arbeitsgruppe Gasser im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung durchgeführt. Die Primer waren so gewählt, dass der Anfang des Exon 2 des *NCF1*-Gens amplifiziert wurde. Es wurde der FAM-markierte Forward-Primer 2LB2 5'-GTGCACACAGCAAAGCCTCT-3' und der nicht markierte Reverse-Primer 2RB2 5'-CTAAGGTCCTTCCCAAAGGGT-3' eingesetzt [Heyworth et al., 2002]. Man erhält so PCR-Produkte von 209 bzw. 211 Basenpaaren, je nachdem ob es sich um ein *NCF1*-Gen mit  $\Delta$ GT- oder mit GTGT-Sequenz am Beginn von Exon 2 handelt. Die Flächen unter der Sequenzierungskurve („Area under the curve“) von beiden Amplikons wurden nun miteinander verglichen. Ein Wert zwischen

0,75 und 1,5 wurde als  $\Delta GT/GTGT$ -Quotient von 1:1 gewertet, ein Wert über 1,5 als  $\Delta GT/GTGT$ -Quotient von 2:1 und ein Wert unter 0,75 als  $\Delta GT/GTGT$ -Quotient von 1:2.

### **3.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese wird eingesetzt um zu verifizieren ob eine PCR funktioniert hat und die richtigen DNS-Fragmente vermehrt wurden.

Durch die Phosphatreste sind Nukleinsäuren negativ geladen. Deswegen wandern sie im elektrischen Feld zur Anode.

10  $\mu$ l DNS-Fragmente wurden mit 2  $\mu$ l Ladepuffer gemischt und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Es wurden 2%ige Agarose-Gele aus Agarose und TBE-Puffer verwendet. Diesen Gelen wurde Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung der DNS zugefügt. Ethidiumbromid interkaliert in der DNS Doppelhelix und fluoresziert unter UV-Licht. Der Ladepuffer dient dazu mit bloßem Auge zu erkennen wie weit die Gelelektrophorese fortgeschritten ist. Die Trennung der DNS-Fragmente beruht auf der unterschiedlichen Größe der DNS-Fragmente. Je größer die Fragmente sind, umso langsamer wandern sie durchs Gel. Größere Mengen gleichlanger DNS werden als Bande im Gel erkennbar. Es wurde auf jedem Gel ein Standard aufgetragen, der DNS-Fragmente bekannter Länge enthielt. Damit ließ sich die Größe der DNS-Fragmente abschätzen. Die Laufzeit betrug bei 220 V ca. 45 min. Die Gele wurden dann unter UV-Licht fotografiert.

### **3.2.3.4 Zellseparation von Mono- und Granulozyten**

#### ***3.2.3.4.1 Zellseparation***

Die Zellseparation beruht auf dem Prinzip der Auftrennung durch die verschiedenen spezifischen Gewichte der einzelnen Blutkomponenten. Zunächst wurden 10 ml Ficoll über 12 ml Histopaque 1119 als Gradient in ein 50 ml Falcon geschichtet. Danach wurden 25 ml eines Blut/D-PBS-Gemisches



(Verhältnis 1:1) langsam auf den Gradienten pipettiert. Nun wurde das 50 ml Falcon 20 min bei 380 g (1327 rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren erhielt man folgende Phasen:

- Serumschicht
- Monozyten- und Lymphozytenschicht / mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)
- Ficollschicht
- Granulozytenschicht / Polymorphnukleare Zellen (PMN)
- Erythrozytenschicht

#### ***3.2.3.4.2 Separation der Mono- und Lymphozyten***

Das Serum wurde mit einer Glaspipette abpipettiert und verworfen. Nun wurde mit einer Pascal-Pipette die Monozyten- / Lymphozytenschicht abpipettiert, in ein frisches 50 ml Falcon auf Eis gegeben und mit PBS gewaschen. Dafür wurde die Zellsuspension mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und 10 min bei 230 g (1032 rpm) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde schnell abgekippt und das verbliebene Pellet wurde, wie eben beschrieben, erneut gewaschen. Danach wurde das verbliebene Pellet in PBS gelöst.

#### ***3.2.3.4.3 Separation der Granulozyten***

Mit einer Pascal-Pipette wurde die Granulozytenschicht abpipettiert, in ein frisches 50 ml Falcon auf Eis gegeben und einmal gewaschen wie unter Punkt 3.2.3.4.2 beschrieben. Um die mitabpipettierten Erythrozyten zu lysieren wurde 9 ml entotoxinfreies Wasser zugegeben und die Suspension für 45 sec auf- und abpipettiert. Nach den 45 sec wurde 1 ml 10fach PBS zugefügt, um die Lyse zu stoppen. Das Falcon wurde nun mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde einmal invertiert und dann für 10 min bei 230 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde schnell abgekippt und das verbliebene Pellet in PBS gelöst.

### **3.2.3.5 Zählung und Verdünnung der PMNs und PBMCs**

20 µl der Zellsuspension wurden nun mit 180 µl Trypanblau und PBS im Verhältnis 1:1 gefärbt. Davon wurden 20 µl entnommen und in eine Neubauer-Zählkammer gebracht. Unter dem Mikroskop wurden nun die Zellen in 16 Quadraten und zwei Rändern ausgezählt.

Aus der gezählten Menge Zellen ließ sich die in der Zellsuspension enthaltene Konzentration an Zellen berechnen:

$$\text{Anzahl der Zellen} \cdot 10^5 = \text{Konzentration der Zellen [Zellen/ml]}$$

Die Zellen wurden nun für das weitere Procedere auf 500.000 Zellen pro Ansatz verdünnt.

### **3.2.3.6 Markierung eines Antikörpers mit R-Phycoerythrin**

#### ***3.2.3.6.1 p47-phox (D-10): sc-17845***

p47-phox (D-10) ist ein monoklonaler Mausantikörper, der gegen die Aminosäuren 196-390 von menschlichem p47-phox gerichtet ist. 200 µg IgG sind in 1ml PBS mit 0,1 % Natriumazid und 0,1 % Gelatine gelöst.

#### ***3.2.3.6.2 Markierung***

Aktiviertes R-Phycoerythrin (R-PE) ist ein stark fluoreszierendes Phycobiliprotein, welches chemisch aktiviert wird, um einfach an Immunglobuline oder andere Sulfhydryl-enthaltende Proteine zu binden.

Es wurden 0,5 ml des Anti-p47-phox (Klon D-10) mit R-PE markiert. Dafür wurde zunächst der Antikörper reduziert. Es wurden 10 µl der Dithiothreitol Stock Solution zur Antikörperlösung zugefügt, gemixt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dithiothreitol-Reduktion des Antikörpers fand in einem kleinen verschlossenen Eppendorf-Cup statt, um die Oxygenierung zu

minimieren. Dann wurden 20 µl Blue Dextran Stock Solution zugefügt. Dies färbt den Antikörper ohne seine Funktion zu ändern. Nun wurde die Entsalzungs-Säule A des Kits mit der Lösung geladen. Es wurden 25 ml Austauschpuffer auf die Entsalzungssäule gebracht. Man sah, wie der blaue Ring der IgG/Blue Dextran-Lösung nach unten wanderte. Dieser blaue Ring wurde unten mit einem Eppendorf-Cup aufgefangen.

Um eine Reoxidation von Sulfhydrylgruppen zu verhindern sollte sofort mit der Konjugation begonnen werden.

Es wurden 300 µl aktivierten R-PE pro mg IgG, also 30 µl R-PE, zugefügt. Die Reaktionslösung wurde vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur für 60 min unter Schütteln inkubiert. Die freien Sulfhydrylgruppen des IgG wurden dann durch Zufügen von 0,34 µl einer NEM Stock Solution blockiert. Dieser Ansatz wurde nochmals bei 20 min ohne Licht inkubiert.

Das Antikörper / R-PE Konjugat wurde nun bei 10.000 g für 30 sec zentrifugiert. Der Antikörper / R-PE Konjugat-Überstand wurde auf die Entsalzungssäule B geladen und das Pellet verworfen. Dann wurden 25 ml Lagerpuffer auf die Entsalzungssäule B geladen. Man sah wie ein rosafarbenes Band des Antikörper / R-PE Konjugats durch die Säule wanderte. Dieses Band wurde aufgefangen. Es handelte sich um ein entsalztes Antikörper-R-PE Konjugat, welches bei 4 °C vor Licht geschützt gelagert wurde.

### **3.2.3.7 Bradford-Test**

#### **3.2.3.7.1 Prinzip**

Der Bradford-Test dient der quantitativen Bestimmung von Proteinen. Er beruht darauf, dass der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 in saurer Lösung sowohl mit kationischen als auch mit den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe bildet. Die ungebundene, rotgefärbte, kationische Form des Farbstoffs hat ein Absorptionsmaximum bei 470 nm, die gebundene, blaue, anionische Sulfatform hat ein Absorptionsmaximum bei 595 nm.

### **3.2.3.7.2 Durchführung**

Um die Antikörperkonzentration des R-PE-markierten p47-phox (D-10)-Antikörpers zu messen, wurde ein Bradford-Test durchgeführt.

Dazu wurde zunächst eine BSA-Verdünnungsreihe von 2 mg/ml bis 0,03 mg/ml hergestellt. Die Verdünnungsreihe wurde als Duplikat angelegt. Außerdem wurden 10 µl des Antikörpers unbekannter Konzentration benutzt. Nun wurden überall 200 µl Coomassie Plus Protein Assay Reagenz zugefügt. Die Absorbanz dieser Ansätze wurden dann bei 590 nm gemessen.

Nach Entlogarithmisierung der gemessenen Werte wurde die Konzentration des Antikörpers mit 160 µg/ml berechnet.

### **3.2.3.8 Färbung von Mono- und Granulozyten mit R-PE-markiertem p47-phox (D-10)-Antikörper**

Pro Well wurden 500.000 Zellen eingesetzt und herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurden jeweils 200 µl Fixierungsmittel zugefügt. Dieses Fixierungsmittel wurde 3:1 aus Fixation/Permeabilisation-Lösung und Fixation/Permeabilisation-Konzentrat hergestellt. Die Zellsuspension wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde der Permeabilisationspuffer 1:10 mit endotoxinfreiem Wasser verdünnt. Dann wurden mit jeweils 200 µl des verdünnten Permeabilisationspuffers die fixierten Zellen zweimal gewaschen.

Nun wurde der R-PE-markierte p47-phox-Antikörper und der Isotyp jeweils auf die gleichen Konzentrationen verdünnt, wobei der p47-phox-Antikörper in den Verhältnissen 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:200 verdünnt wurde um eine optimale Verdünnung für die Durchflusszytometrie herauszufinden. Der Isotyp wurde dabei jeweils auf die selbe Konzentration verdünnt. Nun wurden die Zellen 30 min mit den Antikörpern inkubiert. Es wurde auch jeweils eine Leerprobe angelegt, die mit Permeabilisationspuffer statt mit Antikörper inkubiert wurde.

Nach 30 min wurden die Zellen wieder zweimal mit 200 µl Permeabilisationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden dann in 200 µl

Permeabilisationspuffer gelöst und dann mit dem Durchflusszytometer die Fluoreszenz gemessen.

### **3.2.3.9 Durchflusszytometrie / Fluorescence activated cell sorting**

#### **3.2.3.9.1 Prinzip**

Die Durchflusszytometrie basiert auf der Emission optischer Signale von Zellen bei der Passage eines Laserstrahls.

Zellen, die sich in einer Lösung befinden, werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren dann einen Laserstrahl. Dabei emittieren die Zellen Streulicht. Dieses Streulicht wird durch Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Dadurch können die Zellen fraktioniert und gezählt werden.

Das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht SSC (Side Scatter) dient als Maß für die Granularität, bzw. die Größe des Zellkerns.

Darüber hinaus können die Zellen mit Antikörpern, die mit fluoreszierenden Farbstoffen wie z.B. R-PE verbunden sind, inkubiert werden. Somit entstehen bei der Passage des Lasers Fluoreszenzimpulse, die erfasst werden. Durch Einsatz verschiedener Farbstoffe und verschiedenfarbiger Laser können die Zellen nach mehreren Merkmalen unterschieden werden.

#### **3.2.3.9.2 Durchflusszytometrie**

Die R-PE-NCF1 markierten Granulozyten- und Monozytensuspensionen wurden nun im Durchflusszytometer gemessen. Dabei wurde im FSC / SSC-Diagramm die gewünschte Zellpopulation ausgesucht. Auf diesen ausgewählten Zellen wurde dann die jeweilige Fluoreszenz gemessen.

### **3.2.3.10 Statistische Analyse**

#### **3.2.3.10.1 *Malaria***

Es wurde die ROS-Produktion der an Malaria erkrankten gabunesischen Kinder mit unterschiedlichen  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten betrachtet. Dazu wurde eine Varianzanalyse mit den Faktoren Schwere der Malaria (einfache vs. komplizierte Malaria),  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotient ( $\leq 1:1$  vs.  $\geq 2:1$ ), Zeitpunkt der Messung der ROS-Produktion (zu Beginn, einen Monat und sechs Monate nach Aufnahme in die Studie) und alle Interaktionen zwischen diesen drei Faktoren durchgeführt. Die ROS-Daten wurden dabei log-transformiert. Es wurden die geometrischen Mittelwerte, deren OR und das 95%-Konfidenz-Intervall [KI] berechnet. Danach wurde nach Unterschieden der ROS-Produktion in Abhängigkeit der  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten innerhalb der Subgruppen „Schwere der Krankheit“, Zeitpunkt der Messung (zu Beginn, einen Monat und sechs Monate nach Aufnahme in die Studie) und unter sechs verschiedenen Stimulationsbedingungen gesucht.

#### **3.2.3.10.2 *Multiple Sklerose***

Wir versuchten die MS-Schwere (definiert durch EDSS) und das Alter des Krankheitsbeginns in Varianzanalysen mit den Faktoren  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotient ( $\geq 2:1$  versus  $\leq 1:1$ ) und Krankheitsart (Beginn als Schub oder progressiv) zu vergleichen.

Die statistische Analyse wurde mit der Software JMP5 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) durchgeführt. Für die Meta-Analyse wurde die Software RevMan (Version 4.2 for Windows. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2003) benutzt. Als statistisch signifikant wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten  $< 0,05$  angenommen.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 *Myasthenia gravis* und *PTPN22***

#### **4.1.1 Messwartergebnisse**

Es wurden von 134 MG-Patienten aus Deutschland und 149 MG-Patienten aus Ungarn Serum und DNS verwendet.

Bei den deutschen Proben konnten von 126 Patienten der Anti-Titin-Ak-Status und von 127 Patienten der Anti-ACh-Rezeptor-Status ermittelt werden. Von 97 Patienten konnte der Thymomstatus eruiert werden, bei 37 Patienten blieb er unbekannt.

Bei den ungarischen Proben konnten von jeweils 147 Patienten der Anti-Titin-Ak- und der Anti-ACh-Rezeptor-Status ermittelt werden. Von 143 Patienten konnte der Thymomstatus eruiert werden, bei 6 Patienten blieb er unbekannt. Es wurden die Allelfrequenzen- und Genotypenverteilung der MG-Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen untersucht. Die Allelfrequenzen- und Genotypenverteilung wurde dann noch nach Subgruppen aufgeschlüsselt und wiederum mit den Kontrollgruppen verglichen.

#### **4.1.2 Allelfrequenzen- und Genotypenverteilung**

Die Verteilung der Genotypen innerhalb der Kontrollgruppen und der MG-Patienten von Deutschland und Ungarn ist aus Tabelle 3 zu entnehmen. Da nur ein geringer Prozentsatz von 1-2 % der Probanden einen homozygoten Genotyp TT aufweisen und dieser für die statistische Auswertung schlecht erfasst werden kann, bezieht sich die statistische Auswertung auf die Allelfrequenzverteilung. Es zeigt sich, wenn man die Ergebnisse der Allelfrequenzen- und Genotypenmessung der Probanden beider Länder zusammenfasst, eine erhöhte Tendenz zum T-Allel in der MG-Patientengruppe mit einer T-Allel-Frequenz von 14 % im Vergleich zu einer T-Allel-Frequenz von 11 % in der Kontrollgruppe, die statistisch jedoch nicht signifikant ist.

### 4.1.3 Allelfrequenzen in Subgruppen der MS-Patienten

Desweiteren vergleichen wir verschiedene Patientengruppen charakterisiert durch das Vorhandensein von Antikörpern und Thymom mit der Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 4). Es findet sich eine signifikante Überrepräsentation des T-Allels in der Anti-Titin-Antikörper-positiven Untergruppe sowie in der AChR-Antikörper-positiven Untergruppe der Thymom-negativen MG-Patienten.

Die Metaanalyse zeigt (vgl. Tabelle 5), dass die Überrepräsentation des T-Allels in Anti-Titin-positiven und Thymom-negativen MG-Patienten auch in einer separaten Analyse von deutschen und ungarischen Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen besteht.

**Tabelle 3:** Allelfrequenzen- und Genotypenverteilung

n = Anzahl der Patienten bzw. der Kontrollpersonen

		n	Allelfrequenz (%)		Genotypen (%)		
			T	C	TT	CT	CC
Deutschland	MG	134	35 (13)	233 (87)	3 (2)	29 (22)	102 (76)
	Kontrollen	199	46 (12)	352 (88)	2 (1)	42 (21)	155 (78)
Ungarn	MG	148	45 (15)	251 (85)	2 (1)	41 (28)	105 (71)
	Kontrollen	180	39 (11)	321 (89)	3 (2)	33 (18)	144 (80)
Gesamt	MG	282	80 (14)	484 (86)	5 (2)	70 (25)	207 (73)
	Kontrollen	379	85 (11)	673 (89)	5 (1)	75 (20)	299 (79)

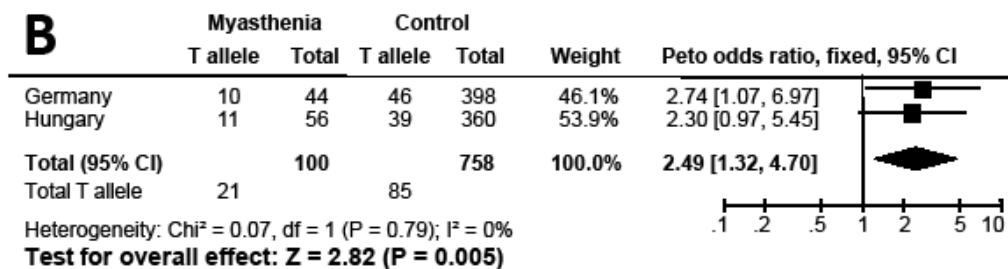


**Tabelle 4:** Subgruppenanalyse

n = Anzahl der Patienten beziehungsweise der Kontrollpersonen  
 Ak = Antikörper  
 AChR = Acetylcholin-Rezeptor  
 KI = Konfidenzintervall

	n	Allelfrequenz (%)		Genotypen (%)			p (Chisquare)	
		T	C	TT	CT	CC	Allele	Odds Ratio [95% KI]
<b>Kontrollen</b>	<b>379</b>	<b>85 (11)</b>	<b>673 (89)</b>	<b>5 (1)</b>	<b>75 (20)</b>	<b>299 (79)</b>		
<b>versus</b>								
<b>Non-Thymom</b>	<b>208</b>	<b>62 (15)</b>	<b>354 (85)</b>	<b>3 (1)</b>	<b>56 (27)</b>	<b>149 (72)</b>	<b>0,07</b>	<b>1,39 [0,98-1,97]</b>
- Titin-Ak pos.	50	21 (21)	79 (79)	1 (2)	19 (38)	30 (60)	0,005	2,10 [1,23-3,58]
- Titin-Ak neg.	152	39 (13)	265 (87)	2 (1)	35 (23)	115 (76)	0,4	1,17 [0,78-1,75]
- AChR-Ak pos.	164	51 (16)	277 (84)	2 (1)	47 (29)	115 (70)	0,05	1,46 [1,00-2,12]
- AChR-Ak neg.	42	10 (12)	74 (88)	1(2)	8 (19)	33 (79)	0,84	1,07 [0,53-2,15]
<b>Thymom</b>	<b>33</b>	<b>7 (11)</b>	<b>59 (89)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>7 (21)</b>	<b>26 (79)</b>	<b>0,88</b>	<b>0,94 [0,42-2,12]</b>

**Tabelle 5:** Metaanalyse Non-Thymom-Gruppe mit positiven Anti-Titin-Anitkörpern vs. Kontrollen



## **4.2 NCF1 und Multiple Sklerose / Malaria**

### **4.2.1 $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten und MS**

Es wurde die  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten in 452 MS-Patienten und 375 Kontrollpersonen bestimmt, um eine mögliche Assoziation der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit MS zu untersuchen.

Unter den 265 deutschen MS-Patienten fanden sich 47 Patienten (17,7 %) mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten  $\leq 1:1$ , unter den 191 deutschen Kontrollen 28 (14,7 %) mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$ . Unter den 187 polnischen MS-Patienten fanden sich 19 Patienten (10,2 %) mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten  $\leq 1:1$ , unter den 184 polnischen Kontrollpersonen 19 (10,3 %) mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten  $\leq 1:1$  (vgl. Tabelle 6). Eine Meta-Analyse der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten-Ergebnisse der Probanden beider Länder zeigte keine signifikante Assoziation der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit MS (vgl. Tabelle 7).

### **4.2.2 $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten sind assoziiert mit Subphänotypen der MS**

Es wurden mögliche Assoziationen der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit klinischen Subphänotypen der MS-Patienten bei 217 deutschen MS-Patienten untersucht: Einerseits mit der Schwere der MS-Krankheit und andererseits mit dem Alter zu Krankheitsbeginn. Die Varianzanalyse ergab, dass die  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten nicht mit der Krankheitsschwere, die durch den EDSS definiert ist, assoziiert ist. Es fand sich jedoch eine Assoziation mit dem Alter zu Krankheitsbeginn (Varianzanalyse: Rsquare 0,11, RMSE 8,9; Faktor  $\Delta$ GT/GTGT-Ratio  $p = 0,03$ ; Faktor Schubförmiger Beginn versus progressiver Beginn  $p < 0,001$ ).

Das arithmetische Mittel des Erkrankungsalters der Patienten mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  lag bei 32,2 Jahren, bei Patienten mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$  lag das arithmetische Mittel des Erkrankungsalters bei 29,3 Jahren (Mittelwert-Unterschied 2,9 Jahre, 95 % KI - 0,25 bis 6 Jahre; vgl. Abb. 7).

**Tabelle 6:**  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten-Verteilung bei MS-Patienten und Kontrollpersonen

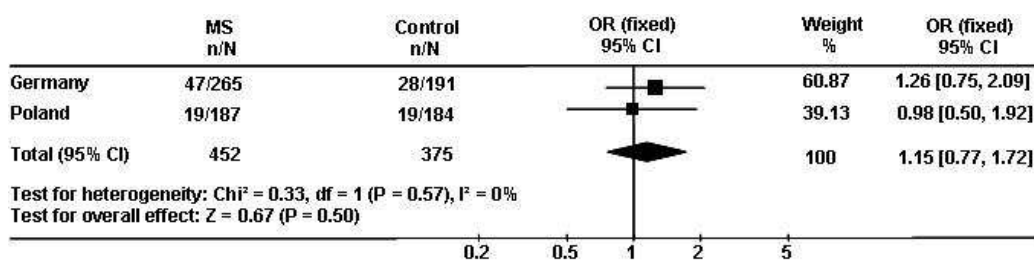
n = Anzahl der MS-Patienten beziehungsweise der Kontrollpersonen

	n	$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten (%)	
		$\geq 2:1$	$\leq 1:1$
<b>Deutschland</b>			
MS-Patienten	265	218 (82)	47 (18)
Kontrollen	191	163 (85)	28 (15)
<b>Polen</b>			
MS-Patienten	187	168 (90)	19 (10)
Kontrollen	184	165 (90)	19 (10)
<b>Gesamt</b>			
MS-Patienten	452	386 (85)	66 (15)
Kontrollen	375	328 (87)	47 (13)

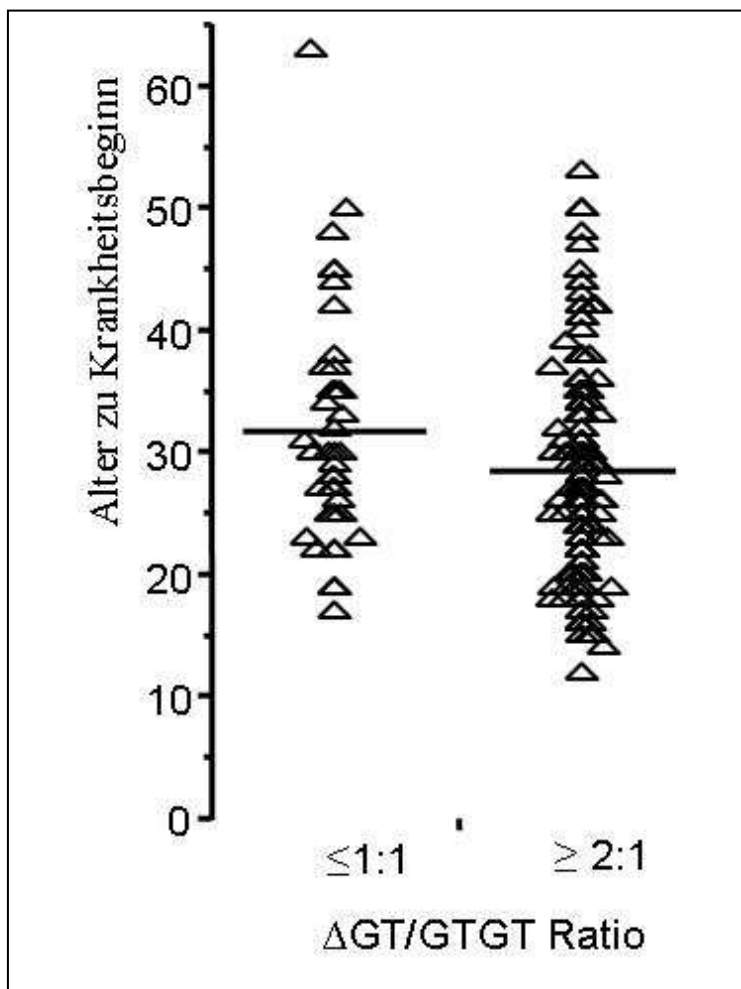
**Tabelle 7:** Metaanalyse der Genotypergebnisse der Probanden beider Länder

n = Anzahl der MS-Patienten beziehungsweise der Kontrollpersonen mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotient 1:1

N = Gesamtzahl der MS-Patienten beziehungsweise der Kontrollpersonen



In der Gruppe der Patienten mit schubförmigem Krankheitsstart lag das arithmetische Mittel des Erkrankungsalters der Patienten mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\leq 1:1$  bei 31,7 Jahren, bei Patienten mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\geq 2:1$  bei 28,4 Jahren (Mittelwert-Unterschied 3,3 Jahre, 95 % KI 0,3 bis 6,3 Jahre).



**Abb. 7:** Erkrankungsalter vs.  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten bei deutschen MS-Patienten

### 4.2.3 $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten und Malaria

Es wurden die  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von 86 Kindern, die an komplizierter Malaria litten und von 66 Kindern, die an einfacher Malaria litten, erhoben.

Unter den 86 Kindern mit komplizierter Malaria befanden sich 14 (16,3 %) mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  und 72 (83,7 %) mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$ , unter den 66 Kindern mit einfacher Malaria 13 (19,7 %) mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$ , 53 (80,3 %) mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$  (vgl. Tabelle 8). Die OR für Unterschiede des  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten zwischen komplizierter und einfacher Malaria betrug 0,97 (95 % KI, 0,34-1,84).

**Tabelle 8:**  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten-Verteilung der Malariapatienten

n = Anzahl der Malariapatienten beziehungsweise der Kontrollpersonen

	n	$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten (%)	
		$\geq 2:1$	$\leq 1:1$
<b>komplizierte Malaria</b>	86	72 (84)	14 (16)
<b>einfache Malaria</b>	66	53 (80)	13 (20)
<b>Insgesamt</b>	152	125 (82)	27 (18)

#### **4.2.4 Korrelation der $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit der ROS-Produktion in Malariapatienten**

Es zeigte sich kein Zusammenhang der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit der ROS-Produktion in stimulierten und unstimulierten Zellen von an Malaria erkrankten Kindern. Allerdings fand sich in der Gruppe der Kinder mit komplizierter Malaria eine höhere maximale und kumulative ROS-Produktion in PBMC bei Kindern mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  im Vergleich zu Kindern mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$  während der akuten Krankheitsphase. Der geometrische Mittelwert in der Subgruppe der PMA-stimulierten ROS-Produktion war 1,7mal höher in den Kindern mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  verglichen mit den Kindern mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$  (95 % KI 1,0-2,9 für die maximale ROS-Produktion und 1,0-3,0 für die kumulative ROS-Produktion). Bei unstimulierten Zellen war die maximale ROS-Produktion 1,9mal höher (95 % KI 0,8-3,7) in Kindern mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  verglichen mit Kindern mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$ . Ebenso war in dieser Gruppe die kumulative basale ROS-Produktion 1,5mal höher (95 % KI, 0,8-2,8).

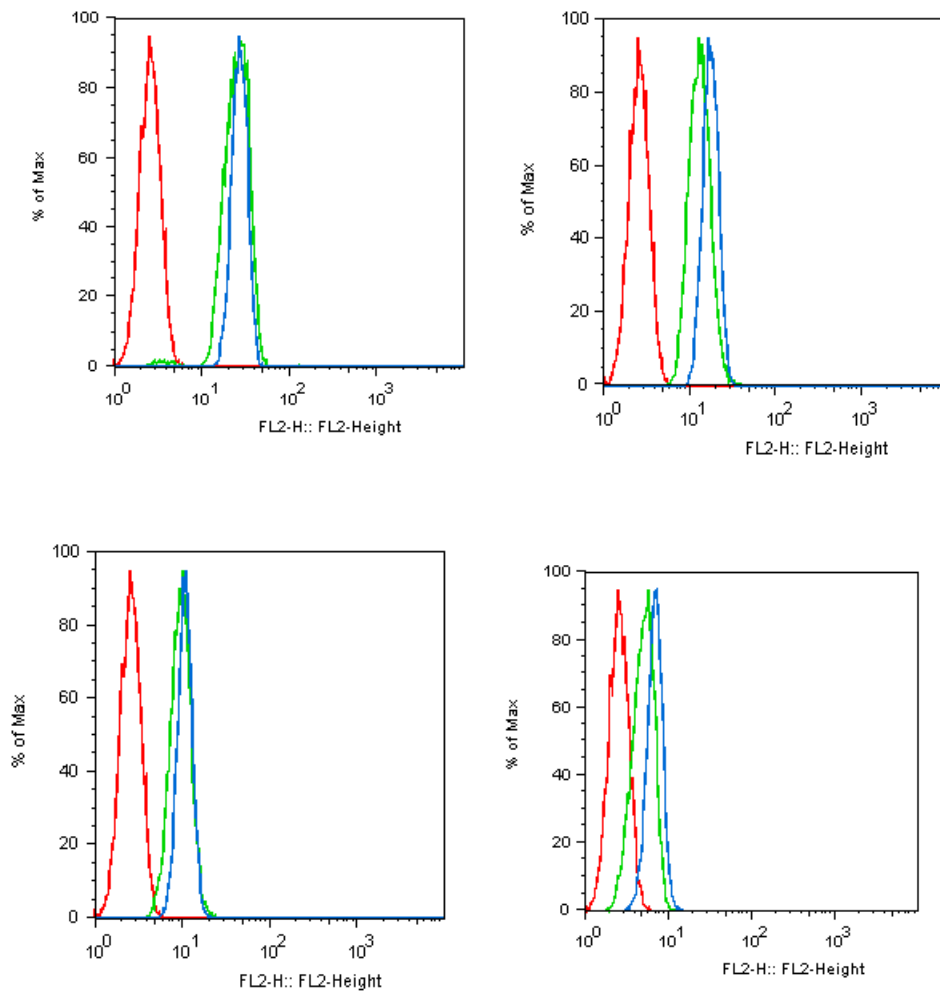
#### **4.2.5 $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten und Hämoglobinkonzentration**

Die Gruppe der Kinder mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  tendierte zu geringeren Hämoglobin-Konzentrationen (arithmetisches Mittel: 8,9 g/dl) im Vergleich zu den Kindern mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$  (arithmetisches Mittel: 9,4 g/dl) (Mittelwertdifferenz -0,5 g/dl; 95 % KI -1,6-0,5 g/dl). In der Gruppe der Kinder, die an schwerer Malaria erkrankten, hatten 9 der 14 Kinder (64 %) mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  im Vergleich zu 29 von 72 Kindern (40 %) mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$  ( $p=0,09$ ) eine Hämoglobinkonzentration  $< 8$  g/dl.

Es fand sich keine Assoziation zwischen den  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten und der Parasitämie oder der Parasiten-Clearance-Zeit.

#### **4.2.6 Durchflusszytometrie der Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten**

Es sollte der NCF1-Gehalt von Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten in Personen mit unterschiedlichem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten gemessen werden und dabei eine Methode zur Messung etabliert werden. Dies sollte mittels farbmarkiertem Antikörper durchgeführt werden. Es zeigten sich jedoch in der Durchflusszytometrie keine Unterschiede zwischen Antikörper-markierten Proben und Isotypenkontrollen in der Fluoreszenz (vgl. Abb. 8). Da mit diesem Antikörper unter verschiedenen Untersuchungsbedingungen keine spezifische intrazelluläre Anfärbung möglich war, wurde diese Fragestellung nicht weiter verfolgt.



rot:       Leerkontrolle  
grün:      Isotypenkontrolle  
blau:      NCF1-Antikörper

**Abb. 8,** PMN, Antikörperverdünnung 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50



## **5 Diskussion**

### **5.1 *Myasthenia gravis* und PTPN22**

#### **5.1.1 Einführung**

Die erzielten Ergebnisse beantworten die in der Einleitung aufgeworfene Fragestellung. Zunächst sollen diese Resultate diskutiert werden. Danach sollen die Ergebnisse in Bezug auf die internationale Literatur gesetzt und ein Ausblick auf weitere Forschungsmöglichkeiten in diesem Bereich gegeben werden.

#### **5.1.2 Assoziation des PTPN22 Polymorphismus mit *Myasthenia gravis***

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Allelfrequenzen- und Genotypenverteilung zwischen Kontrollgruppen und Myastheniepatienten beider Länder nachgewiesen werden. Tendenziell zeigte sich eine erhöhte Frequenz des T-Allels in den Myasthenie-Gruppen beider Länder. Eine Metaanalyse auf internationaler Basis mit größerem Patientengut wäre zur Sicherstellung der bisherigen Tendenz, dass das T-Allel häufiger bei Myasthenie-Patienten auftritt, wünschenswert.

#### **5.1.3 Assoziation des PTPN22 Polymorphismus mit dem Auftreten von Anti-AChR-Antikörpern und Anti-Titin-Antikörpern**

Bisher wurde eine Assoziation der PTPN22 1858\*C/T Substitution mit folgenden Erkrankungen, die Autoantikörper aufweisen, gezeigt: Diabetes mellitus Typ I [Bottini et al., 2004; Onengut-Gumuscu et al., 2004; Smyth et al., 2004; Ladner et al., 2005], RA [Begovich et al., 2004], juvenile idiopathische Arthritis, SLE [Kyogoku et al., 2004], M. Basedow [Smyth et al., 2004; Velaga et al., 2004], Vitiligo und Morbus Addison.

In der Verteilung der Anti-AChR-Antikörper zeigt sich eine geringe Tendenz in Richtung der PTPN22 1858\*C/T Substitution. 28% der MG Patienten mit Anti-AChR-Antikörper weisen die PTPN22 18858\*C/T Substitution auf. Bei den Kontrollpersonen weisen nur 21 % die PTPN22 18858\*C/T Substitution auf. Bei der Subgruppe der MG-Patienten mit Anti-Titin-Antikörpern ist diese Assoziation stärker. Hier weisen 35 % die PTPN22 18858\*C/T Substitution auf. Da jedoch bei fast allen Patienten, die Anti-Titin-Antikörper aufwiesen auch Anti-AChR-Antikörper im Serum messbar waren, kann es sein, dass sich die Assoziation der MG-Patienten mit Anti-Titin-Antikörpern mit der PTPN22 18858\*C/T Substitution auf die Assoziation der MG Patienten mit Anti-AChR-Antikörpern mit der PTPN22 18858\*C/T Substitution auswirkt.

Die Daten lassen vermuten, dass die PTPN22 1858\*C/T Substitution eine Rolle in der Pathogenese der MG spielt, insbesondere bei den MG Patienten bei denen Anti-Titin-Antikörper im Serum vorkommen.

#### **5.1.4 Anti-Titin-Antikörper und Thymome**

In früheren Arbeiten [Yamamoto et al., 2001] wurde gezeigt, dass Anti-Titin-Antikörper mit dem Vorhandensein von Thymomen assoziiert sind. Bei 80 % der MG-Patienten mit Thymom fanden sich Anti-Titin-Antikörper im Serum. Bei MG-Patienten ohne Thymom fanden sich nur in 41 % der Patienten Anti-Titin-Antikörper im Serum. Dies konnte in unserer Studie nicht verifiziert werden. Es fanden sich in 27 % der MG-Patienten mit Thymom Anti-Titin-Antikörper und in 24 % der MG-Patienten ohne Thymom Anti-Titin-Antikörper. Bei der Interpretation dieser Daten muss beachtet werden, dass lediglich 33 Thymompatienten in unserer Studie eingeschlossen waren.

### **5.1.5 Genotypen in Abhängigkeit vom Thymomstatus**

Die Genotypenverteilung in Abhängigkeit zum Thymomstatus wurden bei den MG-Patienten aus Deutschland und Ungarn gemeinsam betrachtet, da auf Länderebene die Fallzahlen für ein aussagekräftiges Ergebnis zu klein wären. In der Gruppe der MG-Patienten ohne Thymom finden sich 28 % der MG-Patienten mit einer PTPN22 18858\*C/T Substitution, wohingegen bei den MG-Patienten mit Thymom nur 21 % eine PTPN22 18858\*C/T Substitution aufweisen. Dieser Unterschied könnte ein Hinweis darauf sein, dass Patienten, die an einem paraneoplastischen Syndrom leiden, eine andere Pathogenese aufweisen als Non-Thymom-Patienten.

Die Thymom-Patienten unterscheiden sich in der Häufigkeit der PTPN22 18858\*C/T Substitution nicht von der Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 4). Im Gegensatz dazu liegt die Häufigkeit der PTPN22 18858\*C/T Substitution bei MG Patienten ohne Thymom tendenziell höher. Ein Einfluss der PTPN22 18858\*C/T Substitution auf die Pathogenese von MG, bei der kein Thymom vorliegt, ist somit denkbar.

### **5.1.6 Subgruppenanalyse der MG-Patienten ohne Thymom**

Aufgrund der Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen Thymom- und Non-Thymompatienten und in Anlehnung an eine Publikation [Vandiedonck et al., 2006], welches sich mit der gleichen Thematik beschäftigt, wurde nochmals genauer die Subgruppe der MG-Patienten ohne Thymom betrachtet. Die MG Patienten mit Thymom wurden aufgrund der geringen Fallzahlen von nur 33 Patienten nicht weiter in Subgruppen aufgesplittet.

Bei MG-Patienten ohne Thymom, die Anti-Titin-Antikörper aufweisen, findet sich eine signifikante Überrepräsentation der T-Allel-Frequenz von 21 %, wohingegen die T-Allel-Frequenz bei den Kontrollpersonen 11 % beträgt (vgl. Tabelle 4). Auch in einer Metaanalyse, die die deutschen und ungarischen MG-Patienten einschließt, ist die T-Allel-Frequenz in Non-Thymom MG-Patienten mit Anti-Titin-Antikörpern signifikant zur Kontrollgruppe erhöht (vgl. Tabelle 5).

Ebenso findet sich in einer Metaanalyse der MG-Patienten aus Deutschland und Ungarn eine höhere T-Allel-Frequenz in den Anti-AChR-positiven Patienten der Non-Thymom-Gruppe.

Diese Daten lassen vermuten, dass die PTPN22 18858\*C/T Substitution vor allem bei den MG-Patienten ohne Thymom mit Anti-Titin-Antikörpern eine pathogenetische Rolle spielt.

### **5.1.7 Vergleich unserer Ergebnisse mit früheren Studien**

Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten der Studie der französischen Gruppe [Vandiedonck et al., 2006] (vgl. Tabelle 9). In dieser Studie konnte ein gehäuftes Auftreten des T-Allels in MG-Patienten ohne Thymom, die keine Anti-Titin-Antikörper aufweisen, im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. In der französischen Studie zeigte sich keine signifikante Assoziation der PTPN22 18858\*C/T Substitution mit MG-Patienten ohne Thymom, die Anti-Titin-Antikörper aufweisen, wohingegen in unserer Studie dieser Zusammenhang signifikant ist.

In einer schwedischen Studie [Lefvert et al., 2008], die 409 MG-Patienten mit 1557 Kontrollprobanden verglich, fand sich eine Assoziation der PTPN22 18858\*C/T Substitution mit der Gruppe der MG-Patienten ( $p = 0,00027$ ). Sie fanden eine noch stärkere Assoziation in den Patienten mit Thymushyperplasie ( $p = 0,00014$ ) und innerhalb dieser Gruppe bei den Patienten die Anti-AChR-Antikörper aufwiesen ( $p = 0,000066$ ). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die PTPN22 1858\*C/T Substitution eine Rolle in der Pathogenese der MG spielt.

In allen drei Studien zeigte sich übereinstimmend keine Assoziation des T-Allels mit MG in der Subgruppe der Patienten, die Thymome aufwiesen. Dies könnte bedeuten, dass die PTPN22 1858\*C/T Substitution nur mit der Subgruppe der MG, bei der kein Thymom vorhanden ist, assoziiert ist.

Die unterschiedliche Frequenz des T-Allels in den jeweiligen Kontrollgruppen der drei Studien könnte durch den unterschiedlichen Genpool erklärt werden. In der französischen Studie wurden nur französische, in der schwedischen Studie

schwedische Patienten eingeschlossen wohingegen in unserer Studie deutsche und ungarische Patienten teilnahmen. Es findet sich bei den französischen Kontrollpersonen in 7,4 % der Fälle das T-Allel, wohingegen in der schwedische Studie 10 % der Kontrollpersonen das T-Allel aufweisen und in unserer Studie das T-Allel in 11 % der Kontrollpersonen zu finden ist. Bereits in einigen anderen Studien wurde gezeigt, dass die Assoziation des PTPN22 Polymorphismus mit Autoimmunität von der Population abhängig ist. Es kommen innerhalb der Bevölkerung Europas große Unterschiede in der Frequenz des T-Allels vor, wenn man den Genpool Nordeuropas mit dem Südeuropas vergleicht [Bottini et al., 2006]. So findet sich das T-Allel im Süden Europas seltener (Italien 2 %, Spanien 6 %), während es in Nordeuropa viel häufiger vorkommt (Großbritannien 8 %, Schweden 12 %, Finnland 15 %) [Vang et al., 2008].

In der schwedischen Studie wurden zusätzlich von 100 MG-Patienten PBMC mit dem Autoantigen, also dem AChR inkubiert. Die Zellen der MG-Patienten, die das PTPN22 T-Allel aufwiesen, zeigten eine stärkere Produktion von Anti-AChR-Antikörpern. Wir konnten ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang zwischen den T-Allel-Trägern und dem Anti-AChR-Antikörper-Status zeigen (vgl. Tabelle 4).

**Tabelle 9:** Daten aus französischer Studie [Vandiedonck et al., 2006]

n = Anzahl der Patienten beziehungsweise der Kontrollprobanden

Gruppe	n	Risikoallel (T)		Genotypfrequenzen (%)		
		Frequenz (%)	p	CC	CT	TT
<b>Kontrollen</b>	<b>296</b>	<b>44 (7,4)</b>		<b>253 (85,5)</b>	<b>42 (14,2)</b>	<b>1 (0,3)</b>
<b>Non-Thymom-Patienten ohne</b>						
<b>Anti-Titin-Antikörpern</b>	<b>293</b>	<b>80 (13,7)</b>	<b>0,00059</b>	<b>219 (74,7)</b>	<b>68 (23,2)</b>	<b>6 (2,1)</b>
<b>Non-Thymom-Patienten mit</b>						
<b>Anti-Titin-Antikörpern</b>	<b>97</b>	<b>19 (9,8)</b>	<b>0,29</b>	<b>79 (81,4)</b>	<b>17 (17,5)</b>	<b>1 (1,0)</b>
<b>Thymom-Patienten</b>	<b>80</b>	<b>15 (9,4)</b>	<b>0,41</b>	<b>65 (81,3)</b>	<b>15 (18,7)</b>	<b>0 (0)</b>

### 5.1.8 Zusammenfassung und Ausblick

Unsere Daten sprechen für die Hypothese, dass die PTPN22 18858\*C/T Substitution ein genereller Risikofaktor für Krankheiten mit gesteigerter Autoantikörperproduktion ist und eine Rolle in der Pathogenese der MG spielt. Da sich in der Gruppe der MG-Patienten die ein Thymom aufweisen jedoch keine Überrepräsentation der PTPN22 18858\*C/T Substitution finden lässt, spricht dies für eine andere Krankheitsentstehung bei MG-Patienten die ein Thymom aufweisen und somit für die Heterogenität der Pathogenese von MG. Bisher ist noch nicht der genaue Mechanismus geklärt, durch den die PTPN22 18858\*C/T Substitution die Suszeptibilität AIE zu entwickeln erhöht. Es wurde beschrieben, dass sie in den T-Zell-Rezeptor-Signalweg eingreift. Es kommt zu einer geringeren Calciummobilisation in T- und B-Zellen. Es finden weiterhin Veränderungen im Zytokinprofil der T- und B-Zellen statt [Rieck et al., 2007]. Da die krankheitsassoziierte Form des PTPN22 Gens ca. 50 % aktiver als die nichtmutierte Form ist [Vang et al., 2005] und das LYP-Protein nur in hämatopoetischen Zellen vorkommt [Cohen et al., 1999], wäre die Möglichkeit gegeben, sehr spezifisch mit einem PTPN22-Inhibitor einzugreifen. So würde die Inhibition des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs dadurch auf ein Normalmaß reduziert werden. In Zukunft sollten die Wirkungen des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs auf die Zelle besser untersucht werden um weitere pharmakologische Ansatzpunkte für die Beeinflussung des T-Zell-Rezeptor-Signalwegs zu finden.

## **5.2 *NCF1* und Multiple Sklerose / Malaria**

### **5.2.1 Einführung**

Es wurde eine Assoziation der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit dem Erkrankungsalter bei MS entdeckt. Kinder mit komplizierter Malaria und  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  zeigten eine tendenziell höhere ROS-Produktion während der akuten Krankheitsphase als Kinder mit komplizierter Malaria und  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$ . Durch die Durchflusszytometrie konnte nicht gezeigt werden, dass es sich beim *Typ II  $\psi$ NCF1* um ein funktionierendes Protein handelt. Zunächst sollen die Resultate diskutiert werden. Danach wird auf die Methodik eingegangen werden. Zuletzt soll ein Ausblick auf weitere Forschungsmöglichkeiten in diesem Bereich gegeben werden.

### **5.2.2 $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten in Multiple Sklerose-Patienten**

Bisher wurden nur zwei Studien durchgeführt, in denen die Assoziation der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit einer AIE untersucht wurde. In beiden Studien wurde dies in einer Patientengruppe mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erforscht. Die erste Studie ergab einen erhöhten  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von 1:1 in 138 Patienten verglichen mit 37 Kontrollpersonen. Die Assoziation der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von 1:1 war besonders stark in der Subgruppe der Patienten, die an Morbus Crohn litten [Harbord et al., 2003]. Dieser Zusammenhang konnte in einer anderen Studie, die 488 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit 181 Kontrollpersonen verglich, nicht gezeigt werden [Suraweera et al., 2004].

Die Assoziation von *NCF1* mit MS konnte noch nicht gezeigt werden. Jedoch besteht in Tiermodellen eine Assoziation von *Ncf1* mit EAE. In EAE führte das Auftreten einer Mutation von *Ncf1* dazu, dass *Ncf1* nicht vollständig transkribiert und translatiert wird und dadurch seine Funktion verliert. Es kam zu einem

verringerten oxidativen Burst und einer Verschlechterung der EAE [Hultqvist et al., 2004].

In unserer Studie zeigte sich keine signifikante Assoziation der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit MS. Somit lässt sich sagen, dass der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotient keinen bedeutsamen genetischen Faktor für die Krankheitsanfälligkeit und die Krankheitsentwicklung von MS innerhalb der deutschen und polnischen Bevölkerung darstellt. Die  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten waren desweiteren nicht mit der Krankheitsschwere oder dem Typ der MS assoziiert.

Innerhalb der deutschen Patienten fand sich eine Assoziation der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit dem Erkrankungsalter. Individuen mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  hatten einen späteren Krankheitsbeginn als solche mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$ . Eine Erklärung für diese Assoziation könnte sein, dass  $\psi$ NCF1 Typ II wie NCF1 transkribiert und translatiert wird. Dadurch könnte die Menge des intrazellulären NCF1 erhöht sein, wodurch die NADPH-Oxidase mehr ROS produzieren könnte. Diese ROS beeinflussen die T-Zell-Antwort [Gelderman et al., 2007] über den T-Zell-Rezeptor-Signalweg wodurch es letztendlich zu einem späteren Krankheitsbeginn der MS kommen könnte. Dies passt zu einer Studie, in der eine Mutation von *Ncf1* zu einem geringeren oxidativen Burst und damit zu einer gesteigerten Suszeptibilität und Krankheitsschwere von Arthritis und Enzephalomyelitis in Tiermodellen führt [Hultqvist et al., 2004].

### **5.2.3 $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten in Malaria-Patienten und Vergleich mit der ROS-Produktion**

Es zeigte sich die Tendenz für eine höhere ROS-Produktion im Blut von Kindern mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  innerhalb der Gruppe von Kindern mit komplizierter Malaria während der akuten Krankheitsphase verglichen mit denen mit  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$ . Dieses Ergebnis ist mit dem einer früher veröffentlichten Studie vereinbar, in der Individuen mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von 1:2 ungefähr 76 % mehr NCF1-Protein in ihren neutrophilen Granulozyten hatten als die Vergleichsgruppe von Personen mit einem



$\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von 2:1, ein Individuum mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von 1:1 hatte einen intermediären Phenotyp [Heyworth et al., 2003]. In Zelllinien von Personen, die hemizygot für den *NCF1*-Locus sind, also eine Ratio von 5:1 aufweisen, wurde bereits eine verringerte p47phox-Expression und eine verringerte Superoxid-Anionen-Produktion nachgewiesen [Del Campo et al., 2006].

Dies lässt vermuten, dass das  $\psi$ *NCF1 Typ II*, welches nicht die GT-Deletion an Beginn von Exon 2 aufweist, tatsächlich in funktionierendes p47phox-Protein translatiert wird, welches die ROS-Produktion steigert. Jedoch konnte der direkte Zusammenhang noch nicht nachgewiesen werden.

Da keine Assoziation des  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit der Parasitämie oder der Parasiten-Clearance-Zeit nachgewiesen wurde, kann geschlossen werden, dass der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotient keine größere Rolle im Krankheitsverlauf der Malaria spielt, obwohl bereits gezeigt wurde, dass die ROS-Produktion eine Rolle in der Parasiten-Clearance-Zeit und in der Schwere der Anämie spielt [Greve et al., 1999; Greve et al., 2000].

Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotient einen individuellen Einfluss auf die ROS-Produktion haben kann, aber nur einen geringen Einfluss auf die Krankheitsanfälligkeit und den Krankheitsverlauf einer Malaria hat.

## **5.2.4 Kritik der Methode**

### **5.2.4.1 Genotypisierung der *NCF1*-Fragmente**

Die gemessenen  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten waren höher als die erwarteten  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten. Der Median innerhalb der MS-Studie für die 2:1-Ratios war 2,28 und für die 1:1 Ratio 1,09. Dies könnte durch eine höhere PCR-Effizienz des kürzeren  $\Delta$ GT-Amplicons erklärt werden.

#### **5.2.4.2 Durchflusszytometrie der Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten**

Dass keine spezifische Fluoreszenz für den beschriebenen Antikörper und damit für die p47phox-Proteine mit der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte, könnte daran liegen, dass der Antikörper nicht spezifisch genug an die p47phox-Proteine bindet. Darüber hinaus ist der verwendete Antikörper nicht für die Durchflusszytometrie etabliert und möglicherweise für dieses Messverfahren nicht geeignet.

#### **5.2.5 Zusammenfassung und Ausblick**

Es wurde zum ersten Mal ein möglicher Einfluss von *ψNCF1 Typ I und II* auf die ROS-Produktion und Krankheitsschwere von Kindern, die an Malaria erkrankt sind und den möglichen Einfluss auf die Anfälligkeit von MS in einer deutschen und polnischen Population untersucht.

Es fand sich in der Gruppe der Kinder mit komplizierter Malaria eine höhere maximale und kumulative ROS-Produktion in PBMC bei Kindern mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\leq 1:1$  im Vergleich zu den Kindern mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\geq 2:1$  während der akuten Krankheitsphase.

Diese Ergebnisse sollten noch in einer Studie mit einer größeren Malariapatientenzahl bestätigt werden.

Die  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten sind nicht assoziiert mit Suszeptibilität für MS oder Krankheitsschwere der Malaria. Jedoch fand sich eine Assoziation mit dem Erkrankungsalter von MS-Patienten. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass ein  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotient von 1:1 zu einer vermehrten Expression von p47phox führt und es dadurch zu einer vermehrten Produktion an ROS kommt, welche die T-Zell-Antwort beeinflusst. Basierend auf diesen Ergebnissen sind weitere Studien mit größeren Patientenzahlen nötig um diese Hypothese zu stützen.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 *Myasthenia Gravis und PTPN22*

Das PTPN22 T-Allel ist mit MG in Patientensubgruppen assoziiert. In den Subgruppen der MG-Patienten ohne Thymom mit positivem Anti-Titin-Antikörper-Status und der MG-Patienten ohne Thymom mit positivem Anti-AChR-Antikörper-Status zeigt sich eine signifikante Überrepräsentation des T-Allels des PTPN22-SNP verglichen mit der Kontrollgruppe, jedoch zeigt sich keine signifikante Erhöhung des T-Allels in den Subgruppen der MG-Patienten ohne Thymom, die keine Anti-Titin- oder Anti-AChR-Antikörper aufweisen. In der Thymomgruppe der MG-Patienten entsprach die T-Allel-Frequenz der Kontrollgruppe. Daraus lässt sich schließen, dass das PTPN22 T-Allel bei MG-Patienten ohne Thymom eine Rolle in der Pathogenese spielt. Bei MG-Patienten mit Thymom scheint das PTPN22 T-Allel hingegen keinen Einfluss auf die Pathogenese der MG zu haben.

In einer französischen Studie [Vandiedonck et al., 2006] zeigte sich, konträr zu unserer Studie, eine Assoziation des T-Allels mit MG in der Non-Thymom-Patientensubgruppe, die keine Anti-Titin-Antikörper aufwies und keine Assoziation in der Patientensubgruppe, die Anti-Titin-Antikörper aufwies.

In einer schwedischen Studie [Lefvert et al., 2008] zeigte sich eine Überrepräsentation des T-Allels in MG-Patienten verglichen mit den Kontrollpersonen. In dieser Studie wurden keine Anti-Titin-Antikörper gemessen.

In allen drei Studien zeigte sich übereinstimmend eine höhere T-Allel-Frequenz in Patienten ohne Thymom verglichen mit den jeweiligen Kontrollgruppen. Dies festigt die Hypothese, dass die PTPN22 1858\*C/T Substitution in der Pathogenese der MG bei Patienten, die kein Thymom aufweisen, eine Rolle spielt.

Bisher ist noch nicht der genaue Mechanismus geklärt, durch den die PTPN22 1858\*C/T Substitution in die Genese der AIE eingreift. Jedoch finden Veränderungen im Zytokinprofil der T- und B-Zellen statt. Die Auswirkungen die

die Zytokinveränderungen auf die T- und B-Zellen und dadurch auf das Immunsystem haben, sollten noch genauer untersucht werden um die Bedeutung der PTPN22 1858\*C/T Substitution in der Pathogenese der AIE besser zu verstehen.

## **6.2 NCF1 und Multiple Sklerose**

Wir fanden keine signifikante Assoziation der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten mit MS in polnischen oder deutschen Patienten. Der  $\Delta$ GT/GTGT-Quotient hat desweiteren keinen Einfluss auf die Krankheitsschwere, ist jedoch assoziiert mit dem Erkrankungsalter.

Der arithmetische Mittelwert des Erkrankungsalters der MS-Patienten mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  lag mit 32,2 Jahren um 2,9 Jahre höher als der der MS-Patienten mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$ . In der Gruppe der MS-Patienten mit schubförmigem Krankheitsstart lag der arithmetische Mittelwert des Erkrankungsalters der MS-Patienten mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\leq 1:1$  mit 31,7 Jahren um 3,3 Jahre höher als der der Vergleichsgruppe mit einem  $\Delta$ GT/GTGT-Quotienten von  $\geq 2:1$ .

Das *Typ II  $\psi$ NCF1* stellt somit keinen genetischen Faktor für die Krankheitsanfälligkeit und die Krankheitsentwicklung für MS innerhalb der deutschen und polnischen Bevölkerung dar, hat aber einen Einfluss auf das Erkrankungsalter.

Dies führt zu der Hypothese, dass das *Typ II  $\psi$ NCF1* wie ein *NCF1*-Gen transkribiert und translatiert wird. Dadurch könnte die Menge des intrazellulären NCF1 erhöht sein, wodurch die NADPH-Oxidase mehr ROS produzieren könnte. Diese ROS beeinflussen die T-Zell-Antwort über den T-Zell-Rezeptor-Signalweg, wodurch es letztendlich zu einem späteren Krankheitsbeginn der MS kommen könnte.

Basierend auf diesen Ergebnissen sind weitere Studien mit größeren Patientenzahlen nötig um diese Hypothese zu stützen.

### **6.3 NCF1 und Malaria**

Es fand sich in der Gruppe der Kinder mit komplizierter Malaria eine höhere maximale und kumulative ROS-Produktion in PBMC bei Kindern mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\leq 1:1$  im Vergleich zu den Kindern mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\geq 2:1$  während der akuten Krankheitsphase. Die Gruppe der Malaria-Patienten mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\leq 1:1$  tendierte zu geringeren Hämoglobin-Konzentrationen als die mit einer Ratio von  $\geq 2:1$ .

Die Tendenz für eine höhere ROS-Produktion im Blut von Kindern mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\leq 1:1$  innerhalb der Gruppe von Patienten mit schwerer Malaria während der akuten Krankheitsphase verglichen mit denen mit einem  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten von  $\geq 2:1$  ist mit dem Ergebnis einer früher veröffentlichten Studie vereinbar [Heyworth et al., 2003]. Der direkte Zusammenhang zwischen der erhöhten ROS-Produktion durch ein funktionierendes *Typ II  $\psi\text{NCF1}$*  konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Da keine Assoziation der  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotienten mit der Parasitämie oder der Parasiten-Clearance-Zeit nachgewiesen wurde, kann geschlossen werden, dass der  $\Delta\text{GT}/\text{GTGT}$ -Quotient keine größere Rolle im Krankheitsverlauf der Malaria spielt.

Da die Fallzahlen unserer Studie gering waren, wäre es wünschenswert, wenn diese Ergebnisse noch in einer weiteren Studie mit Malariapatienten mit Schwerpunkt auf der akuten Phase der Krankheit bestätigt würden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Achiron, A., Gabbay, U., Gilad, R., Hassin-Baer, S., Barak, Y., Gornish, M., Elizur, A., Goldhammer, Y., Sarova-Pinhas, I. (1998). Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis, effect on relapses. *Neurology* 50, 398-402
2. Achiron, A., Kishner, I., Sarova-Pinhas, I., Raz, H., Faibel, M., Stern, Y., Lavie, M., Gurevich, M., Dolev, M., Magalashvili, D., Barak, Y. (2004). Intravenous immunoglobulin treatment following the first demyelinating event suggestive of multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch. Neurol.* 61, 1515-1520
3. Albert, M., Antel, J., Brueck, W., Stadelmann, C. (2007). Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 17, 129-38
4. Barcellos, L. F., Oksenberg, J. R., Green, A. J., Bucher, P., Rimmler, J. B., Schmidt, S., Garcia, M. E., Lincoln, R. R., Pericak-Vance, M. A. Haines, J. L., Hauser, S. L. (2002). Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis. *Brain* 125, 150-158
5. Barnett, M. H., Prineas, J. W. (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann. Neurol.* 55, 458-468
6. Begovich, A. B., Caillier, S. J., Alexander, H. C., Penko, J. M., Hauser, S. L., Barcellos, L. F., Oksenberg, J. R. (2005). The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 is not associated with multiple sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 184–187
7. Begovich, A. B., Carlton, V. E., Honigberg, L. A., Schrodi, S. J., Chokkalingam, A. P., Alexander, H. C., Ardlie, K. G., Huang, Q., Smith, A., Spoerke, J., Conn, M., Chang, M., Chang, S.-Y., Saiki, R., Cantanese, J., Leong, D., Garcia, V., McAllister, L., Jeffery, D., Lee, A., Batliwalla, F., Remmers, E., Criswell, L., Seldin, M., Kastner, D., Amos, C., Sninsky, J., Gregersen, P. (2004). A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 330–337
8. Bell, G. I., Horita, S., Karam, J. (1984). H.A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33, 176–183
9. Bertrams, J., Kuwert, E. (1972). HL-A antigen frequencies in multiple sclerosis. Significant increase of HL-A3, HL-A10 and W5, and decrease of HL-A12.

- Eur. J. Neurol. 7, 74–78
10. Besinger, U. A., Toyka, K.V., Heininger, K., Fateh-Moghadam, A., Schumm, F., Sandel, P., Birnberger, K. L. (1981).  
Long-term correlation of clinical course and acetylcholine receptor antibody in patients with myasthenia gravis.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 377, 812-813
  11. Bilinska, M. (2002).  
Seronegative Myasthenia gravis  
Pol. Merkuriusz Lek. 12, 49-53
  12. Bø, L. Vedeler, C. A., Nyland, H. I. Trapp, B. D. Mørk, S. J. (2003).  
Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62, 723-32.
  13. Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., MacMurray, J., Meloni, G. F., Lucarelli, P., Pellecchia, M., Eisenbarth, G. S., Comings, D., Mustelin, T. (2004).  
A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes.  
Nat. Genet. 36, 337–338
  14. Brand, O. J., Lowe, C. E., Heward, J. M., Franklyn, J. A., Cooper, J. D., Todd, J. A., Gough, S. C. (2007).  
Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves' disease using a multilocus test and tag SNPs.  
Clin. Endocrinol. 66, 508-512
  15. Brex, P. A., Ciccarelli, O., O'Riordan, J. I., Sailer, M., Thompson, A. J., Miller, D. H. (2002).  
A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis.  
N. Engl. J. Med. 346, 158-164
  16. Bruck, W., Schmied, M., Suchanek, G., Brcuk, Y., Breitschopf, H., Poser, S., Lassmann, H. (1994).  
Oligodendrocytes in the early course of multiple sclerosis.  
Ann. Neurol. 35, 65-73
  17. Campbell, A. K. (1988).  
Chemiluminescence. Principles and Applications in Biology and Medicine.  
VCH Publishers (UK) Ltd., Cambridge, Great Britain.
  18. Cantón, I. Akhtar, S., Gavalas, N. G., Gawkrödger, D. J., Blomhoff, A., Watson, P. F., Weetman, A. P., Kemp, E. H. (2005).  
A singlenucleotide polymorphism in the gene encoding lymphoid protein tyrosine phosphatase (PTPN22) confers susceptibility to generalised vitiligo.  
Genes. Immun. 6, 584-587
  19. Chen, X.J., Qiao, J., Xiao, B. G., Lu, C.Z. (2004).  
The significance of titin antibodies in myasthenia gravis – correlation with thymoma and severity of myasthenia gravis.  
J. Neurol. 251, 1006–1011
  20. Christensen, P. B., Jensen, T. S., Tsiropoulos, I., Sørensen, T., Kjaer, M. Højer-Pedersen, E., Rasmussen, M. J., Lehfeldt, E. (1995).

- Associated autoimmune diseases in myasthenia gravis. A population-based study.  
Acta. Neurol. Scand. 91, 192-195
21. Cloutier, J. F., Veillette, A. (1996).  
Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells.  
EMBO J. 15, 4909–4918
22. Cloutier J.-F. and Veillette A. (1999).  
Cooperative inhibition of T-cell antigen receptor signaling by a complex between a kinase and a phosphatase.  
J. Exp. Med. 189, 111-121
23. Cohen, S., Dadi, H., Shaoul, E., Sharfe, N., Roifman, C. M. (1999).  
Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp.  
Blood 93, 2013-2024
24. Cohen, J. A., Goodman, A. D., Heidenreich, F. R. (2001).  
Results of IMPACT, a phase 3 trial of interferon beta-1a in secondary progressive multiple sclerosis.  
Neurology 56, A148-A149
25. Comabella, M., Balashov, K., Issazadeh, S., Smith, D., Weiner, H. L., Khoury, S. J. (1998).  
Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamid therapy.  
J. Clin. Invest. 102, 671-678
26. Comabella, M., Craig, D. W., Camiña-Tato, M., Morcillo, C., Lopez, C., Navarro, A., Rio, J., Biomarker MS Study Group, Montalban, X., Martin, R. (2008).  
Identification of a novel risk locus for multiple sclerosis at 13q31.3 by a pooled genome-wide scan of 500,000 single nucleotide polymorphisms.  
PLoS ONE 3, e3490
27. Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Durelli, L., Edan, G., Fernández, O., Hartung, H., Seeldrayers, P., Sørensen, P. S., Rovaris, M., Martinelli, V., Hommes, O. R. (2001a).  
Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study.  
Lancet 357, 1576–1582
28. Comi, G., Filippi, M., Wolinsky, J. S., (2001b).  
European / Canadian multicenter, double blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European / Canadian Glatiramer Acetate Study Group.  
Ann. Neurol. 49, 290-297
29. Compston, D. A., Batchelor, J. R., McDonald, W. I. (1976).  
B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis.  
Lancet 2, 1261–1265
30. Cursiefen, S., Flachenecker, P., Toyka, K. V., Rieckmann, P. (2000).



- Escalating immunotherapy with mitoxantrone in patients with very active relapsing-remitting or progressive multiple sclerosis.  
*Eur. Neurol.* 43, 186-187
31. Del Campo, M., Antonell, A., Magano, L. F., Muñoz, F. J., Flores, R., Bayés, M., Pérez Jurado, L. A. (2006).  
 Hemizygoty at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension.  
*Am. J. Hum. Genet.* 78, 533-542
32. DeLeo R. F., Renee, J., McCormick, S., Nakamura, M., Apicella, M., Weiss, J. P., Nauseef, W. M. (1998).  
 Neutrophils Exposed to Bacterial Lipopolysaccharide Upregulate NADPH Oxidase Assembly.  
*J. Clin. Invest.* 101, 455-463
33. Dehmeshki, J., Chard, D. T., Leary, S. M., Watt, H. C., Silver, N. C., Tofts, P. S., Thompson, A. J., Miller, D. H. (2003).  
 The normal appearing grey matter in primary progressive multiple sclerosis: a magnetisation transfer imaging study.  
*J Neurol.* 250, 67-74
34. De Stefano, N., Narayanan, S., Francis, G. S., Arnaoutelis, R., Tartaglia, M. C., Antel, J. P., Matthews, P. M., Arnold, D. L. (2001).  
 Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability.  
*Arch Neurol.* 58, 65-70
35. Ebers, G. C., Sadovnick, A. D., Risch, N. J. (1995).  
 A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis.  
*Nature* 377, 150-151
36. Egg, R., Reindl, M., Deisenhammer, F., Linington, C., Berger, T. (2001).  
 Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis.  
*Mult. Scler.* 5, 285-289
37. Ellison, G. W., Myers, L. W., Leake, B. D. (1994).  
 Design strategies in multiple sclerosis clinical trials. The Cyclosporine Multiple Sclerosis Study Group.  
*Ann. Neurol.* 36, 108-112
38. Elstner, E. F., (1991).  
 Oxygen Radicals – Biochemical basis for their Efficacy.  
*Klin. Wochenschr.* 69, 949-956
39. Engel, A. G., Tsujihata, M., Lindstrom, J. M., Lennon, V. A. (1976).  
 The motor end plate in myasthenia gravis and in experimental autoimmune myasthenia gravis: a quantitative ultrastructural study.  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 274, 60-79
40. Evangelou, N., Jackson, M., Beeson, D., Palace J. (1999).  
 Association of the APOE epsilon 4 allele with disease activity in multiple sclerosis.  
*J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67, 203-205
41. Evoli, A., Tonali, P. A., Padua, L., Monaco, M. L., Scuderi, F., Batocchi, A. P., Marino, M., Bartocchioni, E. (2003).  
 Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis.

- Brain. 126, 2304-2311
42. Fernard, G. H., Yeh, R. F., Hauser, S. L., Oksenberg, J. R., Baranzini, S. E. (2005).  
Mapping gene activity in complex disorders: Integration of expression and genomic scans for multiple sclerosis.  
J. Neuroimmunol. 167, 157-169
43. Ferrero, B., Aimo, G., Pagni, R., Bergamasco, B., Bongioanni, M. R., Bergamini, L., Durelli, L. (1997).  
Modified and improved anti-acetylcholine receptor (AChR) antibody assay: comparison of analytical and clinical performance with conventional anti-AChR antibody assay.  
Clin. Chem. 43, 824-831
44. Ferretti, G., Bacchetti, T., DiLudovico, F., Viti, B., Angeleri, V. A., Danni, M., Provinciali, L. (2006).  
Intracellular oxidative activity and respiratory burst of leukocytes isolated from multiple sclerosis patients.  
Neurochem. Int. 48, 87-92
45. Finnie, I. A., Shields, R., Sutton, R., Donnelly, R., Morris, A. I. (1994).  
Crohn's disease and myasthenia gravis: a possible role for thymectomy.  
Gut. 35, 278-279.
46. Flachenecker, P., Zettl, U. K., Goetze, U., Haas, J., Schimrigk, S., Elias, W., Pette, M., Eulitz, M., Hennig, M., Bertram, J., Hollweck, R., Neiss, A., Daumer, M., Pitschnau-Michel, D., Rieckmann, P. (2005).  
MS-Register in Deutschland: 1. Design und erste Ergebnisse der Pilotphase.  
Nervenarzt. 76, 967-975
47. Gale, C. R., Martyn, C. N. (1995).  
Migrant studies in multiple sclerosis.  
Prog. Neurobiol. 47, 425-48
48. Gautel, M., Lakey, A., Barlow, D. P., Holmes, Z., Scales, S., Leonard, K., Labeit, S., Mygland, A., Gilhus, N. E., Aarli, J. A. (1993).  
Titin antibodies in myasthenia gravis: Identification of a major immunogenic region of titin.  
Neurology, 43, 1581-1585
49. Gelderman, K. A., Hultqvist, M., Pizzolla, A., Zhao, M., Nandakumar, K. S., Mattsson, R., Holmdahl, R. (2007).  
Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species.  
J. Clin. Invest. 117, 3020-3028.
50. Gellert, K., Boettger, J., Martin, T. (2005)  
The Thoracoscopic Thymectomy for Myasthenia Gravis.  
Zentralbl. Chir. 130, 422-427
51. Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L., Raine, C. S. (1999).  
Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis.  
Nat. Med. 5, 170-175
52. Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D. (2004).

- The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy.  
J. Neurol. 251, 261-268
53. Gjørloff-Wingren, A., Saxena, M., Williams, S., Hammi, D., Mustelin, T. (1999).  
Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP.  
Eur. J. Immunol. 29, 3845 – 3854
54. Gold, R., Rieckmann, P. (2004)  
Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose.  
3. Auflage, Bremen, UNI-MED
55. Goodin, D. (2000).  
The North American secondary progressive multiple sclerosis trial: clinical results. Satellite (Betaseron in secondary progressive multiple sclerosis) at the 10<sup>th</sup> European neurological society meeting; Jerusalem
56. Goodin, D., Frohman, E. M., Garmany, G. P. Jr., Halper, J., Likosky, W. H., Lublin, F. D., Silberberg, D. H., Stuart, W. H., van den Noort, S. (2002).  
Disease modifying therapies in multiple sclerosis – Report of the therapeutics and technology assessment subcommittee of the American academy of neurology and the MS counsel for clinical practice guidelines.  
Neurology 58, 169–178.
57. Greve, B., Lehman, L. G., Lell, B., Luckner, D., Schmidt-Ott, R., Kremsner, P. G. (1999).  
High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with Plasmodium falciparum malaria.  
J. Infect. Dis. 179, 1584-1586
58. Greve, B., Kremsner, P. G., Lell, B., Luckner, D., Schmid, D. (2000).  
Malarial anaemia in African children associated with high oxygen-radical production.  
Lancet 355, 40-41
59. Greve, B., Vijayakrishnan, L., Kubal, A., Sobel, R. A., Peterson, L. B., Wicker, L. S., Kuchroo, V. K. (2004).  
The diabetes susceptibility locus Idd5.1 on mouse chromosome 1 regulates ICOS expression and modulates murine experimental autoimmune encephalomyelitis.  
J. immunol. 173, 157-163
60. Greve, B., Simonenko, R., Illes, Z., Peterfalvi, A., Hamdi, N., Mycko, M. P., Selmaj, K. W., Rozsa, C., Rajczy, K., Bauer, P., Berger, K., Weissert, R. (2007).  
Multiple sclerosis and the CTLA4 autoimmunity polymorphism CT60: no association in patients from Germany, Hungary and Poland.  
Mult. Scler. 14, 153-158
61. Grob, D., Arsura, E. L., Brunner, N. G., Namba, T. (1987).  
The course of myasthenia gravis and therapies affecting outcome.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 505, 472-499
62. Hafler, D. A. (2004).

- Multiple sclerosis.  
J. Clin. Invest. 113, 788-794
63. Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., Daly, M. J., DeJager, P. L., de Bakker, P. I. W., Gabriel, S. B., Mirel, D. B., Ivinson, A. J., Pericak-Vance, M. A., Gregory, S. G., Rioux, J. D., McCauley, J. L., Haines, J. L., Barcellos, L. F., Cree, B., Oksenberg, J. R., Hauser, S. L. (2007).  
Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study.  
N. Engl. J. Med., 357, 851-862.
64. Haines, J. L., Terwedow, H. A., Burgess, K., Pericak-Vance, M. A., Rimmler, J. B., Martin, E. R., Oksenberg, J. R., Lincoln, R., Zhang, D. Y., Banatao, D. R. Gatto, N., Goodkin, D. E., Hauser, S. L. (1998).  
Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity.  
Hum. Mol. Genet. 7, 1229-1234
65. Harbord, M., Hankin, A., Bloom, S., Mitchison, H. (2003).  
Association between p47phox pseudogenes and inflammatory bowel disease.  
Blood 101, 3337
66. Hein, T., Hopfenmueller, W. (2000).  
Hochrechnung der Zahl an Multipler Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland.  
Nervenarzt 71, 288-294
67. Heun, R., Kappos, L., Bittkau, S., Staedt, D., Rohrbach, E., Schuknecht, B. (1988).  
Magnetic resonance imaging and early diagnosis of multiple sclerosis (letter).  
Lancet 2, 1202-1203
68. Heyworth, P. G., Noack, D., Cross, A. R. (2002).  
Identification of a novel NCF-1 (p47-phox) pseudogene not containing the signature GT deletion: significance for A47 degrees chronic granulomatous disease carrier detection.  
Blood 100, 1845-1851
69. Heyworth, P. G., Cross, A. R., Curnutte, J. T. (2003).  
Chronic granulomatous disease.  
Curr. Opin. Immunol. 15, 578-584
70. Ho, S. L., Sham, M. Williams, A. C. (1992).  
Idiopathic thrombocytopenic purpura and autoimmune thyroiditis in a patient with myasthenia gravis.  
Muscle Nerve 5, 966-967.
71. Hultqvist, M., Olofsson, P., Holmberg, J. Bäckström, B. T., Tordsson, J., Holmdahl, R. (2004).  
Enhanced autoimmunity, arthritis and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 12646-12651
72. Hultqvist, M. and Holmdahl R. (2005).  
Ncf1 (p47phox) polymorphism determines oxidative burst and the severity of arthritis in rats and mice.

- Cell Immunol 233, 97-101
73. Jacobs, L. D., Beck, R. W., Simon, J. H., Kinkel, R. P., Brownschidle, C. M., Murray, T. J., Simonian, N. A., Slasor, P. J., Sandrock, A. W. (2000). Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* 343, 898-904
74. Jagiello, P., Aries, P., Arning, L., Wagenleiter, S. E., Csernok, E., Hellmich, B., Gross, W. L., Epplen, J. T. (2005). The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 52, 4039-4043
75. Johnson, K., Brooks, B. R., Ford, C. C., Goodman, A., Guarnaccia, J., Lisak, R. P., Myers, L. W., Panitch, H. S., Pruitt, A., Rose, J. W., Kachuck, N., Wolinsky, J. S. (2000). Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Multiple sclerosis* 6, 255-266.
76. Kachalsky, S. G., Aladjem, M., Barchan, D., Fuchs, S. (1993). The ligand binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor: immunological analysis. *FEBS Lett* 318, 264-268
77. Kamata, H. and Hirata, H. (1999). Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11, 1-14
78. Kappos, L., Antel, J., Comi, G., Montalban, X., O'Connor, P., Polman, C. H., Haas, T., Korn, A. A., Karlsson, G., Radue, E. W. (2006). Oral Fingolimod (FTY720) for Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 355, 1124-1140
79. Khan, O. A., Tselis, A. C., Kamholz, J. A., Garbern, J. Y., Lewis, R. A., Lisak, R. P. (2001). A prospective, open-label treatment trial to compare the effect of IFNbeta-1a (Avonex), IFNbeta-1b (Betaseron) and glatiramer acetate (Copaxone) on the relapse rate in relapsing-remitting multiple sclerosis: results after 18 months of therapy. *Multiple Sclerosis* 7, 349-353
80. Köhler, W., Sieb, J. P. (2003). Pathologie. Myasthenia gravis. Bremen: UNI-MED Verlag
81. Kubota, A., Komiyama, A., Hasegawa, O. (1997). Myasthenia gravis and alopecia areata. *Neurology*, 48, 774-775.
82. Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., Bruck, W. (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212
83. Kurtzke, J. F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability Status scale (EDSS)].

- Neurology 33, 1444-1452
84. Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C. F., Stadelmann, C., Brueck, W., Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J. E., Lassmann, H. (2005). Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis.  
Brain. 128, 2705-2712
85. Kyogoku, C., Langefeld, C. D., Ortmann, W. A., Lee, A., Selby, S., Carlton, V., Chang, M., Ramos, P., Baechler, E., Batliwalla, F., Novitzke, J., Williams, A., Gillett, C., Rodine, P., Graham, R., Ardlie, K., Gaffney, P., Moser, K., Petri, M., Begovich, A., Gregersen, P., Behrens, T. (2004). Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE.  
Am. J. Hum. Genet. 75, 504–507
86. Ladner, M. B., Bottini, N., Valdes, A. M., Noble, J.A. (2005) Association of the single nucleotide polymorphism C1858T of the PTPN22 gene with type 1 diabetes.  
Hum. Immunol. 66, 60–64
87. Langemann, H., Kabiersch, A., Newcombe, J. (1992). Measurement of low-molecular-weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis.  
Eur. Neurol. 32, 248-252
88. Langer-Gould, A., Steinman, L. (2006). Progressive multifocal leukoencephalopathy and multiple sclerosis: lessons from natalizumab.  
Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 6, 253-258
89. Lauer, K. (1994). Multiple Sclerosis in the old world: the new old map.  
In: Multiple Sclerosis in Europe. An Epidemiological Update. Edited by W. Firnhaber, K. Lauer. Darmstadt: LTV Press, 14-27
90. Lee, A. T., Li, W., Liew, A., Bombardier, C., Weisman, M., Massarotti, E. M., Kent, J., Wolfe, F., Begovich, A. B., Gregersen, P. K. (2005). The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status.  
Genes. Immun. 6, 129-133
91. Lee, Y. H., Rho, Y. H., Choi, S. J., Ji, J. D., Song, G. G., Nath, S. K., Harley, J. B. (2007). The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases – a meta-analysis.  
Rheumatology 46, 49-56.
92. Lefvert, An. K., Zhao, Y., Ramanujam, R., Yu, S., Pirskanen, R., Hammarström, Ln. (2008). PTPN22 R620W promotes production of anti-AChR autoantibodies and IL-2 in myasthenia gravis.  
J. Neuroimmunol., 197, 110-113
93. Livak, K. J., Marmaro, J., Todd, J. A. (1995). Towards fully automated genome-wide polymorphism screening.

- Nat. Genet. 9, 341-342
94. Loehrer P. J. (1999)  
Current approaches to the treatment of thymoma.  
Ann Med. 31, 73-79
95. Lossos, A., River, Y., Eliakim, A., Steiner, I. (1995).  
Neurologic aspects of inflammatory bowel disease.  
Neurology, 45, 416-421
96. Lovas, G., Szilágyi, N., Majtényi, K., Palkovits, M., Komoly, S. (2000).  
Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques.  
Brain. 123, 308-317
97. Lucchinetti, C. F., Brueck, W., Rodriguez, M., Lassmann, H. (1996).  
Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicate heterogeneity on pathogenesis.  
Brain Pathol. 6, 259-274
98. Luebke, E., Freiburg, A., Skeie, G. O., Kolmerer, B., Labeit, S., Aarli, J. A., Gilhus, N. E., Wollmann, R., Wussling, M., Rüegg, J. C., Linke, W. A. (1999).  
Striational autoantibodies in myasthenia gravis patients recognize I-band titin epitopes.  
J. Neuroimmunol., 81, 98-108
99. MacDonald (1957).  
The epidemiology and control of malaria.  
1. Auflage, Oxford University press, London
100. Marx, A., Wilisch, A., Schultz, A., Gattenlöhner, S., Nenninger, R. (1997).  
Pathogenesis of myasthenia gravis.  
Virchows Arch. 355-364
101. Matthews, W. B. (1991).  
Clinical aspects. 5. Course and prognosis.  
In: McAlpine`s Multiple Sclerosis. Edited by WB Matthews. Edinburgh-London: Churchill Livingstone. 139-163
102. McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B. Y., Wolinsky, J. S. (2001).  
Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.  
Ann. Neurol. 50, 121-127
103. Milkiewicz, P., Pache, I., Buwaneswaran, H., Liu, X., Coltescu, C., Heathcote, E. J., Siminovitch, K. A. (2006).  
The PTPN22 1858T variant is not associated with primary biliary cirrhosis.  
Tissue Antigens. 67, 434-437
104. Miller, D. H., Barkhof, F., Nauta, J. J. P. (1993).  
Gadolinium enhancement increases the sensitivity of MRI in detecting disease activity in multiple sclerosis.  
Brain 116, 1077-1094

105. Miller, D. M., Weinstock-Guttman, B., Béthoux, F., Lee, J. C., Beck, G., Block, V., Durelli, L., LaMantia, L., Barnes, D., Sellebjerg, F., Rudick, R. A. (2000).  
A meta analysis of methylprednisolone in recovery from multiple sclerosis exacerbations.  
*Mult. Scler.* 6, 267-273
106. Mizobuchi, S., Yamashiro, T., Nonami, Y., Yamamoto, A., Kume, M., Nakaya, H., Sawada, T., Taguchi, H., Moriki, T., Ogoshi, S. (1998).  
Pure red cell aplasia and myasthenia gravis with thymoma: a case report and review of the literature.  
*Jpn. J. Clin. Oncol.* 28, 696-701
107. Myhr, K. M., Raknes, G., Nyland, Vedeler C. (1999).  
Immunoglobulin G Fc receptor (Fc gamma R) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS.  
*Neurology* 52, 1771-1776
108. Naito, S., Manerow, N., Mickey, M. R., Terasaki, P. I. (1972).  
Multiple sclerosis: association with HL-A3.  
*Tissue Antigens* 2, 1-4
109. Neumann, H., Medana, I. M., Bauer, J., Lassmann, H. (2002).  
Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases.  
*Trends Neurosci.* 25, 313-319
110. Nistor I., Nair, R. P., Stuart, P., Hiremagalore, R., Thompson, R. A., Jenisch, S., Weichenthal, M., Abecasis, G. R., Qui, Z. S., Christophers, E., Lim, H. W., Voorhees, J. J., Elder, J. T. (2005).  
Protein tyrosine phosphatase gene PTPN22 polymorphism in psoriasis: lack of evidence for association.  
*J. Invest. Dermatol.* 125, 395-396
111. O'Connor, K. C., Appel, H., Bregoli, L., Call, M. E., Catz, I., Chan, J. A., Moore, N. H., Warren, K. G., Wong, S. J., Hafler, D. A., Wucherpfennig, K. W. (2005).  
Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein.  
*J. Immunol.* 175, 1974-1982
112. Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J.-P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., Cho, J. H. (2001).  
A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.  
*Nature* 411, 603-606
113. Olofsson, P., Holmberg, J., Tordsson, J., Lu, S., Akterstrom, B., Holmdahl, R. (2003).  
Positional identification of Ncf1 as a gene that regulates arthritis severity in rats.  
*Nat. Genet.* 33, 25-32
114. Onengut-Gumuscu, S., Ewens, K. G., Spielman, R. S., Concannon, P. (2004).



- A functional polymorphism (1858C/T) in the PTPN22 gene is linked and associated with type I diabetes in multiplex families.  
*Genes Immun.* 5, 678–680
115. Otto, H. F. (1998).  
 Pathologie des Thymus.  
 Berlin: Springer-Verlag, 142-143
116. Padgett, B. L., Walker, D. L. (1973).  
 Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy.  
*J. Infect. Dis.* 127, 467-470
117. Palace, J., Newsom-Davis, J., Lecky, B. (1998)  
 A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis.  
*Neurology* 50, 1778–1783.
118. Papazian, O. (1992).  
 Transient neonatal myasthenia gravis.  
*J. Chil. Neurol.*, 7, 135-141
119. Pekmezović, T., Lavrnjčić, D., Jarebinski, M., Apostolski, S. (2006).  
 Epidemiology of myasthenia gravis [Article in Serbian].  
*Srp. Arh. Celok. Lek.* 134, 453-456
120. Pestronk, A., Drachman, D. B., Self, S. G. (1985).  
 Measurement of junctional acetylcholine receptors in myasthenia gravis: clinical correlates.  
*Muscle Nerve* 8, 245-251
121. Peterson, J. W., Bø, L., Mørk, S., Chang, A., Trapp, B. D. (2001).  
 Transected neurites, apoptotic neurons and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions.  
*Ann. Neurol.* 50, 389-400
122. Phadke, J. G. (1990).  
 Clinical aspects of multiple sclerosis in north-east Scotland with particular reference to its course and prognosis.  
*Brain.* 113, 1597-1628
123. Polman, C. H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Metz, L. M., McFarland, H. F., O'Connor, P. W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Weinshenker, B. G., Wolinsky, J. S. (2005).  
 Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria".  
*Ann. Neurol.* 58, 840-846
124. Polman, C. H., O'Conner, P. W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D. H., Phillips, J. T., Lublin, F. D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M. A., Sandrock, A. W. (2006).  
 A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis.  
*N. Engl. J. Med.* 354, 899-910
125. Poser, S., Wikstrom, J., Bauer, H. J. (1979).  
 Clinical data and the identification of special forms of multiple sclerosis in 1271 cases studied with a standardized documentation system.

- J. Neurol. Sci. 40, 159-168
126. Poser, S., Poser, W., Schlaf, G., Firnhaber, W., Lauer, K., Wolter, M., Evers, P. (1986).  
Prognostic indicators in multiple sclerosis.  
Acta. Neurol. Scand. 74, 387-392
127. Prescott, N. J. Fisher, S. A., Onnie, C., Pattini, R., Steer, S., Sanderson, J., Forbes, A., Lewis, C. M., Mathew, C. G. (2005).  
A general autoimmunity gene (PTPN22) is not associated with inflammatory bowel disease in a British population.  
Tissue Antigens 66, 318-320
128. Prineas, J. W., Wright, R. G. (1978).  
Macrophages, lymphocytes and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis.  
Lab. Invest. 38, 409-421
129. Prineas, J. W., Barnard, R. O., Kwon, E. E., Sharer, L. R., Cho, E. S. (1993).  
Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions.  
Ann. Neurol. 5, 22-31
130. Rao, S. M., Leo, G. J., Bernardin, L., Unverzagt, F. (1991a).  
Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns and prediction.  
Neurology 41: 685-691
131. Rao, S. M., Leo, G. J., Ellington, L., Nauertz, T., Bernardin, L., Unverzagt, F. (1991b).  
Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. II. Impact on employment and social functioning.  
Neurology 41: 692-696
132. Rieck, M., Arechiga, A., Onengut-Gumuscu, S., Greenbaum, C., Concannon, P., Buckner, J. H. (2007)  
Genetic Variation in PTPN22 Corresponds to Altered Function of T and B Lymphocytes.  
J. Immunol. 179, 4704-4710.
133. Robertson, N. P., Fraser, M., Deans, J., Clayton, D., Walker, N. Compston, D. A. (1996).  
Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis.  
Brain, 119, 449-455
134. Rose, N. R., Mackay, I. R. (1999).  
The Autoimmune Diseases.  
Academic Press London
135. Rosen G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., Britigan, B.E. (1995).  
Free radicals and phagocytic cells.  
Faseb. J. 9, 200-209
136. Rosen, H., Michel, B. R., Wu, A. Y., VanDevanter, D. R. (1993).  
Inhibition of bacterial DNA synthesis by myeloperoxidase derived oxidants.  
Free. Rad. Biol. Med. 15, 516

137. Rudick, R. A., Cutter, G., Reingold, S. (2002).  
The multiple sclerosis functional composite: a new clinical outcome measure for multiple sclerosis trials.  
Mult. Scler. 8, 359-365
138. Rueda, B., Núñez, C., Orozco, G., López-Nevot, M. A., de la Concha, E. G., Martin, J., Urcelay, E. (2005).  
C1858T functional variant of PTPN22 gene is not associated with celiac disease genetic predisposition.  
Hum. Immunol. 66, 848-852
139. Runmarker, B., Andersen, O. (1993).  
Prognostic factors in a multiple sclerosis incidence cohort with twenty-five years of follow-up.  
Brain. 116, 117-134
140. Runmarker, B., Andersen, O. (1995).  
Pregnancy is associated with a lower risk of onset and a better prognosis in multiple sclerosis.  
Brain. 118, 253-261
141. Schrijver, H. M., Crusius, J. B. A., Uitehaag, B. M. J., García González, M. A., Kostense, P. J., Polman, C. H., Peña, A. S. (1999).  
Association of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist genes with diseases severity in MS.  
Neurology 52, 595-599
142. Sadovnick, A. D., Remick, R. A., Allen, J., Swartz, E., Yee, I. M., Eisen, K., Farquhar, R., Hashimoto, S. A., Hooge, J., Kastrokoff, L. F., Morrison, W., Nelson, J., Oger, J., Paty, D. W. (1996).  
Depression and multiple sclerosis.  
Neurology 46, 628-632
143. Schimrigk, K., Samland, O. (1977).  
Muskelatrophie bei Myasthenia gravis.  
Nervenarzt, 48, 65-68
144. Schumm, F., Stöhr, M. (1984).  
Accessory nerve stimulation in the assessment of myasthenia gravis.  
Muscle Nerve 7, 147-151
145. Schwimbeck, P. L., Dyrberg, T., Drachman, D. B., Oldstone, M. B. A. (1989).  
Molecular mimicry and myasthenia gravis: an autoantigenic site of the acetylcholine receptor  $\alpha$ -subunit that has biologic activity and reacts immunochemically with herpes simplex virus.  
J. Clin. Invest., 84, 1174-1180
146. Sergott, R. C. (1994).  
Ocular myasthenia gravis.  
In: Handbook of myasthenia gravis and myasthenic syndromes  
Hrsg.: Lisak, R. P., New York, Basel, Hongkong: Marcel Dekker, 21-31
147. Shibuya, N., Sato, T., Osame, M., Talvegami, T., Doi, S., Kawanami, S. (1994)  
Immunoabsorption therapy for myasthenia gravis.  
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 57, 578-581

148. Silman, A.J., McGregor, A.J., Thomson, W., Holligan, S., Carthy, D., Farhan, A., Ollier, W. E. R. (1993).  
Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study.  
*Br. J. Rheumatol.* 32, 903–907
149. Smith, K. J., Kapoor, R., Felts, P. A. (1999).  
Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species.  
*Brain Pathol.* 9, 69-92
150. Smyth, D., Cooper, J. D., Collins, J.E., Heward, J. M., Franklyn, J. A., Howson, J. M., Vella, A., Nutland, S., Rance, H. E., Maier, L., Barratt, B. J., Guja, C., Ionescu-Tîrgoviste, C., Savage, D. A., Dunger, D. B., Widmer, B., Strachan, D. P., Ring, S. M., Walker, N., Clayton, D. G., Twells, R. C., Gough, S. C., Todd, J. A. (2004)  
Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes and evidence for its role as a general autoimmunity locus.  
*Diabetes* 53, 3020–3023
151. Suraweera, N., Zampeli, E., Rogers, P., Atkin, W., Forbes, A., Harbord, M., Silver, A. (2004).  
NCF1 (p47phox) and ncf1 pseudogenes are not associated with inflammatory bowel disease.  
*Inflamm. Bowel. Dis.* 10, 758-762
152. Takanami, I., Imamura, T., Kodaira, S. (1995).  
Myasthenia gravis complicated by sarcoidosis.  
*J. Thoracic Cardiovascul. Surg.*, 109, 183-184
153. Thomas, C. E., Mayer, S. A., Gungor, Y., Swarup, R., Webster, E. A., Chang, I., Brannagan, T. H., Fink, M. E., Rowland, L. P. (1997).  
Myasthenic crisis: clinical features, mortality, complications and risk factors for prolonged intubation.  
*Neurology*, 48, 1253-1260
154. Thompson, A. J., Polman, C. H., Miller, D. H., McDonald, W. I., Brochet, B., Filippi, M., Montalban, X., De Sá, J. (1997).  
Primary progressive multiple sclerosis.  
*Brain*, 120, 1085-1096
155. Ueda, H., Howson, J. M. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D. B., Hunter, K. M. D., Smith, A. N., Di Genova, G., Herr, M. H., Dahlman, I., Payne, F., Smyth, D., Lowe, C., Twells, R. C. J., Howlett, S., Healy, B., Nutland, S., Rance, H. E., Everett, V., Smink, L. J., Lam, A. C., Cordell, H. J., Walker, N. M., Bordin, C., Hulme, J., Motzo, C., Cucca, F., Hess, J. F., Metzker, M. L., Rogers, J., Gregory, S., Allahabadia, A., Nithiyanthan, R., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Bingley, P., Gillespie, K. M., Undlien, D. E., Rønningen, K. S., Guja, C., Ionescu-Tîrgoviște, C., Savage, D. A., Maxwell, A. P., Carson, D. J., Patterson, C. C., Franklyn, J. A., Glayton, D. G., Peterson, L. B., Wicker, L. S., Todd, J. A., Gough, S. C. L. (2003).  
Association of the T-cell regulatory gene *CTLA4* with susceptibility to autoimmune disease.  
*Nature* 423, 506-511

156. Uhlemann, A. C., N. A. Szlezak, Vonthein, R., Tomiuk, J., Emmer, S. A., Lell, B., Kreamsner, P. G., Kun, K. J. (2004).  
DNA phasing by TA dinucleotide microsatellite length determines in vitro and in vivo expression of the gp91phox subunit of NADPH oxidase and mediates protection against severe malaria.  
*J. Infect. Dis.* 189, 2227-2234
157. Vaiopoulos, G., Sfikakis, P. P., Kapsimali, V., Boki, K., Panayiotodis, P., Aessopos, A., Tsokos, G. C., Kaklamanis, P. (1994).  
The association of systemic lupus erythematoses and myasthenia gravis.  
*Postgrad. Med. J.*, 70, 741-745
158. Van der Vliet, H. J., Nieuwenhuis, E. E. (2007)  
IPEX as a result of mutations in FOXP3.  
*Clin. Dev. Immunol.* 2007, 2007: 89017
159. Vandiedonck, C., Capdevielle, C., Giraud, M., Krumeich, S., Jais, J.-P., Eymard, B., Tranchant, C., Gajdos, P., Garchon, H.-J. (2006).  
Association of the PTPN22 R620W Polymorphism with Autoimmune Myasthenia Gravis.  
*Ann. Neurol.* 59, 404-407
160. Vang, T., Congia, M., Macis, M. D., Musumeci, L., Orru, V., Zavattari, P., Nika, K., Tautz, L., Tasken, K., Cucca, F., Mustelin, T., Bottini, N. (2005).  
Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant.  
*Nat. Genet.* 37, 1317-1319
161. Vang, T., Miletic, A. V., Arimura, Y., Tautz, L., Rickert, R. C., Mustelin, T. (2008).  
Protein Tyrosine Phosphatases in Autoimmunity.  
*Annu. Rev. Immunol.* 26, 29-55
162. van Oene, M., Wintle, R. F., Liu, X., Yazdanpanah, M., Gu, X., Newman, B., Kwan, A., Johnson, B., Owen, J., Greer, W., Mosher, D., Maksymowych, W., Keystone, E., Rubin, L. A., Amos, C. I., Siminovitch, K. A. (2005).  
Association of the lymphoid tyrosine phosphatase R620W variant with rheumatoid arthritis, but not Crohn's disease, in Canadian populations.  
*Arthritis Rheum.* 52, 1993 – 1998
163. Velaga, M. R., Wilson, V., Jennings, C. E., Owen, C. J., Herington, S., Donaldson, P. T., Ball, S. G., James, R. A., Quinton, R., Perros, P., Pearce, S. H. S. (2004).  
The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease.  
*J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5862–5865
164. Vella, A., Cooper, J. D., Lowe, C. E., Walker, N., Nutland, S., Widmer, B., Jones, R., Ring, S., McArdle, W., Pembrey, M. (2005).  
Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms.  
*Am. J. Hum. Genet.* 76, 773-779

165. Viken, M. K., Amundsen, S. S., Kvien, T. K., Boberg, K. M., Gilboe, I. M., Lilleby, V., Sollid, L. M., Førre, O. T., Thorsby, E., Smerdel, A., Lie, B. A. (2005).  
Association analysis of the 1858C>T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases.  
*Genes. Immun.* 6, 271-273
166. Vyse, T. J., Todd, J.A. (1996).  
Genetic analysis of autoimmune disease.  
*Cell* 85, 311–318
167. Wagenleiter, S. E., Klein, W., Griga, T., Schmiegel, W., Epplen, J. T., Jagiello, P. (2005).  
A casecontrol study of tyrosine phosphatase (PTPN22) confirms the lack of association with Crohn's disease.  
*Int. J. Immunogenet.* 32, 323-324.
168. Walport, M. J., Davies, K.A., Botto, M. (1998).  
C1q and systemic lupus erythematosus.  
*Immunobiology* 199, 265–285
169. Wandstrat, A., Wakeland, E. (2001).  
The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes.  
*Nature Immunology* 2, 802-809
170. Weinshenker, B. B., Ebers, G. C. (1987).  
The natural history of multiple sclerosis.  
*Can. J. Neurol. Sci.* 14, 255-261
171. Weinshenker, B. G., Bass, B., Rice, G. P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers, G. C. (1989).  
The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability.  
*Brain*, 112, 113-146
172. Wicker, L. S., Chamberlain, G., Hunter, K., Rainbow, D., Howlett, S., Tiffen, P., Clark, J., Gonzalez-Munoz, A., Cumiskey, A. M., Rosa, R. L., Howson, J. M., Smink, L. J., Kingsnorth, A., Lyons, P. A., Gregory, S., Rogers, J., Todd, J. A., Peterson, L. B. (2004).  
Fine mapping, gene content, comparative sequencing and expression analyses support Ctla4 and Nramp1 as candidates for Idd5.1 and Idd5.2 in the nonobese diabetic mouse.  
*J. Immunol.* 173, 164-173
173. Wilkins, K. B., Sheikh, E., Green, R., Patel, M., George, S., Takano, M., Diener-West, M., Welsh, J., Howard, S., Askin, F., Bulkley, G. B. (1999).  
Clinical and pathologic predictors of survival in patients with thymoma.  
*Ann Surg.* 230, 562-574
174. Winchester, R. (1992).  
in *Systemic lupus erythematosus* (ed. Lahita, R. G.) 65–85  
Churchill Livingstone, New York
175. Yamamoto, A. M., Gajdos, P., Eymard, B., Tranchant, C., Warter, J. M., Gomez, L., Bourquin, C., Bach, J. F., Garchon, H. J. (2001).

- Anti-titin antibodies in Myasthenia Gravis: Tight association with thymoma and heterogeneity of nonthymoma patients.  
*Arch. Neurol.* 58, 885-890
176. Yousry, T. A., Major, E. O., Ryschkewitsch, C., Fahle, G., Fischer, S., Hou, J., Curfman, B., Miszkiel, K., Mueller-Lenke, N., Sanchez, E., Barkhof, F., Radue, E. W., Jäger, H. R., Clifford, D. B. (2006).  
Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy.  
*N. Engl. J. Med.* 354, 924-933
177. Yudkin, P. L., Ellison, G. W., Ghezzi, A., Goodkin, D. E., Hughes, R. A., McPherson, K., Mertin, J., Milanese, C. (1991).  
Overview of azathioprine treatment in multiple sclerosis.  
*Lancet* 338, 1051-1055
178. Zittoun, J., Tulliez, M. Estournet, B., Goulon, M. (1979).  
Humoral and cellular immunity to intrinsic factor in myasthenia gravis.  
*Scand. J. Haematol.* 23, 442-448
179. Zivadinov, R., Bakshi, R. (2004).  
Central nervous system atrophy and clinical status in multiple sclerosis.  
*J. Neuroimaging.* 14, 27S-35S

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit fertig stellen konnte.

Insbesondere danke ich ganz herzlich Herrn Professor Dr. Dr. Robert Weissert für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Experimentelle Neuroimmunologie im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung durchführen zu können und Herrn Dr. Bernhard Greve für die hervorragende Betreuung, Geduld und Unterstützung in jeder Phase der Dissertationentstehung.

Weiterhin möchte ich den immer freundlichen Kollegen meiner Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre, Hilfsbereitschaft und ausgesprochen gute Zusammenarbeit danken.



## Lebenslauf

Name: Peter Hoffmann  
Geburtsdatum: 22.02.1984  
Geburtsort: Stuttgart-Bad Cannstatt  
Staatsangehörigkeit: deutsch

---

### **Schullaufbahn:**

1990 – 2003                      Grundschule und Gymnasium in Stuttgart

---

### **Studium:**

10/2003 – 05/2010              Studium der Humanmedizin, Eberhard Karls  
Universität Tübingen  
31/08/2005                      erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
02/2008 – 07/2008              Auslandssemester Humanmedizin,  
Universidad de Alcalá, Madrid, Spanien  
11/06/2010                      zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

---

### **Auslandsfamulaturen:**

08/2007 – 09/2007              Famulatur im Al-Thawra-Hospital, Taizz,  
Yemen, Allgemein- und Kinderchirurgie,  
Orthopädie, Verbrennungsstation,  
Tropenerkrankungen  
02/2008 – 03/2008              Famulatur im Hospital Universitario Principe  
de Asturias, Alcalá, Spanien, Dermatologie

**Praktisches Jahr:**

02/2009 – 06/2009	Universitätsspital Zürich, Chirurgie
06/2009 – 10/2009	Grooth Schuur Hospital Cape Town, Innere Medizin
10/2009 – 01/2010	Marienhospital Stuttgart, Neurologie

---

**Doktorarbeit:**

08/2006 – 01/2009	„Regulation von Autoimmunerkrankungen durch den PTPN22 1858*C/T Polymorphismus und die <i>NCF1</i> Gen- / Pseudogenstruktur“ in der Arbeitsgruppe Experimentelle Neuroimmunologie am Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in Tübingen mit Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Weissert und Herrn Dr. Bernhard Greve
-------------------	--

---

**Publikationen:**

Greve\*, B., Hoffmann\*, P., Vonthein, R., Kun, J., Lell, B., Mycko, M.  
P., Selmaj, K. W., Berger, K., Weissert, R., Kreamsner, P. G. (2008).  
*NCF1* gene and pseudogene pattern: association with parasitic  
infection and autoimmunity.

Malar. J. 7, 251

\*geteilte Erstautorenschaft

Greve\*, B., Hoffmann\*, P., Illes, Z., Rozsa, C., Berger, K., Weissert,  
R., Melms, A. (2009).

The autoimmunity polymorphism PTPN22 1858C/T is associated with  
anti-Titin antibody-positive myasthenia gravis.

Eingereicht bei Human Immunology am 06.01.2009

\*geteilte Erstautorenschaft