

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München,  
Lehrstuhl: Physiologische Genomik

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Magdalena Götz

## **Anti-Agrin-Autoantikörper in Seren von Myasthenia gravis Patienten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christiane Gasperi

aus

Speyer

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Kröger

Mitberichterstatter: PD Dr. Sabine Krause  
PD Dr. Angela Abicht  
Prof. Dr. Wolfgang Müller-Felber

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2015

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Christiane Gasperi, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „*Anti-Agrin-Autoantikörper in Seren von Myasthenia gravis Patienten*“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, am 19.10.2015

Christiane Gasperi

## Zusammenfassung

Myasthenia gravis (MG) ist eine neuromuskuläre Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 20-30/1 000 000 Menschen. Die Erkrankung führt zu einer Störung der synaptischen Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte und damit zu einer zunehmenden Schwäche der Muskulatur. In etwa 80 bis 90 Prozent der Patienten mit Myasthenia gravis konnten Autoantikörper gegen den Azetylcholinrezeptor nachgewiesen werden, die für die Symptome verantwortlich sind. In den letzten Jahren wurden bei einigen Myasthenia gravis Patienten Autoantikörper gegen die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) und LRP4 (lipoprotein receptor-related protein) nachgewiesen. Allerdings gibt es immer noch eine geringe Anzahl von Myasthenia gravis Patienten, bei denen noch kein für die Beschwerden ursächlicher Antikörper gefunden werden konnte.

Agrin ist neben LRP4 und MuSK ein weiteres Protein an der neuromuskulären Endplatte, und ist gemeinsam mit den beiden anderen Proteinen für die Bildung und Aufrechterhaltung der für die Erregungsübertragung notwendigen Aggregation von Azetylcholinrezeptoren verantwortlich. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass auch Autoantikörper gegen Agrin zu einer Beeinträchtigung der neuromuskulären Übertragung führen könnten. Auf dieser Hypothese beruht die vorliegende Studie, in der Seren von 54 Patienten mit klinisch diagnostizierter Myasthenia gravis auf das Vorhandensein von anti-Agrin-Antikörpern untersucht wurden.

30 der 54 untersuchten Seren waren seronegativ für Antikörper gegen den Azetylcholinrezeptor und MuSK, 15 Proben hatten erhöhte Konzentrationen an Antikörpern gegen MuSK und 9 davon waren seropositiv für anti-Azetylcholinrezeptor-Antikörper. Als Kontrollgruppe fungierten die Seren von 16 gesunden Probanden. Anstelle von Volllängen-Agrin wurde in den Experimenten mini-Agrin verwendet – ein synthetisches Protein, welches etwa 50 Prozent der Sequenz von Agrin enthält. Der Nachweis der Autoantikörper erfolgte mittels zweier unterschiedlicher Methoden: einem ELISA mit gereinigtem mini-Agrin und immunhistochemischen Färbungen von mit humanem mini-Agrin transfizierten HEK293 Zellen. Durch den ELISA gelang außerdem die Bestimmung der Antikörperkonzentrationen der detektierten anti-Agrin-Antikörper.

In fünf der 54 untersuchten Seren konnten im ELISA erhöhte Konzentrationen an anti-Agrin-Antikörpern nachgewiesen werden. Die Antikörperkonzentrationen lagen zwischen 0,04 und 0,12 nM. Zwei dieser fünf Seren färbten spezifisch mit mini-Agrin transfizierte Zellen an, drei davon zeigten eine spezifische Färbung der neuromuskulären Endplatten in Mausgewebe. In vier der anti-Agrin-Antikörper-positiven Seren waren zuvor Antikörper gegen MuSK nachgewiesen worden; eines der Seren war anti-Azetylcholinrezeptor-Antikörper-positiv und zwei Seren hatten erhöhte Konzentrationen an Antikörpern gegen LRP4.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen das Vorhandensein von Antikörpern gegen Agrin in Patienten mit klinisch diagnostizierter Myasthenia gravis und geben damit Hinweise auf Agrin als ein neues Antigen in der Pathogenese der Erkrankung. In allen fünf der anti-Agrin-Antikörper-positiven Seren waren zuvor Antikörper gegen MuSK, LRP4 oder den Acetylcholinrezeptor nachgewiesen worden. Dies weist auf eine hohe Koinzidenz von Antikörpern gegen unterschiedliche Proteine der neuromuskulären Endplatte in Patienten mit Myasthenia gravis hin.

Insbesondere konnten in dieser Studie zum ersten Mal drei Autoantikörper gegen Proteine der neuromuskulären Endplatte in einem Serum nachgewiesen werden. Inwiefern anti-Agrin-Antikörper an der Entstehung der für die Erkrankung typischen Veränderungen der Muskulatur beteiligt sind, bleibt weiterhin unklar und könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Myasthenia gravis	9
1.1.1	Epidemiologie, Symptomatik und Klassifikation	9
1.1.2	Pathophysiologie und Diagnostik	10
1.1.3	Seronegative Myasthenia gravis	12
1.1.4	Doppel-seronegative Myasthenia gravis als Autoimmunerkrankung	13
1.2	Agrin	14
1.2.1	Struktur von Agrin und mini-Agrin	15
1.2.2	Agrin an der neuromuskulären Endplatte	17
1.3	Fragestellungen dieser Arbeit	19
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1	Material	20
2.1.1	Puffer, Lösungen, Antikörper und Zellmedien	24
2.1.2	Seren	29
2.1.3	Humanes mini-Agrin im pCEPPu-Vektor	30
2.2	Methoden	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.2	Zellbiologische Methoden	34
2.2.3	Biochemische Methoden	35
2.2.4	Tierexperimentelle Methoden	39
2.2.5	Immunhistologische Methoden	39
2.2.6	Statistische Auswertung der Ergebnisse	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1	pMES-mini-Agrin-Vektor	41
3.2	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von mini-Agrin	42
3.3	Charakterisierung von mini-Agrin durch Western Blotting	45
3.4	Konzentrationsbestimmung des polyklonalen anti-Agrin-Antikörpers	47
3.5	ELISA	48
3.5.1	Nachweis von Antikörpern gegen humanes mini-Agrin	48
3.5.2	Bestimmung der Konzentration von Antikörpern gegen mini-Agrin	51
3.6	Immunhistochemische Färbung von neuromuskulären Endplatten	53
3.7	Immunhistochemische Färbung von transfizierten HEK293 Zellen	55
3.8	Übersicht der experimentellen Ergebnisse	57
3.9	Klinische Parameter der Myasthenia gravis Patienten mit anti-Agrin-Antikörpern	58

<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
4.1	Anti-Agrin-Autoantikörper in Patienten mit Myasthenia gravis.....	60
4.2	Pathogenität der anti-Agrin-Antikörper .....	61
4.3	Antikörperkonzentrationen bei Myasthenia gravis.....	63
4.4	Doppel-seropositive Myasthenia gravis .....	64
4.5	Auswirkungen der anti-Agrin-Autoantikörper auf die klinischen Symptome der Patienten.....	66
4.6	Auswirkungen von anti-Agrin-Autoantikörpern in anderen Geweben .....	68
4.7	Mini-Agrin als Antigen für die Detektion von Antikörpern gegen Agrin.....	69
4.8	Ausblick .....	71
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Appendix</b> .....	<b>78</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Myasthenia gravis

### 1.1.1 Epidemiologie, Symptomatik und Klassifikation

Myasthenia gravis ist eine Erkrankung des neuromuskulären Systems mit einer jährlichen Inzidenz von 20-30/1 000 000[1, 2]. Aufgrund einer verbesserten Therapie und Lebenserwartung hat sich die Prävalenz der Erkrankung in den letzten Jahren erhöht und liegt heute weltweit bei etwa 80/1 000 000 Einwohnern[3, 4]. Frauen weisen eine höhere Prävalenz an Myasthenia gravis auf[5], wobei auch der Krankheitsbeginn vom Geschlecht abhängig zu sein scheint. Bei Neuerkrankten unter 40 lässt sich ein höherer Anteil an Frauen beobachten, während im Alter von über 50 Männer ein höheres Erkrankungsrisiko aufweisen[6].

Die typische Symptomatik der Erkrankung – eine unter Belastung zunehmende Schwäche der Skelettmuskulatur – beruht auf einer Störung der synaptischen Übertragung an der neuromuskulären Endplatte. Die abnorme Ermüdung der Muskulatur betrifft häufig nur einzelne Muskelgruppen und diese zu unterschiedlichen Schweregraden. Häufig befallene Muskelgruppen sind die bulbäre, okuläre und die mimische Muskulatur. In gravierenden Ausprägungen der Erkrankung lässt sich eine generalisierte Muskelschwäche beobachten. Sind auch die respiratorischen Muskeln betroffen, besteht die Gefahr einer Ateminsuffizienz. Erstes Anzeichen der Erkrankung ist häufig eine Schwäche der Muskeln der Augen und Augenlider; die okuläre Symptomatik stellt bei 40 bis 60 Prozent der Erkrankten die Erstmanifestation dar[7].

Bei einem großen Teil der Patienten lassen sich neben den beschriebenen Symptomen auch pathologische Veränderungen im Thymus beobachten[8]. Typisch ist dabei eine lymphofollikuläre Hyperplasie mit Keimzentren – in 10 Prozent der Fälle auch Thymome.

Zur Einteilung der Erkrankung nach Schweregrad wird heute hauptsächlich die Klassifikation der Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA)[9] verwendet. Sie basiert auf einer von K. E. Ossermann im Jahre 1958 entworfenen Einteilung[10] und kategorisiert Patienten nach klinischen Charakteristika. Die Klassifikation definiert fünf Kategorien der Myasthenia

gravis, wobei die Klasse I eine rein okuläre Myasthenia gravis und die weiteren vier Klassen einen zunehmenden Generalisierungsgrad der Erkrankung beschreiben.

**Tabelle 1: Klinische Klassifikation der Myasthenia gravis (modifizierte MGFA-Klassifikation 2000)[9, 11]**

Klasse	Charakteristika
I	rein okuläre Myasthenie, beschränkt auf äußere Augenmuskel und Lidschluss
II	leicht- bis mäßiggradige generalisierte Myasthenie mit Einbeziehung anderer Muskelgruppen, oft einschließlich der Augenmuskeln
III	mäßiggradige generalisierte Myasthenie, oft einschließlich der Augenmuskeln
IV	schwere generalisierte Myasthenie
V	Intubationsbedürftigkeit mit und ohne Beatmung*
Die Klassen II-IV lassen sich in 2 Subgruppen unterteilen	
A	Betonung der Extremitäten und/oder Gliedergürtel, geringe Beteiligung oropharyngealer Muskelgruppen
B	besondere Beteiligung oropharyngealer und/oder der Atemmuskulatur, geringere oder gleich starke Beteiligung der Extremitäten oder rumpfnahen Muskelgruppen

\*Notwendigkeit einer Nasensonde ohne Intubationsbedürftigkeit: Klasse IVb

### 1.1.2 Pathophysiologie und Diagnostik

In den 1970er Jahren wurden Autoantikörper gegen den nikotinischen Azetylcholinrezeptor (AChR) als erste Ursache für Myasthenia gravis identifiziert. In etwa 80 Prozent aller Myasthenia gravis Fälle sind diese Autoantikörper kausal für die Muskelschwäche[12]. Nikotinische Azetylcholinrezeptoren sind ligandengesteuerte Transmembranrezeptoren, die an der postsynaptischen Seite der neuromuskulären Endplatte hoch konzentriert sind. Als ionotrope Rezeptoren dienen sie der schnellen Signalübertragung zwischen Nerv und Muskel. Sie werden dabei durch die kooperative Bindung zweier Azetylcholinmoleküle aktiviert und fungieren im geöffneten Zustand als unspezifische Kationenkanäle mit einer Leitfähigkeit vor allem für Natrium. Bei einer Reduktion der nikotinischen Azetylcholinrezeptoren an der neuromuskulären Endplatte wird die Signalübertragung

zwischen Nerv und Muskel gestört und somit die Erregung des Muskels erschwert. Die Antikörper, welche an den Azetylcholinrezeptor binden, vermindern die neuromuskuläre Transmission über drei Mechanismen[13-16]. Einerseits führen die Antikörper zur Fixierung von Komplementfaktoren, welche die fokale Lyse der postsynaptischen Membran verursachen, die Anzahl an Azetylcholinrezeptoren vermindern und deren Lokalisation in der Nähe der Azetylcholinfreisetzung stören. Andererseits führt eine erhöhte Quervernetzung der Rezeptoren zu einer gesteigerten Endozytose, wodurch wiederum die Anzahl der Rezeptoren vermindert wird. Selten schließlich behindern die Antikörper auch direkt die Bindung von Azetylcholin an die Rezeptoren. Anhand des erfolgreichen Nachweises von Autoantikörpern gegen den nikotinischen Azetylcholinrezeptor lassen sich seropositive (anti-AChR-Antikörper-positive MG) und seronegative Myasthenia gravis (anti-AChR-Antikörper-negative MG) unterscheiden.

In der Diagnostik der Myasthenia gravis kommen zahlreiche unterschiedliche Tests und Methoden zum Einsatz. Die klinisch-neurologische Symptomatik kann beispielsweise im Simpson-Test untersucht werden, wobei bei einem länger als eine Minute anhaltenden nach oben gerichteten Blick eine Zunahme der Ptosis oder das Auftreten von Doppelbildern auf eine Muskelschwäche hinweisen[17]. Bei an Myasthenia gravis erkrankten Patienten zeigt eine repetitive supramaximale Stimulation des Nervs mit einer Frequenz von 3 Hz (repetitive Nervenstimulation, RNS) eine progressive Verkleinerung des Muskelsummenaktionspotentials[18]. Auch in der sogenannten Einzelfaser-Elektromyographie (single fiber electromyography, SFEMG) lassen sich typische Veränderungen nachweisen[18]. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Diagnostik ist der Edrophoniumchlorid-Test. Edrophoniumchlorid hemmt die Azetylcholinesterase und führt durch die verlängerte Wirkung des Azetylcholins an der neuromuskulären Endplatte bei Patienten zu einer kurzzeitigen Verbesserung der Symptomatik[19]. In der serologischen Diagnostik werden anti-AChR-Antikörpertiter bestimmt[20, 21]; durch bildgebende Verfahren lassen sich pathologische Veränderungen des Thymus nachweisen.

### 1.1.3 Seronegative Myasthenia gravis

Von einer seronegativen Myasthenia gravis spricht man, wenn keine Antikörper gegen den Azetylcholinrezeptor nachgewiesen werden können – dies trifft für etwa 10 bis 20 Prozent der diagnostizierten Fälle zu. In den letzten Jahren konnten bei Patienten mit seronegativer Myasthenia gravis Antikörper gegen verschiedene Proteine nachgewiesen werden. So konnten bei einem Teil der Patienten Antikörper gegen die muskelspezifische Tyrosinkinase (MuSK)[21] und 2011 erstmals Antikörper gegen LRP4 nachgewiesen werden[22]. Außerdem wurden wiederholt Antikörper gegen eine Vielzahl weiterer Proteine nachgewiesen, deren ursächlicher Zusammenhang mit der Symptomatik der Erkrankung allerdings häufig noch nicht bewiesen werden konnte. Beispiele dafür sind niedrig affine Antikörper gegen den AChR[23] sowie Antikörper gegen die Azetylcholinesterase, den Ryanodin-Rezeptor[24, 25] oder Titin[26].

Auf der Suche nach den Ursachen für die Symptomatik einer Myasthenia gravis in Patienten ohne nachweisbare Antikörper gegen den Azetylcholinrezeptor konnten Hoch et. al 2001 in 70 Prozent der getesteten anti-AChR-seronegativen Patientenseren Immunglobulin G-Antikörper gegen MuSK identifizieren[21]. MuSK spielt eine entscheidende Rolle in der Bildung der neuromuskulären Endplatten und ist auch an der adulten neuromuskulären Endplatte nachweisbar. In darauffolgenden Untersuchungen konnten bei einer variierenden Anzahl von seronegativen Myasthenia gravis Patienten Antikörper gegen MuSK gefunden werden. Zouvelou et al. berichteten auch von doppel-seropositiver MG mit Antikörpern sowohl gegen MuSK als auch gegen den Azetylcholinrezeptor[27].

Erst 2011/12 konnten Pevzner et al., Higuchi et al. und Zhang et al. Autoantikörper gegen LRP4 nachweisen[22, 28, 29]. LRP4 wurde kurz zuvor als Rezeptor für Agrin an der neuromuskulären Endplatte im Skelettmuskel identifiziert[30-32]. Der Anteil an anti-AChR- und anti-MuSK-seronegativen (doppel-seronegativen) MG (DSNMG) Patienten mit Antikörpern gegen LRP4 variiert allerdings stark in den genannten Untersuchungen. Während Pevzner et al. bei etwa 50 Prozent der untersuchten DSNMG Patienten Antikörper gegen LRP4 nachweisen konnte, waren es in den von Higuchi und Zhang untersuchten Seren nur etwa 3 bis 9,2 Prozent. 2014 untersuchten Zisimopoulou et al. 809 Myasthenia gravis Patientenseren aus zehn Ländern auf Antikörper gegen LRP4 und konnten diese in 18,7

Prozent der Patientenseren mit doppel-seronegativer Myasthenia gravis nachweisen[33]. Außerdem hatten 8 der 107 untersuchten anti-AChR-seropositiven Patientenseren und 10 der 67 anti-MuSK-seropositiven Seren nachweisbare Antikörper gegen LRP4, wobei es sich damit um sogenannte doppel-seropositive Myasthenia gravis handelt.

Ein weiterer Fall von doppel-seropositiver Myasthenia gravis, diesmal mit nachweisbaren Antikörpern sowohl gegen den Azetylcholinrezeptor als auch gegen MuSK, wurde 2012 vorgestellt[27]. Zuletzt berichteten Zisimopoulou et al.[33] über Patienten mit doppel-seropositiver Myasthenia gravis; darunter befinden sich Patienten mit Antikörpern gegen AChR und LRP4 und Patienten mit Antikörpern gegen MuSK und LRP4. In der genannten Studie ergaben sich Hinweise darauf, dass Patienten mit doppel-seropositiver Myasthenia gravis möglicherweise unter einer schwereren Symptomatik als Patienten mit nur einem Autoantigen leiden.

#### **1.1.4 Doppel-seronegative Myasthenia gravis als Autoimmunerkrankung**

Bis zu 10 Prozent der Patienten mit Myasthenia gravis bilden weder Antikörper gegen den Azetylcholinrezeptor noch gegen MuSK. Allerdings gibt es deutliche Hinweise darauf, dass es sich auch bei der sogenannten „doppel-seronegativen“ Myasthenia gravis um eine Antikörper-vermittelte Autoimmunkrankheit handelt. So konnten bei einem passiven Transfer von Immunglobulinen seronegativer MG Patienten in Versuchstiere eine Beeinträchtigung der neuromuskulären Übertragung und ein – wenn auch verhältnismäßig geringer – Verlust von ACh-Rezeptoren beobachtet werden[34].

Weitere Hinweise auf eine autoimmune Genese der Erkrankung sind eine Verbesserung der Symptomatik durch Plasmaaustausch und immunsuppressive Therapie mit Prednisolon oder Azathioprin und das Auftreten von transienter neonataler Myasthenia gravis in Kindern von seronegativen Müttern[34, 35].

Das klinische Bild und das Erkrankungsalter der doppel-seronegativen Myasthenia gravis variiert stark. In einigen Fällen wurde von einem Krankheitsbeginn in früher Kindheit berichtet, wobei allerdings auch ein noch nicht diagnostiziertes kongenitales myasthenes Syndrom nicht ausgeschlossen werden konnte[36, 37]. Wie bei vielen anderen

Autoimmunerkrankungen erkrankten die meisten der in der Literatur beschriebenen Patienten mit seronegativer Myasthenia gravis im Erwachsenenalter; im Mittel mit etwa 40 Jahren. Die geschlechtliche Verteilung variiert in den bisher veröffentlichten Berichten. Viele Patienten weisen eine okuläre Symptomatik bei Krankheitsbeginn auf; in vielen Fällen setzt sich diese auch im weiteren Krankheitsverlauf fort. Im Allgemeinen scheinen Patienten mit doppel-seronegativer MG (anti-AChR-seronegativ und anti-MuSK-seronegativ, DSNMG) vor allem im Vergleich mit anti-MuSK-seropositiver Myasthenia gravis eine mildere Symptomatik mit einer relativ seltenen Beteiligung sowohl der bulbären als auch der respiratorischen Muskulatur aufzuweisen. Veränderungen des Thymus treten in Patienten mit DSNMG selten auf[38]; trotzdem sind einige Fälle von DSNMG mit einer Hyperplasie des Thymus beschrieben[23].

## **1.2 Agrin**

Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglykan mit einer molekularen Masse von etwa 400-600 kDa[39]. Das AGRN Gen kodiert für eine Proteinsequenz von circa 2000 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 220 kDa; zahlreiche Glykosylierungen des Proteins sind für die beträchtliche Differenz zur Masse des nativen Proteins von etwa 500 kDa verantwortlich[40, 41].

Obwohl Agrin anfangs als ein von den Motoneuronen in die Basallamina der neuromuskulären Endplatte sezernierter Faktor identifiziert wurde[42], ist heute bekannt, dass das Protein in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert wird. So konnte die Expression von Agrin im Gehirn, Rückenmark, Muskel, Nieren, Leber, Lunge und anderen Geweben nachgewiesen werden[43-45]. Im zentralen Nervensystem konnte die Bedeutung von Agrin für die Entwicklung von Synapsen, die Plastizität und die Signalübertragung an interneuronalen Synapsen nachgewiesen werden[46]. Während der Entwicklung wird Agrin im gesamten Gehirn stark exprimiert; im adulten Gehirn ist die Expression von Agrin vor allem in Regionen mit ausgeprägter synaptischer Plastizität wie dem Hippocampus und dem Dach des dritten Ventrikels hoch[43].

### 1.2.1 Struktur von Agrin und mini-Agrin

Das Proteinrückgrat von Agrin besitzt zahlreiche Domänen, welche homolog zu anderen Proteinen der extrazellulären Matrix sind. Der N-terminale Bereich enthält neun Follistatin-ähnliche Domänen und zwei Laminin-EGF-ähnliche Bereiche. Das N-terminale Ende ist für die Bindung von Agrin an Laminin und damit (zusammen mit der Bindungsstelle für Dystroglykan) für die Verankerung von Agrin in der Basallamina verantwortlich[47]. Die C-terminale Domäne hingegen ist durch drei zur globulären Domäne der Laminin  $\alpha$ -Kette homologe Sequenzbereiche und vier EGF-ähnliche Domänen charakterisiert[44, 48, 49]. Die Domänen G1 und G2 des C-terminalen Ende dienen der Bindung an Dystroglykan[50, 51], die G3 Domäne und die umgebenden Sequenzbereiche sind notwendig und hinreichend für die Aggregation der Azetylcholinrezeptoren an der neuromuskulären Endplatte[52] (siehe Abbildung 1).

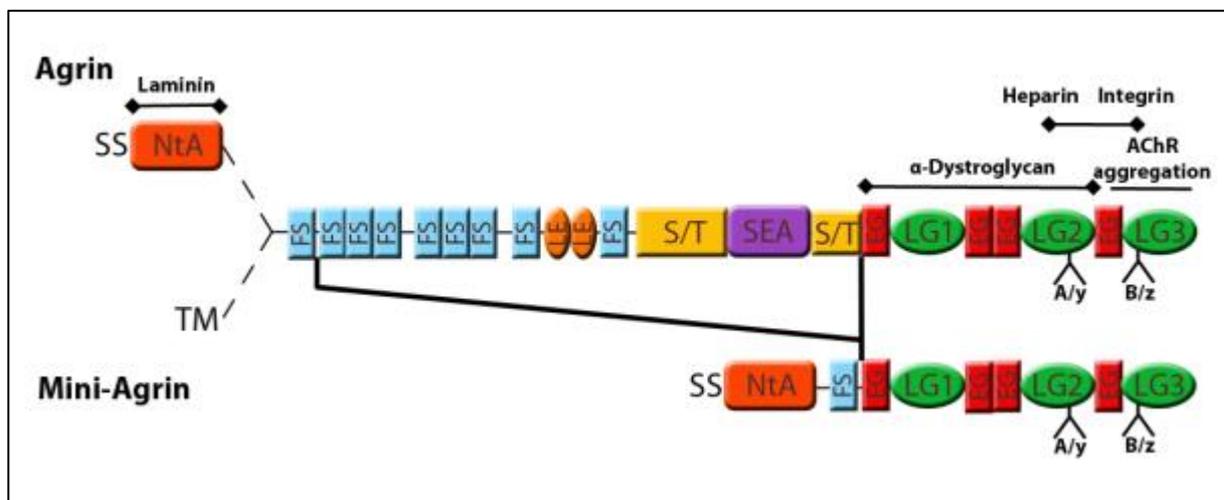
Bedingt durch zwei alternative Transkriptionsstartstellen existieren zwei Varianten von Agrin. Eine lösliche Form, in der eine Signalsequenz im N-Terminus für die Sekretion von Agrin verantwortlich ist, und eine Transmembranform, die an der Zelloberfläche verbleibt und nicht in die Basallamina sekretiert wird[53, 54]. Die sekretierte Form von Agrin ist für die Bildung der neuromuskulären Endplatte ausschlaggebend. Die Transmembranform von Agrin wird hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert. Beide Formen von Agrin können *in vitro* die Aggregationen von AChR auf kultivierten Myotuben bewirken[53-55].

Drei Spleißstellen in der C-terminalen Hälfte von Agrin, bei Nagern als x-, y- und z-Stelle bezeichnet, sind für die Bildung verschiedener Isoformen verantwortlich, welche gewebespezifisch exprimiert werden[56-58]. Im Huhn werden die letzten beiden Spleißstellen A- und B-Stelle genannt. Nur Isoformen von Agrin, welche Inserts an der B/z-Stelle aufweisen, können die Aggregation von ACh-Rezeptoren bewirken und sind damit für die postsynaptische Differenzierung der neuromuskulären Endplatte *in vivo* verantwortlich[59].

In der vorliegenden Arbeit wurde das sogenannte „mini-Agrin“-Protein verwendet. Das mini-Agrin-Konstrukt, welches für die Expression verwendet wurde, kodiert für ein etwa 25 kDa N-terminales und ein etwa 80 kDa C-terminales Fragment von Agrin. Es enthält die für neuronales Agrin spezifischen Inserts an den A/y- und B/z-Spleißstellen: ein vier

Aminosäuren langes Insert an der A/γ-Stelle und ein leicht verändertes acht Aminosäuren langes Insert an der B/z-Stelle (Agrin-Isoform γ4z8)[58].

Um das mini-Agrin-Konstrukt auf die Fähigkeit, die Aggregation der Azetylcholinrezeptoren zu induzieren, testen zu können, wurden C2C12 Myotuben mit unterschiedlichen Mengen von rekombinantem humanen mini-Agrin inkubiert und anschließend die Dichte an aggregierten ACh-Rezeptoren bestimmt. In Konzentrationen von 1 bis 5 nM konnte so nachgewiesen werden, dass humanes mini-Agrin die Aggregation von ACh-Rezeptoren induziert (Huzé, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 1: Struktur von Agrin und mini-Agrin[60]**

Die Proteinstruktur von Agrin wird von zahlreichen Elementen gebildet. Aufgrund zweier Transkriptionsstartstellen im N-terminalen Teil gibt es zwei Formen von Agrin, eine mit einer N-terminalen Domäne (NtA) und einer Signalsequenz (SS), welche zur Sekretion des Proteins führt, und eine transmembrane Form (TM Transmembranregion). Außerdem finden sich in Agrin neun Follistatin-ähnliche Domänen (FS), zwei Laminin-EGF ähnliche (LE), vier EGF-ähnliche, und eine SEA Domäne (SEA). In der Mitte der Sequenz finden sich zwei Serin- und Threonin-reiche Regionen (S/T). Den C-terminalen Bereich bilden drei Laminin G-homologe Domänen (LG1-3). Mini-Agrin besteht aus einem N-terminalen und einem C-terminalen Abschnitt von Agrin.

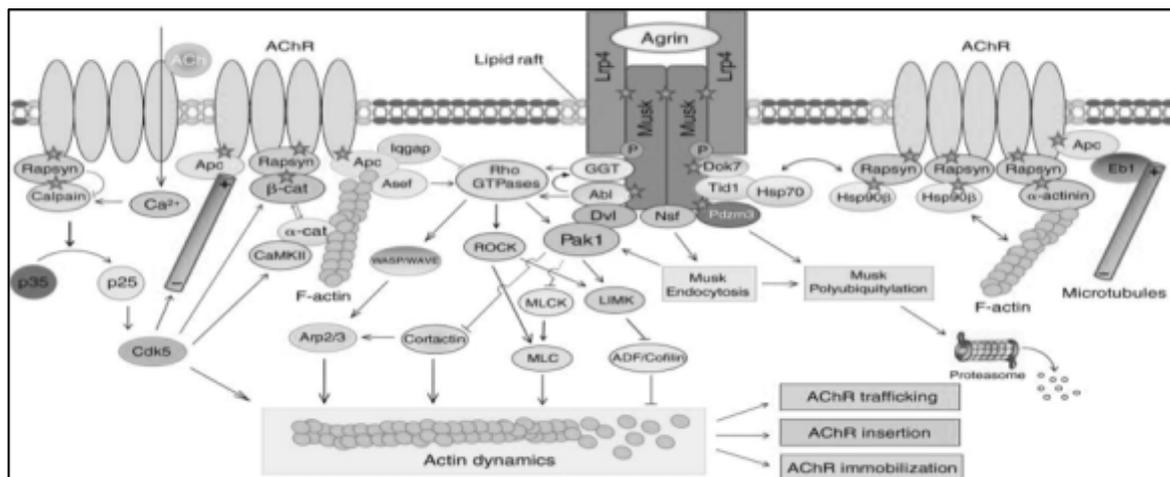
## 1.2.2 Agrin an der neuromuskulären Endplatte

Aufgrund ihrer Größe und der relativ einfachen Zugänglichkeit hat die neuromuskuläre Endplatte viel zum heutigen Verständnis der Entwicklung und Funktionsweise von Synapsen beigetragen. Sie gilt deshalb als die am besten charakterisierte Synapse im gesamten Nervensystem. Der Neurotransmitter Azetylcholin gibt das Signal vom Nerv an die Muskelzelle weiter. An der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Endplatte finden sich deshalb nikotinische ACh-Rezeptoren. Die Rezeptoren erzeugen nach Bindung von Azetylcholin ein überschwelliges Endplattenpotential, das ein Muskelaktionspotential auslöst[61]. Dieses bewirkt eine Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum, welche eine Kontraktion der Muskelfaser bewirkt[62].

Voraussetzung für die Auslösung der Muskelfaserkontraktion ist eine erfolgreiche synaptische Übertragung. Dazu ist eine hohe Konzentration von Azetylcholinrezeptoren im Bereich der postsynaptischen Dichte notwendig. Diese Konzentration entsteht während der Embryonalentwicklung der neuromuskulären Endplatte aufgrund des Austausches von Signalen zwischen Muskelfaser und Motoneuron[63, 64]. Der wesentliche molekulare Regulator während der Entwicklung und Regeneration der neuromuskulären Endplatte ist das extrazelluläre Matrixprotein Agrin. Agrin wird in den Motoneuronen synthetisiert, entlang des Axons transportiert und schließlich in die synaptische Basallamina sekretiert[42]. Basalmembran-gebundenes Agrin interagiert mit einem Rezeptorkomplex in der postsynaptischen Membran und induziert über eine Signalkaskade die Bildung aller postsynaptischen Spezialisierungen inklusive der Aggregate der AChR[55]. Agrin-defiziente Mäuse bilden keine neuromuskulären Endplatten, die Azetylcholinrezeptoren sind über die ganzen Muskelzellen verteilt und die Mäuse sterben während der Geburt aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz[65].

Agrin wirkt an der neuromuskulären Endplatte über einen Rezeptorkomplex, der aus zwei Proteinen besteht: der Tyrosinkinase MuSK und dem Agrin-bindenden Protein LRP4[30, 31]. LRP4 bindet spezifisch an neuronales Agrin, bildet einen tetrameren Komplex mit MuSK und induziert dessen Aktivierung. Dies führt zur Aktivierung einer komplexen intrazellulären Signalkaskade (siehe Abbildung 2). Obwohl in den letzten Jahren viele an der Signalkaskade beteiligte Proteine identifiziert wurden, ist der genaue molekulare Mechanismus der Regulation und Stabilisierung von AChR-Aggregaten noch nicht bekannt[66].

Neben der Induktion und Aufrechterhaltung der Aggregation der Azetylcholinrezeptoren spielt Agrin auch in der Stabilisierung der postsynaptischen Differenzierung eine wichtige Rolle. Im Jahre 2012 wurde der Einfluss von Agrin auf die Stabilisierung des postsynaptischen Apparates untersucht[67]. Dabei wurde ein Mausmodell erstellt, in dem Agrin durch eine konditionelle Mutation in einigen Motoneuronen nicht exprimiert wurde. Der Vergleich verschiedener Komponenten der postsynaptischen Membran, des Zytoskeletts und der Basallamina zwischen von der Mutation betroffenen Synapsen und Kontrollsynapsen mit normaler Expression von Agrin zeigte eine deutliche Reduktion der oben genannten Komponenten beim Fehlen von Agrin. Außerdem fielen Defekte der präsynaptischen Strukturen wie Axonterminaldystrophien, axonale Schwellungen und Fragmentierungen in den betroffenen neuromuskulären Endplatten auf. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass nicht nur die Postsynapsen sondern auch die Präsynapsen unter dem Einfluss von Agrin stehen[67].



**Abbildung 2: Durch Agrin aktivierte intrazelluläre Signalwege führen zur Aggregation der Azetylcholinrezeptoren**

*Durch die Interaktion von Agrin mit LRP4 wird dessen Interaktion mit MuSK gefördert und damit die Dimerisierung und Aktivierung von MuSK ausgelöst. Aktiviertes MuSK führt zur Aktivierung mehrerer intrazellulärer Signalwege, welche zur Aggregation der Azetylcholinrezeptoren führen. So regulieren diese Signalwege beispielsweise sowohl den Transport, als auch die Einbringung und Immobilisierung der Rezeptoren in der Membran über Aktin und fördern dessen Verbindung mit Rapsyn und Apc und damit die Verankerung der Rezeptoren im Zytoskelett[66].*

### **1.3 Fragestellungen dieser Arbeit**

Die Ursache der Symptomatik bei Myasthenia gravis ist eine gestörte Signalübertragung an der neuromuskulären Endplatte der Skelettmuskulatur, hervorgerufen durch eine Reduktion der Konzentration von AChR in der postsynaptischen Membran. Bei etwa 80 Prozent der Patienten mit Myasthenia gravis können Antikörper gegen die Azetylcholinrezeptoren gefunden werden. Kleinere Anteile der Patienten weisen Antikörper gegen MuSK und LRP4 auf. Dabei handelt es sich um Proteine, die an der neuromuskulären Endplatte lokalisiert sind und eine große Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung von AChR-Aggregaten spielen. Ein weiteres Protein, welches gemeinsam mit MuSK und LRP4 die Entwicklung und Stabilisierung der neuromuskulären Endplatte ermöglicht, ist Agrin. Diese Tatsache führte zu der Hypothese, dass bei einigen Patienten mit Myasthenia gravis Autoantikörper gegen Agrin die Signalübertragung an der neuromuskulären Endplatte beeinträchtigen und damit für die myasthene Symptomatik verantwortlich sein könnten. Folgende spezifische Fragestellungen sollen in dieser Arbeit untersucht werden.

- 1) Kommen Antikörper gegen Agrin in Seren von Myasthenia gravis Patienten vor?
- 2) In welchen Konzentrationen sind Antikörper gegen Agrin vorhanden?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Chemikalie	Hersteller
Agar	Carl Roth GmbH + Co (Art.-Nr. 2266.3)
Agarose	Serva
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH + Co (Art. 9592.3)
Ampicillin	Sigma
Bromphenolblau-Natrium-Salz	Carl Roth GmbH + Co (Art. A512.1)
Coomassie Blau G 250	Carl Roth GmbH + Co (Art. 9598.1)
4', 6'-diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma (D9564)
DMEM High Glucose	PAA (Kat-Nr. E15-883)
Pferdeserum (Donor Horse Serum)	PAA (Kat-Nr. B15-023)
Dulbecco's PBS (10x)	PAA (Kat-Nr. H15-011)
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art.-Nr. 3738.1)
Ethanol , 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. 9065.3)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. CN06.2)
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	Sigma (E-5134)
Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH + Co
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. 4979.1)
Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum FCS)	PAA (Cat.-Nr. A15-151)
Glycerin ROTIPURAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. 3783.1)
Glycin PUFFERAN®	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. 3908.2)
Ziegenserum	PAA (Kat-Nr. B11-035)
HCL (1N)	Roth (Kat.-Nr K025.1)
Hefeextrakt Servabacter®	SERVA (Lot 101019)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. 6781.3)
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. P749.1)
Ketaminhydrochlorid	cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
Lipofectamine® Reagent	Invitrogen 18324-012
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co.KG (Art-Nr. 4227.2)
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. 8388.6)
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. T145.3)
Mowiol 4-88 (Polyvinylalcohol)	Carl Roth GmbH + Co.KG (Art-Nr. 8713.2)

Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH + Co.KG (Art-Nr. 8563.1)
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co.KG (Art-Nr. 6885.1)
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co.KG (Art-Nr. P030.1)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co.KG (Art-Nr. P031.2)
Natriumthiosulfat	Carl Roth GmbH + Co.KG (Art-Nr. NH25.1)
OPTI-MEM <sup>®</sup> I + GlutaMAX <sup>™</sup> -I	Gibco 51985-026
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co.KG (Art-Nr. 0335.3)
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA (Kat-Nr. P11-010)
Pepton aus Casein	Serva (48600.02)
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma (P7280)
2-Propanol 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art.-Nr. CP41.3)
Natriumchlorid NaCl	Carl Roth GmbH + Co KG (Art.-Nr. 9265.1)
Natriumchloridlösung (0,9%)	Braun, Deutschland
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH + Cp (Art.-Nr. 2326.2)
Sucrose (D(+)-Saccharose)	Carl Roth GmbH + Cp (Art.-Nr. 4621.1)
T4 DNA Ligase	BioLabs (Kat-Nr. M0202S)
Tissue Tec <sup>®</sup> 4583 O.C.T. <sup>™</sup> Compound	Sakura Finetek Europe B.V.
TMB Single Solution	Invitrogen (REF 002023)
Tris Pufferan <sup>®</sup>	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. 4855.2)
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	Sigma
Triton <sup>®</sup> X-100	Sigma Aldrich (CAS Nr. 9002-93-1)
Trypsin 2,5%	Gibco 15090-046
Tween20	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. 9127.2)
Xylazinhydrochlorid	Rompum, Bayer, Deutschland

Gerät	Hersteller
Brutschrank	memmert
Konfokales Mikroskop LSM710 ImagerZ1	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Kryostat LEICA CM3050	Leica Biosystems
pH-Meter inoLab 720	WTW GmbH
Pipetten	Gilson GL28557, Gilson GK26459, Gilson H22358E, GG27965 and N100206
Präzisionswaage PLJ 2100-2M	Kern + Sohn GmbH
Vortex REAX 1	Heidolph BestNr. 54111
Perfusionspumpe Minipuls 3	Gilson

Magnetrührer mit Heizung AREX	VELP SCIENTIFICA®
Zentrifuge Zellkultur Universal 320R	Hettich
Sterilbank Zellkultur	BDK Luft-und Reinraumtechnik
Tischzentrifuge Rotofix 32A	Hettich/Tuttlingen
Wasserbad	GFL
DARK Reader Transilluminator	DR-88M; Clare chemical research
Thermomixer comfort	Eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge Sorvall Evolution RC	Kendro Laboratory Products
Zellkultur Brutschrank	Binder/Tuttlingen
Agarose-Gelelektrophorese-Kammer	Invitrogen/Karlsruhe
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph
Nano Drop 1000 Spectrophotometer V3.5	Thermo Scientific
Molecular Imager® Gel Doc <sup>™</sup> XR System	BioRad
Dark Reader Transilluminator	Clare Chemical Research
Gelelektrophoresesysteme	Peqlab
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems	BioRad
Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell	BioRad
PowerWave XS Microwave Spectrophotometer	BioTek

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser (24x50 mm)	Carl Roth GmbH + Co.
Handschuhe GentleSkin®	Meditrade
Objektträger (76 x 26 mm)	Carl Roth GmbH + Co.
Parafilm "M"™	Bemis
Pipetten "pipet lite"	Rainin
Protino® Ni-TED 1000	Macherey-Nagel
Cellstar® Pipetten(5ml,10ml, 25ml)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen (20µL, 200µL,1000 µL)	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter (20µL, 200µL,1000 µL)	Starlab
Immun-Blot® PVDF Membran	BioRad (Cat. #162-0177)
Roti® Liquid barrier marker	Carl Roth GmbH + Co.
Röhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner bio-one
Zellkultur Flaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-one
Zellkultur Multiwell Platten, 24 Well	Greiner Bio-one

Petrischalen	Greiner Bio-one
Zippy® Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research
NucleoBon Xtras Maxi EF Maxiprep-Kit	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel
Amersham <sup>™</sup> ECL <sup>™</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (RPN2232)
Restriktionsenzyme (BamH1-HF, SmaI, HindIII, NotI)	BioLabs
Gel Loading Dye Blue (6x)	BioLabs
NEBuffer4	BioLabs
Safeseale ReagiergefäÙe (0.5ml, 1.5ml, 2 ml)	Sarstedt
ELISA Platten	Greiner Bio-one (655080)
1kb DNA Ladder	New England BioLabs
Rotilabo®-Blottingpapier	Carl Roth GmbH + Co. KG (Art-Nr. CL75.1)
Amersham Hyperfilm™ ECL high performance chemiluminescence film	GE Healthcare (28906837)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	BioRad
Rapid Fixer Fixierlösung Western Blot	Ilford (Cat 1984253)
Multigrade Entwicklungslösung Western Blot	Ilford (Cat 1155073)
PageRuler <sup>™</sup> Plus Prestained Protein Ladder #SM1811	Fermentas

Software	Hersteller
Photoshop CS5	Adobe
R Project for Statistical Computing	GNU Project
Zen 2009 Light Edition	Carl Zeiss Microscope GmbH
Zen 2011	Carl Zeiss Microscope GmbH
ApE v1.17	M. Wayne Davis
Database Explorer 2.0 NTI Advance 10.3.0	Invitrogen
ScanWizard EZ 2011	Microtek
Endnote X7	Thomson Reuters
Gen5 1.05.11	BioTek Instruments
Quantity One V 4.6.5	Biorad
Word 2010	Microsoft Corporation
Excel 2010	Microsoft Corporation
NCBI BLAST	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>

## 2.1.1 Puffer, Lösungen, Antikörper und Zellmedien

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Komponenten	Herstellung	Verwendung
Ampicillin, 100 mg/ml	1 g Ampicillin autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	Ampicillin in 10 ml autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen. Lagerung bei -20°C.	Zur Herstellung von Agarplatten für die Selektion von Bakterienkolonien.
APS Lösung	100 mg Ammoniumpersulfat 1ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	APS in autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen.	Polymerisationsinitiator für die Herstellung von Polyacrylamidgelen für SDS-PAGE.
4x SDS Puffer	100 mg Tris.HCl pH 8,5 1ml 20% SDS 5ml Glycerin 1,6 ml 2- Mercaptoethanol 3,4 ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O 50 mg Bromphenolblau autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	Alle Komponenten mischen und mit autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O auf 20ml auffüllen.	SDS für die Denaturierung der Proteine und Bildung von SDS- Proteinkomplexen mit negativer Gesamtladung für die SDS-PAGE.
10x TBS pH 8,5	12,1 g Tris 87,8 g NaCl 800ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	Komponenten im autoklavierten ddH <sub>2</sub> O lösen, den pH auf 8,5 pH einstellen, auf 1000ml mit autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O auffüllen und anschließend autoklavieren.	Zur Herstellung von 1xTBST Puffer.
1x TBST	100 ml 10x TBS 2 ml Tween 20 900 ml ddH <sub>2</sub> O	100 ml 10x TBS und 2 ml Tween 20 in 900 ml ddH <sub>2</sub> O lösen.	Zum Waschen der Nitrocellulosemembran und zur Verdünnung der Antikörper im Western Blot.
10x TBS-Puffer, pH8	12,1 g Tris 87,8 g NaCl 800ml ddH <sub>2</sub> O	Alle Komponenten mischen. pH mithilfe von HCL auf 8 einstellen, auf 1000 ml mit autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O auffüllen.	Für die Herstellung von Transferpuffer (Western Blot).

1x Transferpuffer	100 ml 10x TBS-Puffer 200 ml Ethanol 700 ml ddH <sub>2</sub> O	Alle Komponenten mischen und bei Raumtemperatur lagern.	Zum Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran im Western Blot.
1,5 M Tris-HCL, pH 8,8	93,5 g Tris 300 ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	pH mithilfe von HCL (5N) auf 8,8 einstellen, auf 500 ml mit autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O auffüllen	Zur Herstellung des Trenngels für die SDS-PAGE.
0,5 M Tris-HCL, pH 8,6	30,26 g Tris 300 ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	pH mithilfe von HCL (5N) auf 6,8 einstellen, auf 500 ml mit autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O auffüllen.	Zur Herstellung des Sammelgels für die SDS-PAGE.
Fixierlösung	50 ml Methanol 5 ml Essigsäure 45 ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	Methanol und Essigsäure in autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen.	Zur Fixierung des SDS-PAGE Gels vor der Silberfärbung.
Sensitivierungslösung	0.02g Natriumthiosulfat 100 ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	Natriumthiosulfat in autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen.	Sensitivierungslösung für die Silberfärbung.
Entwicklungslösung	108 µl Formaldehyd (37%) 2 g Natriumcarbonat 100 ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	Formaldehyd und Natriumcarbonat in autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen.	Entwicklungslösung für die Silberfärbung.
Coomassie-Färbelösung	0,1 g Coomassie Blau G 250 45 ml Methanol 45 ml ddH <sub>2</sub> O 10 ml Essigsäure	Coomassie Blau G 250 in Methanol und ddH <sub>2</sub> O lösen, Essigsäure hinzugeben.	Zur Anfärbung der Proteine, SDS-PAGE.
Entfärbungslösung	30 ml Methanol 60 ml autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O 10 ml Essigsäure	Methanol und autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O mischen, 10 ml Essigsäure hinzugeben.	Zur Entfärbung des Gels nach Färbung mit Coomassie in der SDS-PAGE.
Adsorptionspuffer pH 8,6	3g NaHCO <sub>3</sub> 500 ml ddH <sub>2</sub> O mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> auf pH 8,6 einstellen	NaHCO <sub>3</sub> in 500 ml ddH <sub>2</sub> O lösen. pH mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> auf 8,6 einstellen.	Zur Beschichtung der ELISA-Platten.
4', 6'-diamidin-2-phenylindol (DAPI), 2 mg/ml	2 mg DAPI 1 ml 1x PBS	DAPI in 1 ml 1x PBS lösen und bei -20°C lagern.	Zur Visualisierung der Zellkerne in immunhistochemischen

			Färbungen.
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz(EDTA), 0,5 M pH 8	18,6 g EDTA Dinatriumsalz 1 N NaOH ddH <sub>2</sub> O	EDTA in 50 ml ddH <sub>2</sub> O, den pH durch die Zugabe von NaOH auf 8 einstellen und auf 100ml auffüllen. Autoklavieren.	Zur Herstellung des 50x TAE Puffers.
Mowiol (Polyvinylalkohol 4-88)	25 g ddH <sub>2</sub> O 6 ml Tris-HCl (1M) pH 8,5 6 g Mowiol (Polyvinylalkohol) 18,9 g Glycerin	ddH <sub>2</sub> O und 6ml Tris-HCl mischen und vorsichtig erwärmen. Unter ständigem Rühren 6g Mowiol dazugeben. Glycerin hinzugeben und erneut rühren und zentrifugieren. Lagerung bei -20°C.	Zur Einbettung von Zellen und Geweben nach immunhistochemischen Färbungen.
Paraformaldehyd, 20% (20% PFA)	134 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 100 g PFA (Sigma) 10 ml NaOH, 32% 7 ml HCl. 37%	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O in 1600 ml autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen und unter ständigem Rühren auf 60°C erhitzen. PFA zu der erhitzten Lösung geben und durch Zugabe von NaOH vollständig lösen. Die Lösung auf Eis abkühlen und den pH mit HCl auf 7,4 einstellen. Bei 20°C lagern.	Zur Herstellung von 4% PFA (Verdünnung).
Paraformaldehyd, 4% (4% PFA)	20% PFA Autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	50 ml 20% PFA in 200 ml ddH <sub>2</sub> O lösen. Lagerung bei 4°C.	Fixierung von Zellen und Geweben.
Phosphatgepufferte Salzlösung, 0,15 M (10x PBS)	400 g NaCl 10 g KCl 58,7g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 10 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Komponenten in 5l ddH <sub>2</sub> O lösen und autoklavieren. Der pH der Lösung sollte etwa 7,4 sein. Bei Raumtemperatur lagern.	Für die Herstellung von 1xPBS.
Phosphatgepufferte	10x PBS	100 ml 10x PBS in	Waschschritte für

Salzlösung 1x (1x PBS)	autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	900 ml ddH <sub>2</sub> O lösen. Bei Raumtemperatur lagern.	immunhistochemische Färbungen, ELISAs und für die Zellkultur.
Poly-D-Lysine (PDL) Lösung	1 ml PDL 50 ml 1x PBS	1 ml PDL in 49 ml sterilem 1xPBS lösen. Die Lösung filtern, sterilisieren und sofort weiterverwenden. Keine Lagerung.	Zur Beschichtung von Deckgläsern in der Zellkultur.
SDS Laufpuffer (10x)	0,25 M TRIS 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS autoklaviertes ddH <sub>2</sub> O	Alle Komponenten in 800 ml autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen und auf 1l auffüllen. Bei Raumtemperatur lagern.	Laufpuffer für SDS-PAGE.
Sucroselösung, 30%	15 g Sucrose 50 ml 1x PBS	Sucrose in 30 ml 1x PBS lösen, Volumen mit 1x PBS auf 50 ml auffüllen. Lagerung bei 4°C.	Gefrierschutzmittel für fixiertes Gewebe.
Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE), 50x	242 g TRIS 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0.5 M EDTA ddH <sub>2</sub> O	TRIS in etwa 750 ml ddH <sub>2</sub> O lösen, Essigsäure und EDTA begeben und mit ddH <sub>2</sub> O auf ein totales Volumen von 1l auffüllen. Der pH sollte bei etwa 8,5 liegen. Autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.	Zur Herstellung von 1xTAE Puffer für Elektrophorese von Agarosegel.
Tris-Acetate-EDTA Puffer (TAE), 1x	20 ml 50x TAE ddH <sub>2</sub> O	20 ml 50x TAE Puffer in ddH <sub>2</sub> O lösen, auf 1l auffüllen. Bei Raumtemperatur lagern.	Laufpuffer für Agarosegels.
Blockpuffer (IHC)	5% FCS 10% 10xPBS 0,5% Triton-X100 ddH <sub>2</sub> O	Alle Komponenten in autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen.	Blockpuffer für Immunhistochemische Färbungen von Zellen und Mausgewebe.

Blockpuffer (ELISA)	4% FCS 3% Donor-Pferdeserum 3% Ziegen Serum 10% 10xPBS 0,05% Triton-X100 ddH <sub>2</sub> O	Alle Komponenten in autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen.	Blockpuffer für ELISA.
Waschpuffer (ELISA)	10% 10xPBS 0,05% Triton-X100 ddH <sub>2</sub> O	Alle Komponenten in autoklaviertem ddH <sub>2</sub> O lösen.	Waschpuffer für ELISA.
LB-Medium flüssig	10g Pepton 5g Hefeextrakt 5g NaCl 1000ml ddH <sub>2</sub> O	Komponenten in ddH <sub>2</sub> O lösen, autoklavieren. Antibiotikum nach dem Kühlen beifügen.	Wachstumsmedium für Bakterien für Klonierungen und Transformationen.
LB-Agar-Medium (fest)	10g Trypton 5g Hefeextrakt 5g NaCl 13g Agar	Komponenten in ddH <sub>2</sub> O lösen, autoklavieren. Antibiotikum nach dem Kühlen beifügen.	Wachstumsmedium für Bakterien für Klonierungen und Transformationen.

**Tabelle 3: Erstantikörper**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle/Hersteller
α-BTX Alexa594	Bungarus multicinctus	1:1000	Invitrogen
anti-Agrin (mouse)	Kaninchen	1:500	Markus A. Rüegg
anti-Agrin (human)	Kaninchen	1:1000	Markus A. Rüegg[60]
anti-Agrin (human) polyklonal	Kaninchen	1:750	Julia Meltoranta
anti-Polyhistidin-Tag	Maus	1:20	Helmholtz Zentrum

**Tabelle 4: Zweitantikörper**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Quelle/Hersteller
anti-Kaninchen Alexa 594	Ziege	1:1000	Invitrogen A11037
anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	1:1000	Invitrogen A11034
anti-Kaninchen IgG HRP	Ziege	1:1000	Invitrogen G21234
anti-Maus Alexa 488	Ziege	1:1000	Molec.Probes A11029
anti-Maus IgG Cy3	Ziege	1:500	Jackson 115-165-003
anti-Maus-HRP	Ziege	1:3000	Invitrogen G21040
anti-Mensch Alexa 488	Ziege	1:1000	Invitrogen A21215
anti-Mensch Alexa 594	Ziege	1:1000	Invitrogen A11014
anti-Mensch-HRP	Ziege	1:1000	Invitrogen H10507

**Tabelle 5: Zellmedien**

<b>Medium</b>	<b>Komponenten</b>	<b>Herstellung</b>	<b>Verwendung</b>
Zellmedium für Wachstum der Zellen	DMEM 10% FCS 1% Penicillin-Streptomycin	FCS und Pen/Strep in DMEM lösen. Bei 4°C lagern.	Nährmedium für Zellkulturen.
Zellmedium für die transfizierten Zellen	DMEM 1% Pen/Strep	Pen/Strep in DMEM lösen. Bei 4°C lagern.	Nährmedium für transfizierte Zellen.
Opti-MEM®, 10% für Transfektion			Zellmedium für die Transfektionen mit Lipofectamine® Reagenz.

### 2.1.2 Seren

Die in dieser Studie verwendeten Seren stammen von Patienten des Friedrich-Baur-Institutes in München, der Neurologischen Abteilung des Universitätsklinikums Regensburg und der Neurologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen. Die Diagnose der Myasthenia gravis basierte auf der klinischen Erscheinung der Patienten und auf neurophysiologischen Untersuchungen wie Elektromyographie und repetitiver Nervenstimulation. Klinische Daten wurden entsprechend der MGFA Klassifikation[9] gewertet. Weitere Informationen zu den Patienten waren Alter, Geschlecht und Informationen über die Ergebnisse von Nervenserienreizungen und Endophoniumchlorid-Tests. Außerdem wurden Therapieversuche und das Ansprechen auf unterschiedliche Pharmaka (inklusive Anticholinergika) registriert, wobei das Auftreten von Nebenwirkungen, Überempfindlichkeiten, eine Verschlechterung der Symptome oder mangelnde Wirkung der Therapie als Therapieversagen gewertet wurden.

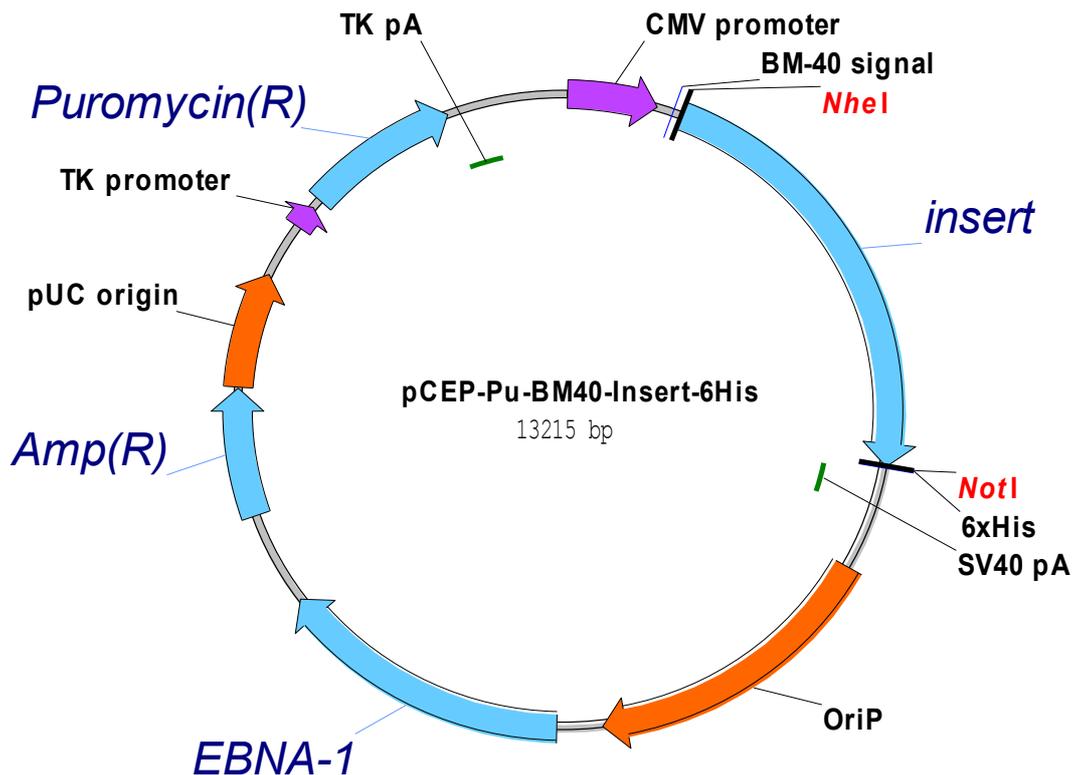
Viele der Seren wurden bereits in einer vorangehenden Publikation der Arbeitsgruppe von Professor Kröger beschrieben[28]. Insgesamt wurden 54 Patientenserum getestet, darunter 30 Seren von Patienten mit anti-AChR- und anti-MuSK-seronegativer Myasthenia gravis, 9 Seren von Patienten mit anti-AChR-seropositiver Myasthenia gravis und 15 Seren von

Patienten mit anti-MuSK-seropositiver Myasthenia gravis. Als Kontrollgruppe dienten Seren von 16 gesunden Probanden. Zusätzlich wurde – wie schon in Pevzner et al.[28] beschrieben – ein Patient mit genetisch bestätigtem adulten Morbus Pompe in die Studie mit eingeschlossen. Alle Serumproben wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und in vollem Einverständnis der Patienten entnommen. Die Seren wurden anonymisiert und alle Experimente doppelblind durchgeführt. Diese Arbeit wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Aktenzeichen der Genehmigung: 184-08).

### **2.1.3 Humanes mini-Agrin im pCEPPu-Vektor**

Ein pCEP-Pu-BM40-Vektor basierend auf dem Gerüst eines pCEP4-Vektors wurde zur Expression von humanem mini-Agrin in HEK293 Zellen verwendet. Das Konstrukt wurde von Dr. Valerie Risson und Dr. Laurent Schaeffer (University of Lyon, Frankreich) für diese Studie zur Verfügung gestellt.

Der Vektor kodiert neben humanem mini-Agrin für eine Ampicillin-Resistenz, eine Puromycin-Resistenz und für eine BM40-Signalsequenz, welche für die Sekretion des mini-Agrins in den Extrazellulärraum verantwortlich ist. Am C-terminalen Ende der mini-Agrin-Sequenz befindet sich eine Polyhistidin-Tag-Sequenz bestehend aus sechs Histidinen. Das pCEP-Pu-BM40-Konstrukt wurde zur Transfektion von HEK 293 Zellen und der darauffolgenden Gewinnung und Reinigung von humanem Agrin verwendet. Außerdem wurde die für humanes mini-Agrin kodierende Sequenz aus dem pCEP-Pu-BM40-Konstrukt zur Klonierung des pMES-mini-Agrin-Vektors verwendet.



**Abbildung 3: pCEPPu-BM40-mini-Agrin**

Das pCEPPu-BM40-mini-Agrin-Plasmid basiert auf dem pCEP4-Vektor und kodiert für humanes mini-Agrin. Der Vektor enthält eine Ampicillin- und eine Puromycinresistenz. Am C-terminalen Ende der Sequenz für mini-Agrin liegt eine Sequenz für ein Polyhistidin-Tag, welches für die Erkennung des Proteinproduktes hilfreich ist. Bei der BM-40-Sequenz handelt es sich um eine Signalsequenz, welche zur Sekretion des produzierten mini-Agrins führt. (Quelle: Dr. Risson und Dr. Schäfer, University of Lyon, Frankreich)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **Bakterienkultur und Transformation**

Alle Klonierungsschritte erfolgten mit Escherichia coli Bakterien (E.coli) des Stammes TOP10. Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder auf LB-Agarplatten im Brutschrank oder in flüssigem LB-Medium im Schüttler bei 300 rpm und 37°C. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde ein Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 1000 mg/ml verwendet. Für die Transformation wurden 50 µl kompetenter E.coli Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurden dann etwa 200-300 ng DNA hinzugefügt, woraufhin die Mischung für 15 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Ein Hitzeschock von 30 Sekunden bei 45°C diente der Aufnahme des Plasmids; anschließend erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Dann wurden der Mischung 900 µl LB-Medium beigemischt und alles bei 37°C für 45 Minuten im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert, in etwa 100 µl des Überstandes durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gelöst und dann auf LB-Platten mit Ampicillin zur Selektion ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **DNA-Extraktion aus transformierten E.coli Bakterien und DNA-Restriktionsverdau**

Die Isolierung von DNA-Plasmiden aus transformierten E.coli Bakterien erfolgte mithilfe des Zippy® Plasmid Miniprep Kits von Zymo Research bzw. dem NucleoBond Xtras Maxi EF Maxiprep-Kits von Macherey Nagel, wobei die Anweisungen in den Protokollen des Herstellers befolgt wurden. Die isolierte DNA wurde entweder in nukleasefreiem H<sub>2</sub>O oder dem im Kit bereitgestellten Lösungspuffer gelöst und bei -20°C gelagert. Mithilfe von Restriktionsenzymen kann DNA an vorgegebenen Stellen geschnitten werden. Dies wurde sowohl zur Kontrolle der DNA-Konstrukte als auch zum Herausschneiden einer gewünschten DNA-Sequenz aus einem Konstrukt durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Proben mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an Restriktionsenzymen und Puffern versetzt und anschließend für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde daraufhin durch Zugabe eines Ladepuffers unterbrochen.

## **Agarosegel-Elektrophorese**

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden Agarosegele in einer Konzentration von 0,8 Prozent verwendet. Die Agarose wurde dabei in TAE-Buffer aufgekocht. Dem noch flüssigen Gel wurden vor der Abkühlung 2 Tropfen pro 50 ml Ethidiumbromid beigefügt, um die DNA-Fragmente in UV-Licht sichtbar zu machen. Anschließend wurden die unterschiedlichen mit Ladepuffer versetzten DNA-Proben in die Taschen des Agarose-Gels gegeben; die Auftrennung erfolgte bei circa 100-120 mV.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Gels nach abgeschlossener Auftrennung unter UV-Licht fotografiert (302 nm, Molecular Imager® Gel Doc™ XR System, Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA). Für eine Weiterverwendung der DNA-Fragmente wurden diese unter einer UV-Lampe (Dark Reader Transilluminator, Clare Chemical Research, Dolores, USA) mithilfe eines Skalpell aus dem Gel geschnitten.

## **Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, Ligation und Konzentrationsbestimmung**

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin® Extract II von Macherey-Nagel verwendet, wobei nach der Anleitung des Herstellers in den Protokollen vorgegangen wurde. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden 1 µl Ligase (New England BioLabs, Massachusetts, USA – 400 000 U/ml), 2 µl Ligationspuffer, der leere Vektor und das Insert (im Verhältnis von 1:6) in H<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gelöst. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Der DNA-Gehalt gelöster DNA-Proben wurde mithilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für die Sequenzierung von DNA-Konstrukten wurden Primersequenzen in einer Länge von etwa 30 Basenpaaren mithilfe des Programmes ApE (Version 1.17, Software von Wayne Davis, University of Utah, USA) definiert. Die Primerherstellung und Sequenzierung wurde kommerziell von Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

## **Klonierung des pMES-mini-Agrin-Vektors**

Durch die Klonierung der Sequenz für humanes mini-Agrin in den pMES-Vektor konnte ein Plasmid hergestellt werden, welches es ermöglicht, bei einer Transfektion die transfizierten Zellen ohne weitere Färbung zu erkennen und von untransfizierten Zellen zu unterscheiden. Der pMES-Vektor enthält eine „internal ribosomal entry site“, die eine Expression des fluoreszierenden EGFP-Proteins zusätzlich zum mini-Agrin ermöglicht. Als Ausgangsmaterial für die Klonierung dienten das leere pMES-Plasmid und der pCEPPu-BM40-mini-Agrin-Vektor (Dr. Risson, Dr. Schaeffer). Die für mini-Agrin kodierende Sequenz konnte mitsamt der BM40 Signalsequenz mithilfe der beiden Restriktionsenzyme HindIII und NotI aus dem pCepPu-Vektor geschnitten werden. Unter Verwendung des Restriktionsenzym Smal wurde das leere pMES-Plasmid geöffnet; die Auffüllung der überstehenden einzelsträngigen Sequenzen des Inserts gelang mithilfe von Klenow-Fragment. Anschließend wurde das Insert mit einer Ligase in das leere, geschnittene pMES-Plasmid eingefügt.

## **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

### **Zellkultur**

Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten mit sterilen Materialien unter Verwendung einer Sterilwerkbank der BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland). Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um menschliche embryonale Nierenzellen – „human embryonic kidney“ (HEK) 293 Zellen. Die Zelllinien wurden in den in Tabelle 5 angegebenen Medien in einem Inkubator (Binder, Tuttlingen) bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 Prozent kultiviert. Die Zellen wurden je nach Anforderungen der Experimente entweder in Zellkulturflaschen oder in Multi-Well-Platten kultiviert und etwa einmal pro Woche geteilt. Für die Teilung und Umsetzung der Zellen wurden diese in mehreren Waschschritten mit PBS gewaschen, mithilfe von Trypsin von der Oberfläche der Flasche oder der Platte gelöst, zentrifugiert und in der gewünschten Konzentration in frischem Medium auf eine neue Platte oder eine Zellkulturflasche gegeben.

## **Transfektion von HEK 293 Zellen und Gewinnung des Zellüberstandes**

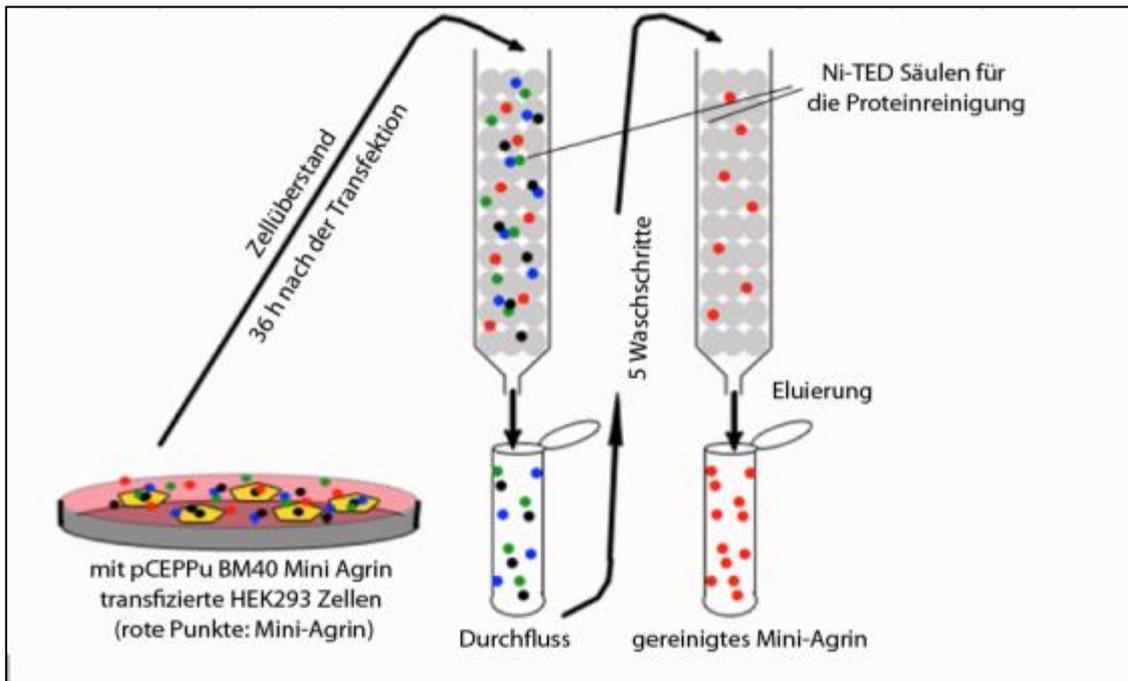
Transiente Transfektionen der HEK293 Zellen wurden mit dem Lipofectamine Transfection Reagenz (Invitrogen AG, Carlsbad, USA) durchgeführt, wobei nach den Protokollen des Herstellers vorgegangen wurde. Die Zellen wurden dabei etwa 24 Stunden vor der Transfektion geteilt und in entsprechender Anzahl in antibiotikafreiem Medium auf eine Multi-Well-Platte bzw. in eine Flasche gegeben. Nach etwa 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mehrere Male mit PBS gewaschen und anschließend in frischem Medium mit dem DNA/Lipofectamine-Gemisch für 4-5 Stunden erneut bei 37°C inkubiert. Für immunohistochemische Färbungen wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit 3,7-prozentigem Formaldehyd für 20 Minuten fixiert.

Zur Gewinnung von gereinigtem humanen mini-Agrin wurden HEK 293 Zellen wie in 2.2.1 beschrieben mit dem pCEPPu-BM40-mini-Agrin-Plasmid (siehe Abschnitt 2.3.1) transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurde das Zellmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Nährmedium ohne FCS weitere 36 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Zellmedium entnommen, bei 1000 rpm für 6 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

### **2.2.3 Biochemische Methoden**

#### **Proteinreinigung von humanem mini-Agrin**

Zur Gewinnung von gereinigtem humanen mini-Agrin aus dem Zellüberstand transient transfizierter HEK293 Zellen wurde das Protino® Ni-TED 1000 von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet, welches der Isolierung von Polyhistidin-markierten Proteinen dient. Die Reinigung des Proteins beruht hierbei auf der sogenannten immobilized ion affinity chromatography (IMAC), in der das Protein durch eine Interaktion des Polyhistidin-Tags mit einem geladenen Ni<sup>2+</sup>-Ion gereinigt wird. Die Reinigung von mini-Agrin erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei anstelle der zwei empfohlenen Waschschrte jeweils fünf Waschschrte durchgeführt wurden. So konnten aus sieben ml Zellüberstand von transfizierten HEK 293 Zellen etwa 250 µg gereinigtes mini-Agrin gewonnen werden. Die Konzentration des gereinigten Proteins in der so gewonnenen Lösung wurde mithilfe von Coomassie-Färbungen bestimmt (siehe *Ergebnisse*).



**Abbildung 4: Proteinherstellung und –reinigung von humanem mini-Agrin**

Zur Herstellung von humanem mini-Agrin wurden HEK 293 Zellen mit dem pCEPPu-BM4-mini-Agrin-Vektor transient transfiziert. Nach etwa 36 Stunden wurde der Zellüberstand entnommen und mit Hilfe von Ni-TED Säulen gereinigt. Das humane mini-Agrin enthält C-terminal ein Polyhistidin-Tag, welche die Aufreinigung des Proteins in Ni-TED Säulen ermöglicht.

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zuerst ein zehnprozentiges Trenngel hergestellt, welches bis zur Polymerisation mit Isopropanol bedeckt wurde. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (5-prozentig) über das Trenngel geladen. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 3:1 mit 4xSDS versetzt und für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht, bevor sie in die Taschen des polymerisierten Sammelgels geladen wurden. Das Volumen der Taschen betrug entweder 26 µl (15 Taschen) oder 44 µl (9 Taschen). Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Elektrophoresepuffer zuerst bei 80 V – bis zur Überschreitung des Sammelgels – anschließend bei 120 V. Nach Ablauf der Elektrophorese erfolgte entweder die Färbung der Gele mit Coomassie- oder Silberfärbung oder das Blotten auf eine PVDF-Membran zur Erstellung eines Western Blots.

## **Western-Blotting**

Um die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot detektieren zu können, wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die Membran zuerst für wenige Minuten in Methanol geschwenkt und anschließend für 5-7 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Vier Blottingpapierstücke in entsprechender Größe wurden ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Für den Transfer der Proteine wurden dann zuerst zwei Blottpapierstücke auf die Anode des Blotapparates gelegt; darauf wurde dann die PVDF-Membran, das Gel und wieder zwei Stücke Blottingpapier gegeben. Der gesamte Aufbau wurde dann luftblasenfrei mit der Kathodenplatte der Apparatur verschlossen. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 15 mV und einer Stromstärke von 0.32mA pro Gel (6x8 cm) für 50 Minuten.

Nach dem Transfer wurden die PVDF-Membranen in TBS-T mit 3-prozentigem Magermilchpulver entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation des in TBS-T verdünnten Erstantikörpers erfolgte anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur, woraufhin die Membran dreimal für zehn Minuten in TBS-T gewaschen wurde. Anschließend wurde ein mit Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper ebenfalls in TBS-T verdünnt und für 60 Minuten auf die Membran gegeben. Nach weiteren drei Waschschritten wurde die Membran für fünf Minuten mit Luminol Enhancer Solution und Peroxide Solution (Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, München, Deutschland) im Verhältnis von 1:1 in Dunkelheit inkubiert, bevor die Reaktion durch Auflegen eines Films in der Dunkelkammer sichtbar gemacht wurde. Je nach Konzentration der Erst- und Zweitantikörper und der Menge an geladenem Protein variierte die Dauer der Filmexposition zwischen 30 Sekunden und zwei Minuten.

## **Silberfärbung und Coomassie-Färbung**

Für die Detektion der Proteine im SDS-Gel mithilfe von Coomassie Blau (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Gele direkt nach der Gelelektrophorese über Nacht bei 4 °C in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend für ungefähr 24 Stunden bei 25°C entfärbt.

Für die Silberfärbung wurden die Gele nach dem Lauf für 30 Minuten in Fixierlösung gefärbt, anschließend zweimal für je zwei Minuten mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für weitere 60 Minuten in H<sub>2</sub>O geschüttelt. Die darauffolgende Sensibilisierung des Gels für 1-2 Minuten im Sensibilisierungspuffer gefolgt von zwei weiteren Waschsritten für je zehn Sekunden erfolgte bei Raumtemperatur; die Färbung der Proteine in 0.1-prozentiger Silbernitratlösung hingegen erfolgte bei 4°C für 30 Minuten. Anschließend wurde die Membran erneut mit H<sub>2</sub>O gewaschen (zweimal für je 30 Sekunden), bevor sie in der Entwicklerlösung solange geschüttelt wurde, bis die Proteinbanden eindeutig erkennbar und der Rest des Gels entfärbt war. Die Reaktion wurde dann mit einprozentiger Essigsäure geblockt.

## **ELISA**

Zur Detektion von anti-Agrin-Immunglobulinen in den Patientenseren wurden ELISAs durchgeführt, in denen transparente 96-well ELISA-Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit isoliertem mini-Agrin beschichtet wurden. Dazu wurde das Antigen in einer Konzentration von ungefähr 0,17 mg/ml in 100 µl Adsorptionpuffer auf die Platten gegeben und diese bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Seren wurden dann in unterschiedlichen Konzentrationen in Blockpuffer verdünnt und für zwei Stunden auf die Platten gegeben, wonach diese für drei mal zwei Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen wurden. Mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelte Sekundärantikörper – ebenfalls in Blockpuffer – wurden dann für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur auf die Platte gegeben. Nach weiteren fünf Waschsritten (zweimal mit Waschpuffer, dreimal mit PBS – je zwei Minuten) wurden die Platten für 23 Minuten mit 100 µl TMB pro Well inkubiert. Um die dadurch hervorgerufene Farbreaktion zu stoppen, wurden ohne vorheriges Entfernen des TMBs 100 µl 1 molarer HCL hinzugegeben. Anschließend wurde die optische Dichte der einzelnen Wells mithilfe des ELISA Readers PowerWave XS (BioTek, Winooski, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Für jedes Serum wurde die an einer unbeschichteten ELISA-Platte bestimmte optische Dichte (unspezifische Bindungen) von der an der beschichteten Platte gemessenen optischen Dichte abgezogen und die Differenz für die statistische Auswertung verwendet.

## **2.2.4 Tierexperimentelle Methoden**

### **Haltung und Perfusion der Versuchstiere**

Die in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp-Mäuse entstammen der BL6 Mauslinie 34. Die Mäuse wurden in einem 12:12 Hell/Dunkel-Zyklus im Tierhaus der Ludwig-Maximilians-Universität, Schillerstraße 44, gehalten. Die Mäuse wurden jeweils zu zweit in einem Käfig gehalten.

Die Perfusion der Mäuse erfolgte mit einer Perfusionspumpe (MINIPULS® 3, Gilson, Inc., Middleton, WI, USA). Die Mäuse wurden vor der Perfusion durch eine intraperitoneale Applikation von etwa 300 µl Lösung (1,0 ml Ketaminhydrochlorid (10-prozentig, etwa 100 mg/kg Körpergewicht, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland), 0,25 ml Xylazinhydrochlorid (2-prozentig, etwa 5 mg/kg Körpergewicht; Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany) und 2,5 ml Salzlösung (0,9-prozentiges Natriumchlorid; Braun, Germany) anästhesiert und nach einer Reflextestung zur Überprüfung der erfolgreichen und vollständigen Anästhesie perfundiert. Die Perfusion erfolgte transkardial mit PBS für fünf Minuten und mit 4-prozentigem PFA in PBS für 20 Minuten. Anschließend wurden die Muskeln präpariert, erneut in 4-prozentigem PFA fixiert (etwa 15 Minuten), mit PBS gewaschen und bei 4°C in PBS bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Für die Färbungen wurden die fixierten Muskeln in 30-prozentiger Sucrose (in PBS) gelegt und anschließend in Tissue-Tek gebettet und am Kryostat in 12 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese Schnitte konnten bei -20°C gelagert werden.

## **2.2.5 Immunhistologische Methoden**

### **Färbung transient transfizierter HEK 293 Zellen**

Um die erfolgreiche Transfektion der HEK 293 Zellen nachzuweisen und humane Seren auf Antikörper gegen das von den Zellen produzierte Protein zu testen, wurden HEK293 Zellen 48 Stunden nach der Transfektion gefärbt. Die Zellen wurden dafür mit Formaldehydlösung (37-prozentig), welches direkt ins Zellmedium gegeben wurde (Endkonzentration 3,7 Prozent), für zwanzig Minuten fixiert. Nach drei Waschschritten von je zehn Minuten mit PBS wurden die Zellen dann 60 Minuten in Blockpuffer inkubiert. Sowohl die verwendeten Erstantikörper als auch die getesteten Humansenen wurden dann in Blockpuffer verdünnt

und auf die Zellen gegeben, welche dann entweder für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C darin inkubiert wurden. Darauf folgten weitere drei 10-minütige Waschschrte und die Inkubation mit in Blockpuffer gelösten fluoreszierenden Zweitantikörpern für 1,5 Stunden. Anschließend wurde wieder gewaschen und die Zellkerne wurden durch eine Inkubation in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1µg/ml) für zwanzig Minuten angefärbt. Die Färbungen wurden mit Hilfe des konfokalen Laser Scanning Mikroskops Zeiss LSM 710 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert. Für anschließende Bearbeitungen der Bilder sowie Anpassungen von Kontrast und Helligkeit wurde Adobe Photoshop (Version CS3, Adobe, Mountain View, CA, USA) verwendet.

### **Färbung von Mausgewebe**

Für die Färbung von Muskelschnitten wurden diese nach dem Auftauen 60 Minuten in Blockpuffer inkubiert, woraufhin entweder ein Erstantikörper gegen Agrin oder die humanen Seren in Blockpuffer verdünnt über Nacht bei 4°C auf die Schnitte gegeben wurden. Nach drei jeweils 10-minütigen Waschschrten mit PBS wurden Bungarotoxin zur Anfärbung der neuromuskulären Endplatten sowie fluoreszierende Zweitantikörper in Blockpuffer verdünnt und für 1,5 Stunden auf die Muskelschnitte gegeben. Dann wurden die Schnitte noch für 20 Minuten in DAPI (2 µg/ml) inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Für alle Färbungen wurden Querschnitte des Musculus quadriceps verwendet. Die Färbungen wurden mithilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Zeiss LSM 710, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) analysiert.

### **2.2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Um die im ELISA beobachteten Ergebnisse auf statistische Signifikanz zu überprüfen, wurden paarweise Vergleiche der Stichproben im Student's T-Test durchgeführt (2-seitige Verteilung, 2 Stichproben mit gleicher Varianz). Die Auswertung erfolgte mithilfe von Excel (Microsoft Office 2010, Microsoft Corporation, Redmond, CA, USA).

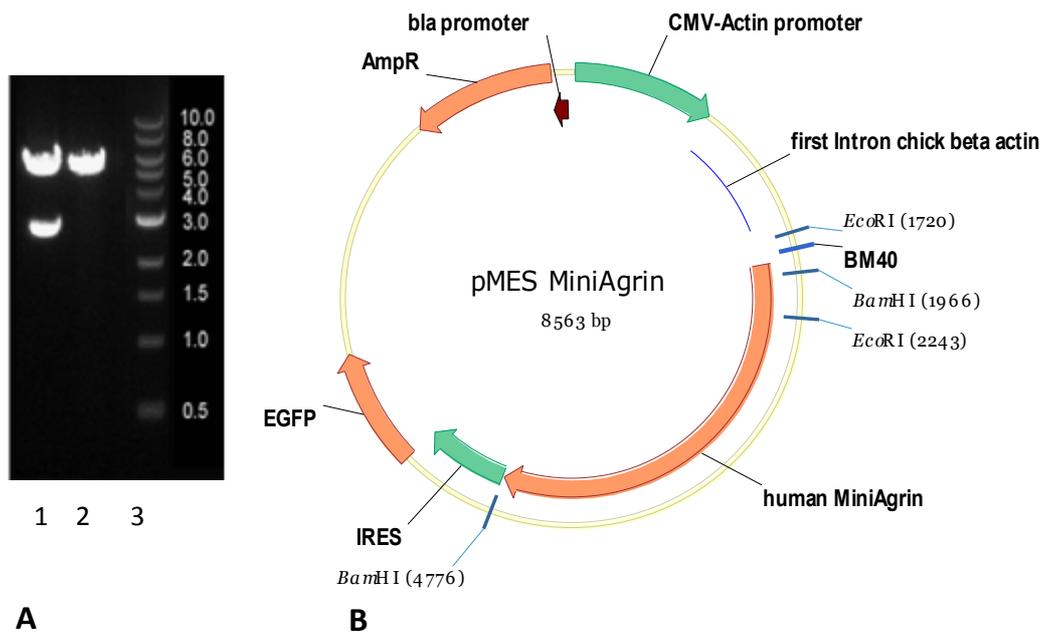
## 3 Ergebnisse

### 3.1 pMES-mini-Agrin-Vektor

Voraussetzung für die Untersuchung der Seren auf anti-Agrin-Autoantikörper ist ein funktionierendes, sensitives und standardisiertes Testsystem mit gereinigtem mini-Agrin. Um das mini-Agrin biochemisch zu reinigen und um die Expression von mini-Agrin in HEK Zellen zu erreichen, war eine Umklonierung der cDNA in den pMES-Vektor notwendig. Um zu überprüfen, ob die Klonierung der mini-Agrin-Sequenz in das pMES-Plasmid erfolgreich war, erfolgte ein Verdau des Konstruktes durch das Restriktionsenzym BamH1 (Abbildung 5A). Das leere pMES-Plasmid enthält eine Schnittstelle für BamH1, wodurch im Verdau nur eine Bande sichtbar wird. Das pMES-mini-Agrin-Plasmid hingegen enthält zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym BamH1, eine am Ende des mini-Agrin-Inserts und eine weitere im Anfangsteil des Insert. Deshalb kann in einem Verdau mit BamH1 fast das gesamte Insert aus dem pMES-mini-Agrin-Plasmid herausgeschnitten werden. In der Gelelektrophorese sind damit zwei Banden sichtbar – eine Bande von ca. 3000 bp stellt das mini-Agrin-Insert dar; die zweite Bande von etwa 5700 bp das pMES-Plasmid mit der BM40-Sequenz und einem kurzen Anfangsstück des mini-Agrins. In der Gelelektrophorese des Verdau des leeren pMES-mini-Agrin-Plasmids hingegen ist nur eine Bande zu erkennen, die die erwartete Größe von etwa 5500 bp hat.

Eine weitere Überprüfung der erfolgreichen Klonierung des mini-Agrin-Inserts in den pMES-Vektor erfolgte durch die Sequenzierung einzelner Sequenzabschnitte des Plasmids sowie durch eine spezifische Färbung von mit dem Plasmid transfizierten HEK293 Zellen durch anti-Agrin-Antikörper. Abbildung 14E zeigt die spezifische Bindung von anti-Agrin-Antikörpern an die transfizierten HEK293 Zellen.

Abbildung 5B zeigt eine schematische Darstellung des pMES-mini-Agrin-Konstruktes, welches die Sequenzen für EGFP, humanes mini-Agrin und die davor liegende BM40-Signalsequenz enthält.



**Abbildung 5: pMES mini-Agrin Vektor**

Zur Herstellung eines pMES-mini-Agrin-Vektors (B) wurde die für mini-Agrin kodierende Sequenz gemeinsam mit der BM40-Signalsequenz aus dem pCEPPu-mini-Agrin-Vektor (Abbildung 3) geschnitten und in einen leeren pMES-Vektor eingebracht. (A) zeigt den Testverdau des pMES-mini-Agrin-Vektors mit BamHI. Das Enzym schneidet fast das gesamte mini-Agrin Insert aus dem Vektor (A.1). Aufgrund nur einer vorhandenen BamHI Schnittstelle im leeren Vektor, zeigt sich beim Verdau des leeren Vektors (A.2) nur eine Bande. Ein 1kb Marker (A.3) dient der Größenbestimmung der Fragmente.

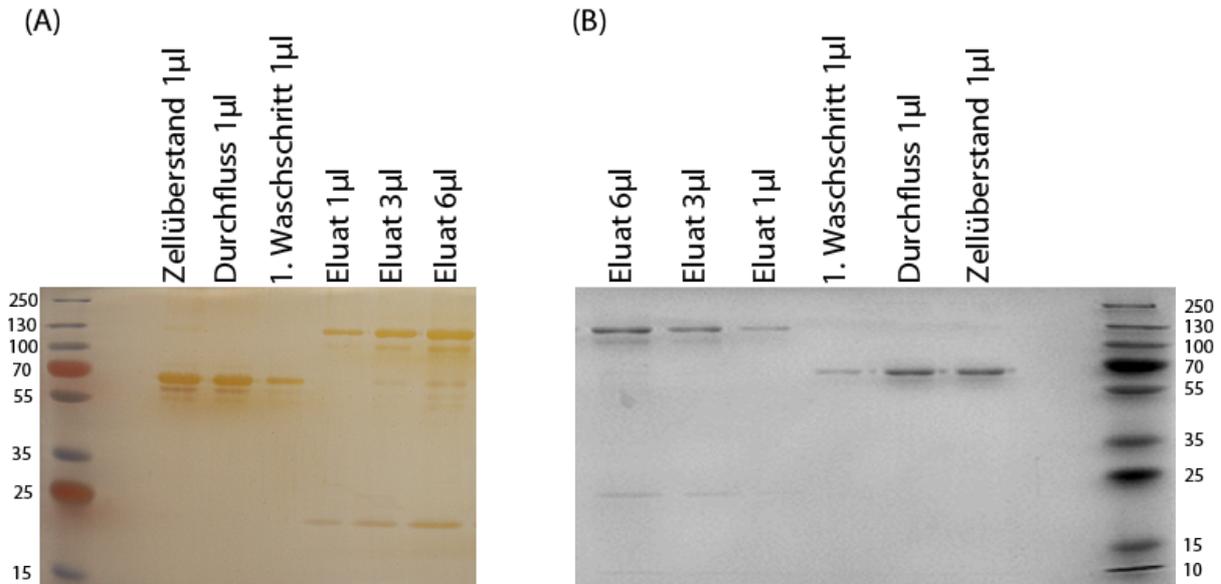
### 3.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von mini-Agrin

Um die Reinheit des aus dem Zellüberstand von transfizierten HEK293 Zellen gewonnenen mini-Agrins zu bestimmen, erfolgte eine Auftrennung der Proteine aller Einzelschritte der Reinigung mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Silber- (Abbildung 6A) und Coomassie-Färbung (Abbildung 6B).

Sowohl im Zellüberstand als auch im ersten Durchfluss und dem ersten Waschschrift bilden Proteine mit einer Größe von etwa 70 kDa die stärkste Komponente des Proteingemisches. Es handelt sich bei dieser Bande um Albumin, welches die Hauptkomponente des Zellmediums darstellt. In den unterschiedlichen Elutionslösungen allerdings ist die Bande dieser Proteine blasser, wohingegen Banden bei 130, 100 und etwa 25 kDa deutlich zu

erkennen sind. Alle drei Banden reagieren mit einem anti-Agrin-Antiserum und stellen deshalb wahrscheinlich unterschiedlich posttranslational modifiziertes Agrin dar. Die berechnete Masse des Proteinrückgrades von mini-Agrin beträgt etwa 100kDa; allerdings wurden in allen erstellten Färbungen und Nachweisen von mini-Agrin neben der 100 kDa Bande die beiden weiteren, teilweise deutlich stärkeren Banden bei 130 und 25 kDa sichtbar. Bei der 130 kDa Bande handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine glykosylierte Form von mini-Agrin. Da außer den drei Banden, die auch im Western Blot mit anti-Agrin-Antikörpern angefärbt werden konnten, keine weiteren Banden auftraten, lässt sich schließen, dass mini-Agrin erfolgreich gereinigt werden konnte.

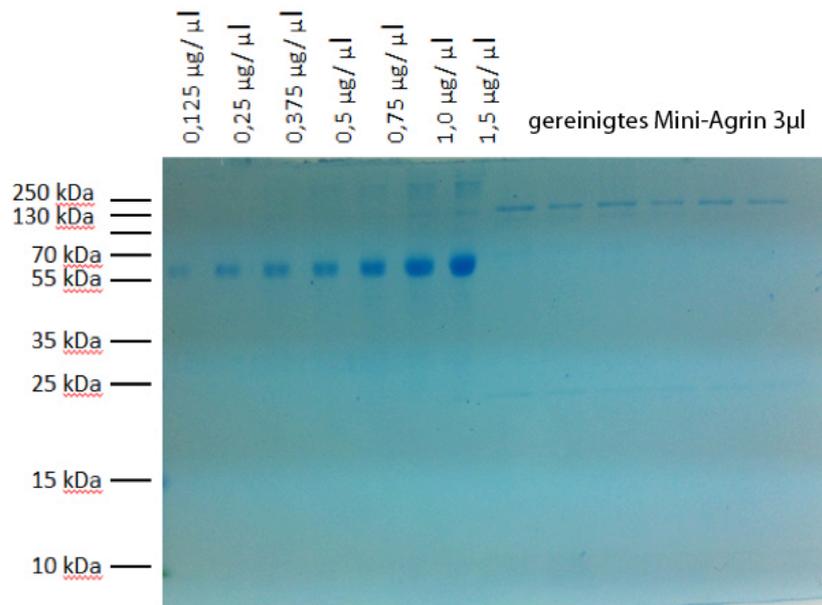
Da es sich bei der Silberfärbung um die sensitivere der beiden genannten Methoden handelt[68, 69], sind in den Elutionsfraktionen neben den für mini-Agrin charakteristischen drei Banden dort noch weitere Banden zu erkennen. Dies spricht für eine nicht vollständige Reinheit der Elutionsfraktionen. Da in der weniger sensitiven Coomassie-Färbung ausschließlich die Banden zu erkennen sind, die sich beim Vorhandensein von mini-Agrin erwarten lassen, ist die Verunreinigung mit anderen Proteinen als sehr gering anzusehen. Aus etwa 14 ml Medium von transient transfizierten HEK293 Zellen konnten etwa 500 µg gereinigtes mini-Agrin gewonnen werden. Mithilfe von Western Blots mit Antikörpern gegen Agrin und das Polyhistidin-Tag erfolgte eine zusätzliche Überprüfung des gereinigten mini-Agrins (siehe Abbildung 8)



**Abbildung 6: Reinigung von mini-Agrin aus dem Zellüberstand transfizierter HEK 293 Zellen**

*Diese Abbildung zeigt die Silberfärbung (A) und Coomassie-Färbung (B) des Zellüberstandes, des Durchflusses, des ersten Waschschrilles und der Elution aus der Proteinreinigung von humanem mini-Agrin. Zur Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden 10-prozentige SDS-Gele verwendet. Während im Zellüberstand, im Durchfluss und im ersten Waschschrift eine deutliche Bande bei ungefähr 70 kDa zu erkennen ist, sieht man in den Elutionen die für mini-Agrin charakteristischen Banden bei 130, 100 und 20 kDa. Bei der Bande mit einer Größe von 70 kDa handelt es sich um andere im Zellüberstand enthaltene Proteine, wobei Serumalbumin einen großen Teil davon ausmacht.*

Die Konzentrationsbestimmung des gereinigten humanen mini-Agrins in der Elutionslösung erfolgte durch eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und dem Vergleich mit Albumin. Albumin hat eine molekulare Masse von etwa 66 kDa – die entsprechenden Banden sind in den Vergleichsproben deutlich zu erkennen. Gelöstes Albumin in Konzentrationen von 0,125 µg/µl bis 1,5 µg/µl diente als Vergleichsprobe. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch einen Intensitätsvergleich der Banden; zu diesem Vergleich wurde die 130 kDa Bande herangezogen. Daraus ließ sich für die Elutionslösungen der Reinigung von humanem mini-Agrin eine Konzentration von ungefähr 0,167 µg/µl bestimmen. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe eines Bradford-Tests war aus unklaren Gründen nicht möglich.



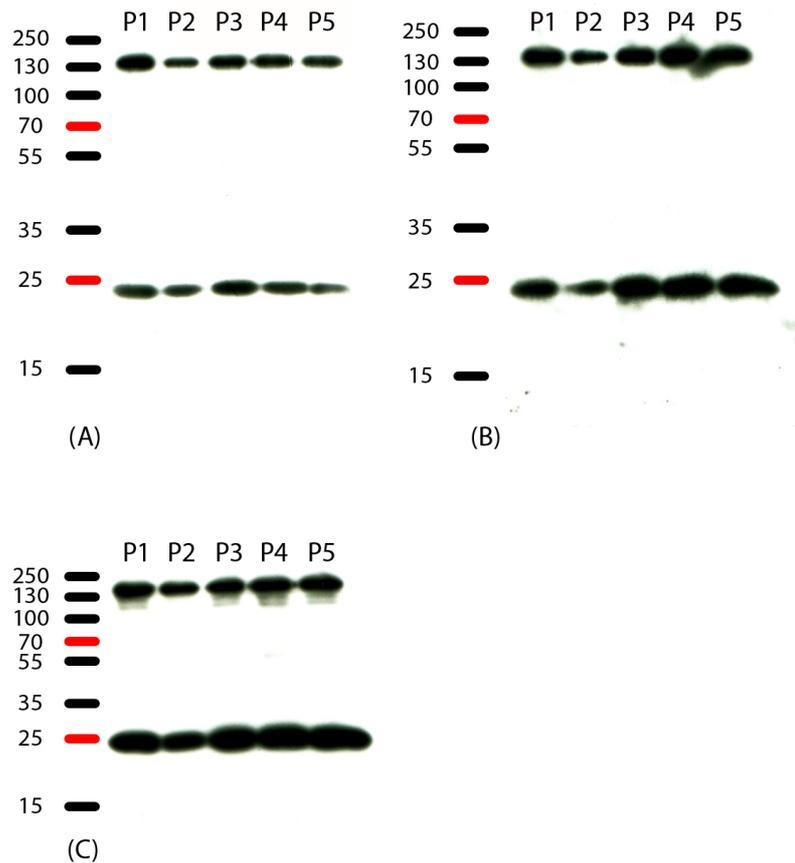
**Abbildung 7: Konzentrationsbestimmung des gereinigten humanen mini-Agrins**

Zur Bestimmung der Konzentration des gereinigten mini-Agrins wurde eine SDS-PAGE mit unterschiedlichen Konzentrationen an Albumin als Vergleichsstandard durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend mithilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Man kann die in Abhängigkeit von der Menge des aufgetragenen Proteins unterschiedlich dicken Banden des Albumins bei circa 66 kDa erkennen. Als Proben des gereinigten humanen mini-Agrins wurden je 3 µl der Elutionslösung aufgetragen.

### 3.3 Charakterisierung von mini-Agrin durch Western Blotting

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem aus dem Zellüberstand von mit dem pCEPPu-mini-Agrin-Plasmid transfizierten HEK293 Zellen gereinigten Protein um mini-Agrin handelt, erfolgte eine Analyse der Elutionslösung im Western Blot. Abbildung 8 zeigt, dass sowohl die beiden verwendeten anti-Agrin-Antikörper, als auch der Antikörper gegen das Polyhistidin-Tag an das gereinigte Protein binden. Für alle verwendeten primären Antikörper lassen sich die im SDS-PAGE (siehe Abbildung 6) beschriebenen erwarteten Banden deutlich erkennen. Wie schon in der Coomassie- und Silberfärbung beobachtet, sind die Banden bei etwa 130 kDa und 25 kDa immer deutlich zu erkennen, während die Bande bei 100 kDa nur dann auftritt, wenn größere Mengen an Protein, höhere Antikörperkonzentration oder eine längere Belichtungszeit angewendet wurden. Aus der Tatsache, dass auch der anti-

Polyhistidin-Tag-Antikörper an die 25 kDa Bande bindet, lässt sich schließen, dass mini-Agrin am C-terminalen Teil geschnitten wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass mini-Agrin erfolgreich aus dem Zellüberstand der transfizierten HEK293 Zellen gewonnen werden konnte.

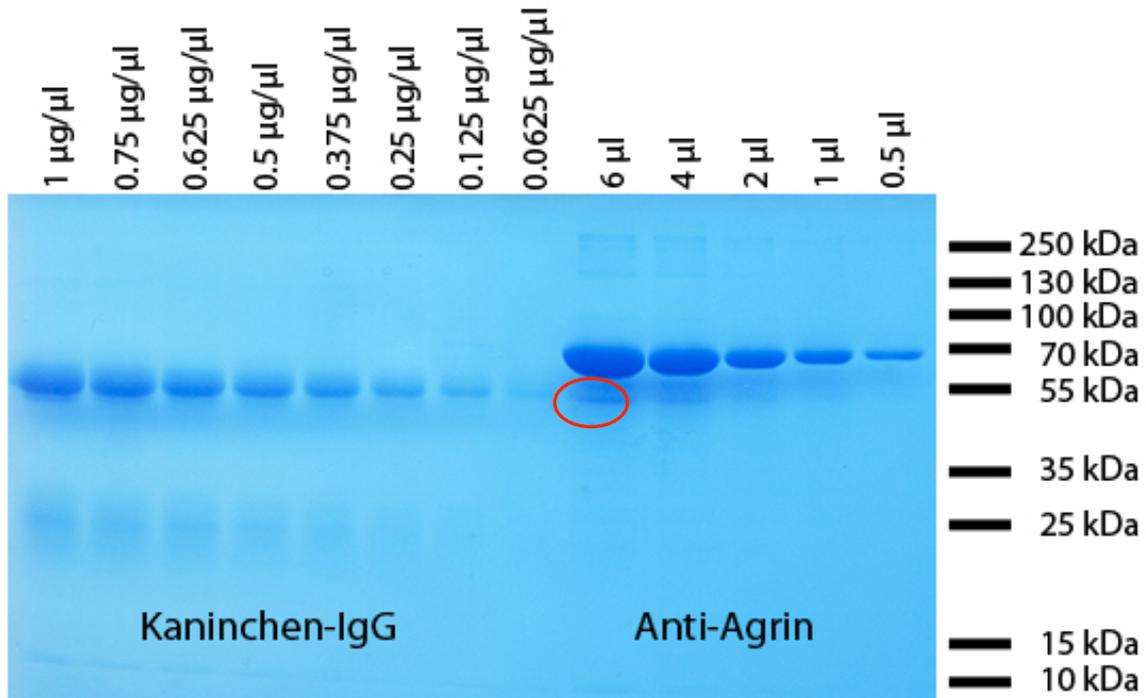


**Abbildung 8: Western Blot des gereinigten mini-Agrins**

*Aufgrund des Polyhistidin-Tags konnte humanes mini-Agrin mithilfe von Ni-TED Säulen gereinigt werden. Die Elutionsfraktionen wurden im Western Blot analysiert. Zur Identifizierung der mini-Agrin-spezifischen Banden wurden drei primäre Antikörper verwendet. Zwei davon binden spezifisch an mini-Agrin, der dritte bindet spezifisch an das Polyhistidin-Tag des Proteins. In allen drei Western Blots lassen sich deutlich zwei Banden erkennen, eine bei 130kDa und eine weitere bei etwa 20 kDa. Eine dritte Bande bei 100 kDa erschien in allen Versuchen bei hoher Konzentration an Protein oder Antikörper oder deutlich verlängerter Belichtungszeit (nicht dargestellt).*

### **3.4 Konzentrationsbestimmung des polyklonalen anti-Agrin-Antikörpers**

Da für eine spätere Bestimmung der Konzentrationen der anti-Agrin-Antikörper in den Patientenseren die Kenntnis der Konzentration des als Positivkontrolle verwendeten polyklonalen anti-Agrin-Antikörpers vonnöten war, wurde eine SDS-Page mit nachfolgender Coomassie-Färbung durchgeführt. Als Vergleichsreihe diente dabei eine Proteinlösung von gereinigtem Immunglobulin G (IgG) in Konzentrationen 0,0625 µg/µl bis 1 µg/µl. Abbildung 9 zeigt die entsprechende Coomassie-Färbung. Durch den Vergleich der 50 kDA Bande des von Frau Dr. Meltoranta zur Verfügung gestellten polyklonalen Antikörpers (roter Kreis) mit den 50 kDA Banden des Kaninchen-IgGs in unterschiedlichen Konzentrationen mithilfe der Intensitätsmessung in Photoshop XS wurde so eine ungefähre Konzentration von etwa 0,75 µg/µl für den polyklonalen anti-Agrin-Antikörper berechnet. Diese Methode der Konzentrationsbestimmung wurde gewählt, da der anti-Agrin-Antikörper in einer Lösung mit einem großen Anteil an Albumin gelöst ist. Dies machte andere Methoden der Konzentrationsbestimmung wie beispielsweise den Bradford-Test unmöglich.



**Abbildung 9: Konzentrationsbestimmung des anti-Agrin-Antikörpers**

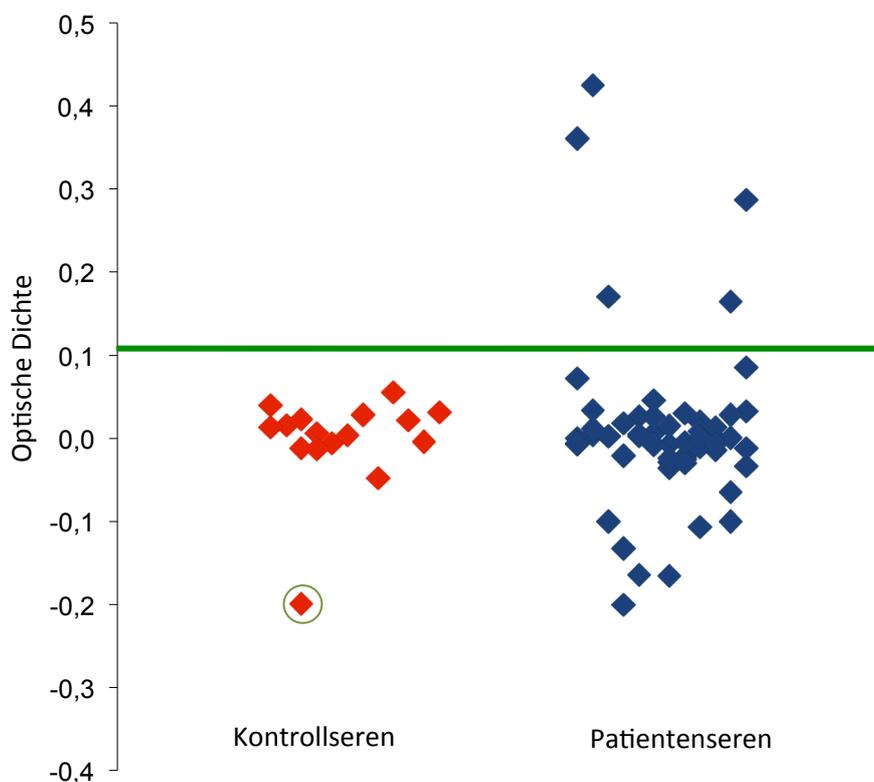
Zur Bestimmung der Konzentration des im ELISA und den Färbungen verwendeten polyklonalen anti-Agrin-Antikörpers wurde eine SDS-PAGE mit unterschiedlichen Konzentrationen an Kaninchen-Immunglobulin G (IgG) als Vergleichsstandard durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend mithilfe einer Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Menge des aufgetragenen Proteins und die daraus resultierenden unterschiedlich starken Banden der schweren und der leichten Ketten des IgGs bei etwa 50 und 22 kDa sind erkennbar. Zur Bestimmung der Konzentration des polyklonalen Antikörpers wurden die 50 kDa Banden des anti-Agrin-Antikörpers mit den Banden der IgG-Vergleichsreihe verglichen. Mit Hilfe der Intensitätsmessung durch das Programm Photoshop XS wurde eine Konzentration von etwa 0,75 µg/µl für den anti-Agrin-Antikörper bestimmt.

## 3.5 ELISA

### 3.5.1 Nachweis von Antikörpern gegen humanes mini-Agrin

Um zu untersuchen, ob die Seren von Myasthenia gravis Patienten Antikörper gegen Agrin enthalten, wurde mit Hilfe eines ELISAs ihre Reaktivität mit immobilisiertem mini-Agrin untersucht. Abbildung 10 zeigt die Werte für die optische Dichte (OD), die wie in *Material und Methoden* beschrieben nach Abzug der unspezifischen Bindung an unbeschichtete ELISA-Platten bestimmt wurden. Sowohl für die Kontrollseren als auch für die

Patientenseren liegen die meisten Differenzwerte bei etwa null; einige davon auch deutlich im negativen Bereich. Für fünf der 54 getesteten Patientenseren allerdings lag die Differenz der OD-Werte bei signifikant höheren Werten. Anhand der OD-Differenzen für die 16 Kontrollseren wurde der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) berechnet und als „Cut-off-Wert“ der Mittelwert plus vier mal die Standardabweichung definiert. Eines der Kontrollseren wurde für die Bestimmung des Cut-off-Wertes aus der Gruppe herausgenommen (grün markiert), weil es im ELISA eine deutlich stärkere Bindung an die unbeschichtete Platte als an die mit humanem mini-Agrin beschichtete Platte zeigte. Dies wurde als starke unspezifische Bindung an das Plattenmaterial interpretiert.



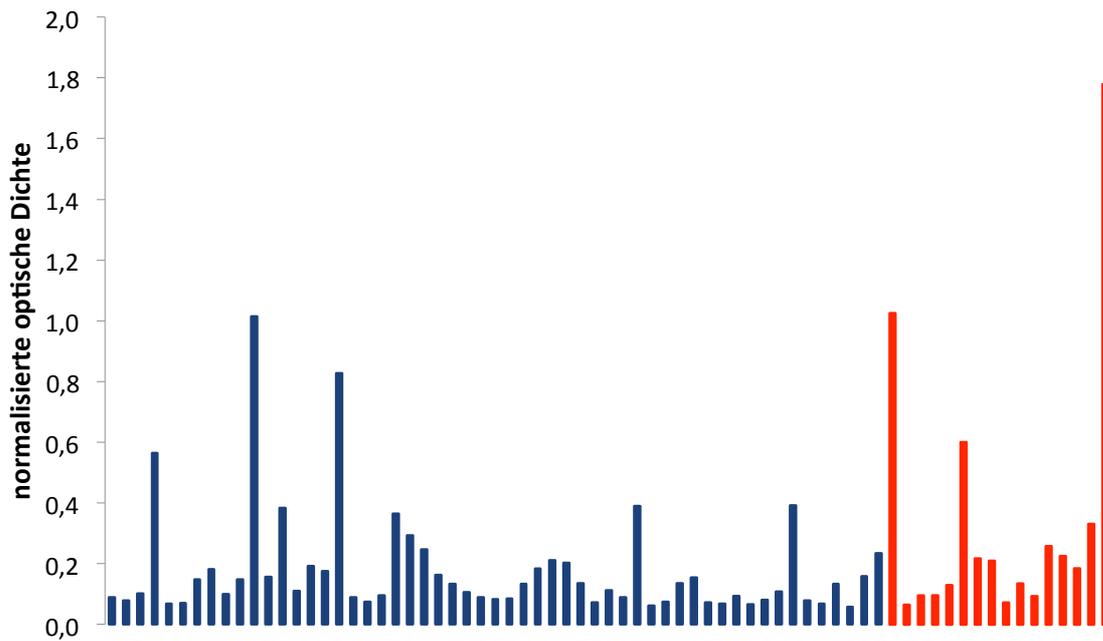
**Abbildung 10: Antikörper gegen mini-Agrin in Myasthenia gravis Patientenseren.**

*Diese Abbildung zeigt die Mittelwerte der optischen Dichte nach einer Subtraktion der Werte für einen mit unbeschichteten Platten durchgeführten ELISA für Patientenseren (blaue Punkte) und 16 gesunde Probanden (rote Punkte, Kontrollgruppe). Die grüne Linie stellt den Cut-off-Wert dar, welcher als der Mittelwert der OD-Differenzwerte der Kontrollseren plus vier mal die Standardabweichung definiert wurde. Fünf der 54 untersuchten Patientenseren zeigten signifikant höhere Werte im ELISA. Eines der Kontrollseren zeigte eine starke unspezifische Bindung an unbeschichtete ELISA-Platten (grüner Kreis).*

Bei der Bestimmung der optischen Dichte an nicht beschichteten ELISA-Platten konnte sowohl für die Kontrollseren als auch für die Patientenseren eine Schwankung der Werte beobachtet werden. Abbildung 11 zeigt die OD-Werte aller untersuchten Seren an einer ELISA-Platte ohne vorherige Beschichtung mit Agrin. Die blauen Säulen stellen die gemessenen OD-Werte der 54 Patientenseren sowie des Serums von einem Patienten mit adultem Morbus Pompe dar. Die roten Säulen repräsentieren die OD-Werte der Kontrollseren. Die letzte Säule stellt das oben beschriebene Serum dar, welches aus der Datenanalyse ausgeschlossen wurde.

Der Mittelwert aller untersuchten Seren liegt bei 0,216 bei einer Standardabweichung von 0,270. Hohe OD-Werte weisen auf eine unspezifische Bindung der Seren an die ELISA-Platte oder Bestandteile des Blockpuffers hin. Alle Kontrollseren und ein Teil der Patienten wurden dreimal und die restlichen Seren einmal im ELISA untersucht. Des Weiteren wurden in jedem Experiment für ein einzelnes Serum zwei OD-Werte bestimmt, deren Mittelwert verwendet wurde.

An den Werten in Abbildung 11 kann man erkennen, dass trotz Verwendung eines Blockpuffers unspezifische Bindungen der Seren an die Platte stattfinden. Durch eine weitere methodische Verbesserung des Experimentes könnte möglicherweise eine höhere Sensitivität erreicht werden.



**Abbildung 11: Optische Dichte der humanen Seren an der unbeschichteten ELISA-Platte**

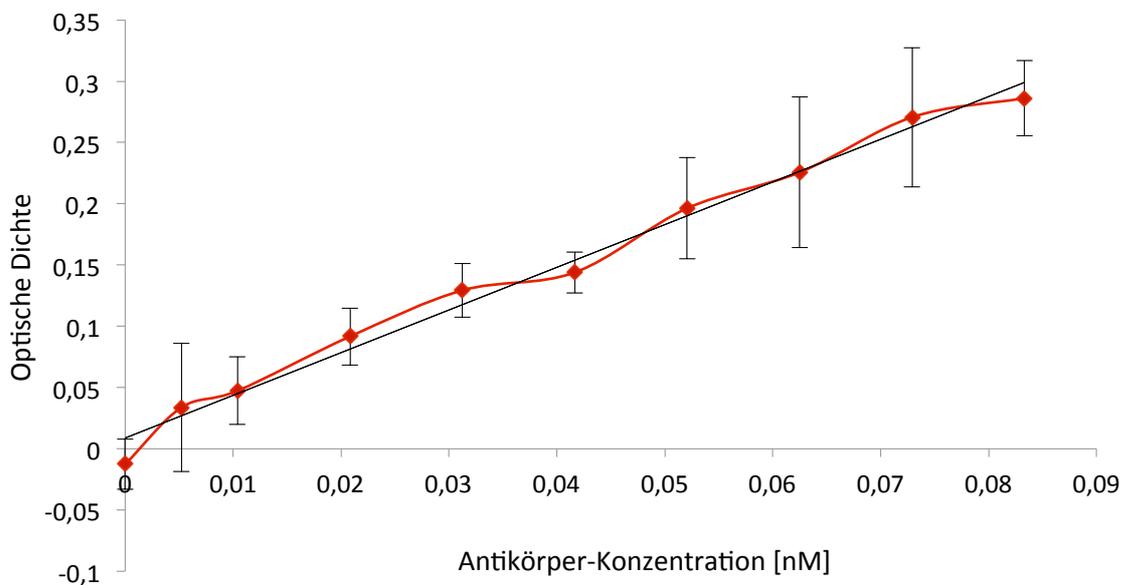
Die gemessenen Werte der optischen Dichte im ELISA mit unbeschichteten Platten zeigten sowohl für die Patientenseren (blaue Balken) als auch für die Kontrollgruppe (rote Balken) eine deutliche Schwankung. Der Mittelwert aller Seren liegt dabei bei 0,216; die Standardabweichung beträgt 0,270. Hohe OD-Werte wurden wahrscheinlich durch unspezifische Bindung der Seren an die Platte oder Bestandteile des Blockpuffer verursacht. Ein Kontrollserum zeigte eine verhältnismäßig höhere unspezifische Bindung (Balken ganz rechts) und wurde deshalb aus der statistischen Auswertung der ELISA Ergebnisse ausgeschlossen.

### 3.5.2 Bestimmung der Konzentration von Antikörpern gegen mini-Agrin

Um eine genaue Bestimmung der Konzentration der anti-Agrin-Antikörper in den Patientenseren durchzuführen, wurde eine Standardreihe im ELISA erstellt. Als Standardmessreihe diente dazu ein Standardnegativserum mit unterschiedlichen Konzentrationen an polyklonalem Kaninchen-anti-Agrin-Antikörper. Das Standardnegativserum bestand aus einem Gemisch der Seren der Kontrollgruppe. Die optische Dichte dieser anti-Agrin-Antikörper-positiven Seren – nach Abzug der unspezifischen Bindung wie im *Material und Methoden* beschrieben – wurde bestimmt. Dadurch konnte die in Abbildung 12 dargestellte Standardkurve erzeugt werden. Sie stellt die Differenz der gemessenen OD-Werte in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration in der Probe dar. Anhand dieser Kurve konnten so für die Patientenseren ungefähre

Konzentrationen an anti-Agrin-Antikörpern bestimmt werden (Tabelle 6). Aufgrund der Schwankungen in der Menge an Antigen, mit der die ELISA-Platten beschichtet wurden, handelt es sich hier nur um ungefähre Angaben.

Die Konzentrationen der anti-Agrin-Antikörper in den Patientenseren lagen zwischen 0,045 und 0,12 nM und somit deutlich unter den Konzentrationen, die für anti-Azetylcholinrezeptor-Antikörper in Myasthenia gravis Patienten bestimmt werden können[29, 70]. Die Konzentrationen für anti-MuSK- und Anti-LRP4-Antikörper in Myasthenia gravis Patienten liegen allerdings im Bereich von den in dieser Studie bestimmten Antikörperkonzentrationen[22, 71].



**Abbildung 12: Standardkurve zur Konzentrationsbestimmung der anti-Agrin-Antikörper**

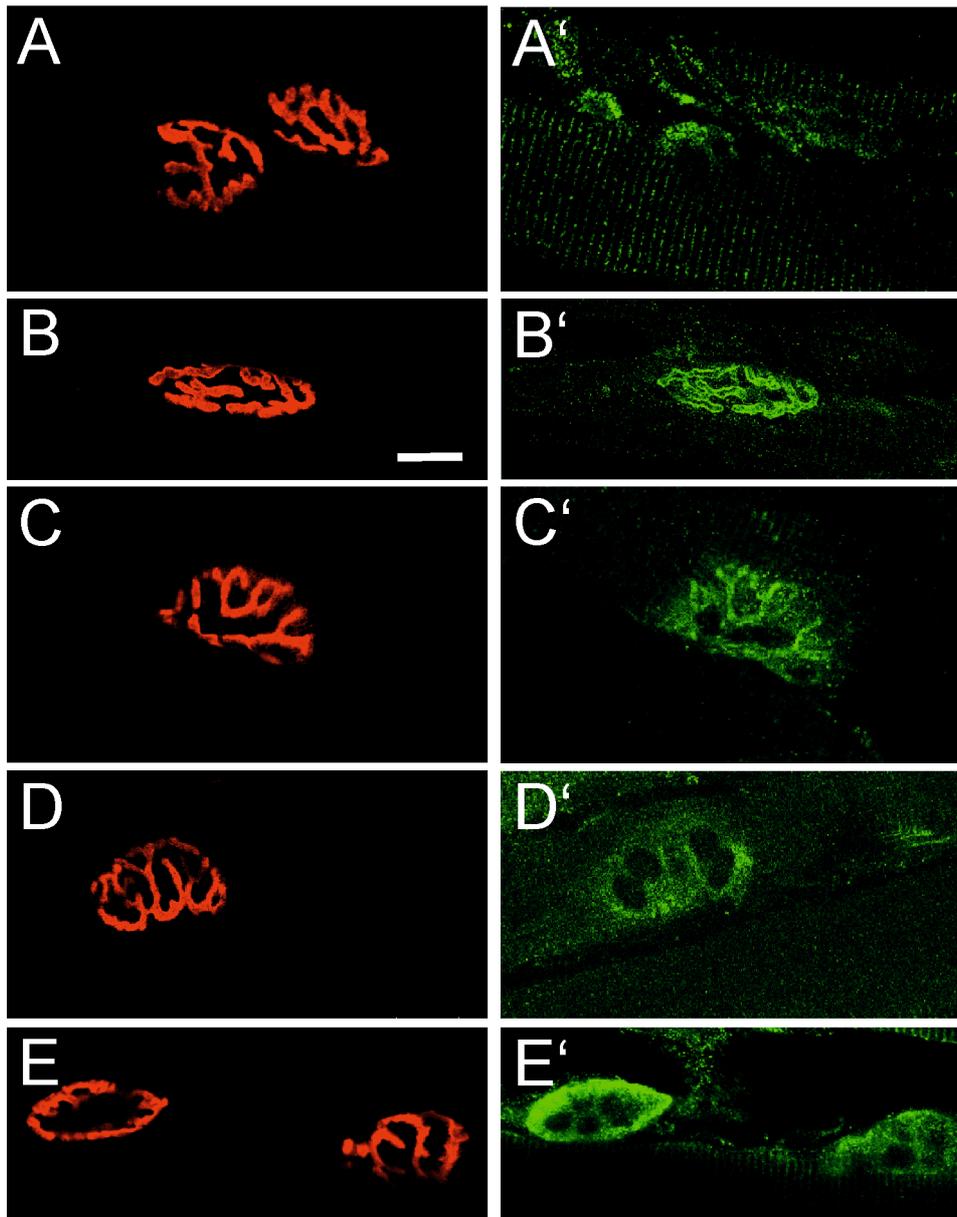
*Die Bestimmung der Konzentration der anti-Agrin-Antikörper gelang mithilfe eines Referenzserums, welchem Antikörper gegen Agrin in ansteigenden Konzentrationen zugefügt wurden. Durch eine Messung dieser Standardseren im ELISA konnte eine Standardkurve erstellt werden, welche die optische Dichte in Abhängigkeit der anti-Agrin-Antikörper-Konzentration darstellt. In rot sind die einzelnen Messpunkte dargestellt, in schwarz die Regressionsgerade.*

**Tabelle 6: Antikörperkonzentrationen in den fünf Patientenseren mit erhöhtem anti-Agrin-Titer**

MG Serum Nr.	OD-Differenz	Konzentration [nM]
8784	0,36	0,10
5660	0,42	0,12
5205	0,29	0,08
8733	0,17	0,05
6796	0,16	0,04

### **3.6 Immunhistochemische Färbung von neuromuskulären Endplatten**

Um zu untersuchen, ob die MG Patientenseren spezifisch mit Proteinen an der neuromuskulären Endplatte reagieren, wurden immunhistochemische Färbungen des Musculus quadriceps femoris aus Wildtyp-Mäusen mit Patientenseren sowie mit entsprechenden Kontrollseren durchgeführt. Die Darstellung der neuromuskulären Endplatte erfolgte mit fluoreszenzmarkiertem  $\alpha$ -Bungarotoxin, welches spezifisch an den nikotinischen Azetylcholinrezeptor bindet. Abbildung 13A zeigt die Färbung adulter Mausmuskeln mit  $\alpha$ -Bungarotoxin und einem anti-Agrin-Antikörper; die Kollokalisierung der beiden Färbungen ist deutlich zu erkennen. Die Seren wurden in unterschiedlichen Konzentrationen für die Färbung verwendet (1:500-1:800). Drei der im ELISA positiv getesteten Patientenseren (siehe Tabelle 7) zeigten eine deutliche Färbung der neuromuskulären Endplatte und eine Kollokalisierung mit  $\alpha$ -Bungarotoxin. Außerdem konnte bei zwei weiteren Patientenseren (7224 und 7310) eine spezifische Färbung der neuromuskulären Endplatte gezeigt werden, obwohl sie im ELISA keinen erhöhten Titer von anti-Agrin-Antikörpern gezeigt hatten. Keines der Kontrollseren zeigte eine spezifische Färbung der neuromuskulären Endplatte. Abbildung 13 zeigt die Färbungen der Muskelschnitte mit einigen untersuchten Patientenseren. Diese Ergebnisse zeigen, dass in den Patientenseren Antikörper gegen Proteine der neuromuskulären Endplatte vorhanden sind. Eine Aussage darüber, welches Protein dabei jeweils als Antigen dient, lässt sich durch diese Methode nicht treffen.

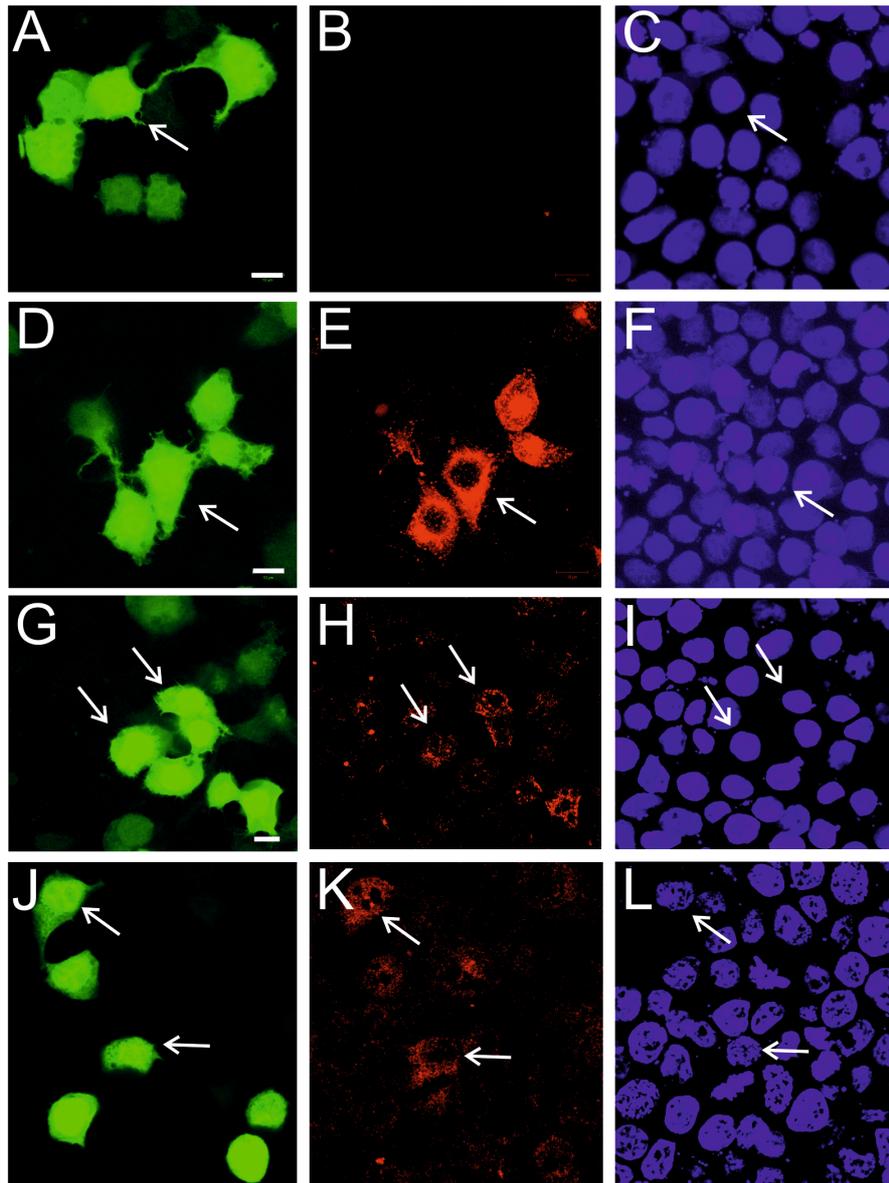


**Abbildung 13: Färbung neuromuskulärer Endplatten mit MG Seren**

Längsschnitte des *Musculus quadriceps femoris* von Mäusen wurden mit nicht reaktiven humanen Seren (grüner Kanal, A, A', Serum 8715), anti-Agrin-Antikörpern (B, B') und Seren von Patienten mit *Myasthenia gravis* (Serum 5660, Serum 8733, C, C', D, D') gefärbt. (E, E') zeigt die Färbung mit einem Serum, in welchem im ELISA keine erhöhten Konzentrationen an anti-Agrin-Antikörpern nachgewiesen werden konnten, welches aber mit Agrin transfizierte Zellen angefärbt hat (Serum 7224). Zur Identifizierung der neuromuskulären Endplatten diente  $\alpha$ -Bungarotoxin in einer Konzentration von 1:1000 (roter Kanal). Die Seren wurden in Konzentrationen von 1:500 oder 1:800 für die Färbungen verwendet. Nicht reaktive Seren zeigten keine spezifische Färbung der neuromuskulären Endplatte (A, A'). Maßstab in B: 20 $\mu$ m

### **3.7 Immunhistochemische Färbung von transfizierten HEK293 Zellen**

Um zu untersuchen, ob die Patientenseren spezifisch mit humanem mini-Agrin reagieren, erfolgte eine immunhistochemische Färbung von mit humanem mini-Agrin transfizierten HEK 293 Zellen. Neben der Sequenz für humanes mini-Agrin kodiert der für die Transfektion verwendete pMES-Vektor für das grün fluoreszierende Protein (EGFP), welches transfizierte Zellen markiert. Um nachzuweisen, dass der Vektor tatsächlich für mini-Agrin kodiert und die Transfektion erfolgreich war, wurden die transfizierten Zellen mit einem Antikörper gegen humanes Agrin gefärbt (Abbildung 14E). In dieser Färbung sind die transfizierten Zellen eindeutig durch eine Färbung mit dem Antikörper identifizierbar. Zwei der fünf im ELISA positiv getesteten Patientenseren zeigten eine spezifische Färbung der transfizierten Zellen. Außerdem konnte eine spezifische Färbung von einem weiteren Serum (Serum 7224) nachgewiesen werden. Dieses Serum lag im ELISA knapp unter dem definierten Cut-off-Wert. Die Färbungen der transfizierten Zellen mit Kontrollseren zeigten keine spezifische Bindung. Diese Färbungen zeigen, dass einige der untersuchten Patientenseren spezifisch mit humanem mini-Agrin reagieren. Dies bestätigt zumindest für einige Seren das Ergebnis des ELISAs.



**Abbildung 14: F12rbung transient transfizierter HEK293 Zellen mit MG Seren**

HEK293 Zellen wurden mit dem die cDNA f12r mini-Agrin enthaltenden pMES Vektor transient transfiziert und mithilfe konfokaler Mikroskopie analysiert. Der Vektor enth12lt eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES), gefolgt von der cDNA f12r die „enhanced“-Variante des gr12nen fluoreszierenden Proteins (EGFP). Dies erm12glicht die Identifikation der transfizierten Zellen. Die Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (C,F,I,L). Ein Serum eines gesunden Probanden zeigte keine spezifische F12rbung der transfizierten Zellen (B). Im Gegensatz dazu f12rbten Kaninchen-anti-Agrin-Antik12rper (E) oder Seren von Patienten mit Myasthenia gravis mit erh12hten Konzentration an anti-Agrin-Antik12rpern (K, Serum 6796) spezifisch die mit mini-Agrin transfizierten Zellen. H zeigt eine F12rbung von transfizierten Zellen mit einem Serum, welches im ELISA keine erh12hten anti-Agrin-Antik12rper zeigte, aber neuromuskul12re Endplatten anf12rbte. (Serum 7224). In H und K ist au12erdem eine Hintergrundf12rbung zu sehen. Die Pfeile markieren korrespondierende Stellen in den 3 Farbkan12len. Untransfizierte Zellen (erkennbar in der DAPI F12rbung aber ohne EGFP-Fluoreszenz) wurden nur sehr leicht durch die Seren angef12rbt. Ma12stab: 10 μm. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindol.

### 3.8 Übersicht der experimentellen Ergebnisse

Mit Hilfe des ELISAs konnten in fünf von 54 untersuchten Seren von Patienten mit Myasthenia gravis Antikörper gegen Agrin nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des ELISAs wurden durch immunhistochemische Färbungen von Zellen, die humanes mini-Agrin exprimieren, sowie durch immunhistochemische Färbungen der neuromuskulären Endplatten in Muskeln von Mäusen zusätzlich bestätigt. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Interessanterweise ergab die Analyse der Seren nach der „Entblindung“, dass drei der fünf Seren zuvor positiv auf anti-MuSK-Antikörper getestet worden waren. Außerdem sind in der Tabelle zwei weitere Seren – Serum 7224 und Serum 7310 – enthalten. Diese lagen im ELISA knapp unter dem festgelegten Cut-off-Wert, zeigten aber eine spezifische Färbung von Proteinen an den neuromuskulären Endplatten im Muskelgewebe (7224 und 7310) oder von mit mini-Agrin transfizierten Zellen (7224).

**Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse**

MG Serum Nr.	MuSK+	ELISA	Färbung transfizierter Zellen	Färbung Muskelschnitte
8784	+	+	-	+
5660	+	+	-	+
5205	-	+	+	-
8733	+	+	nicht getestet	+
6796	-	+	+	-
7224	-	-	+	+
7310	-	-	-	+

### **3.9 Klinische Parameter der Myasthenia gravis Patienten mit anti-Agrin-Antikörpern**

Tabelle 8 gibt einen Überblick über die klinischen Daten der fünf anti-Agrin-Antikörper enthaltenden Patientenserum sowie der zwei Seren, welche im ELISA etwas unter der Signifikanzgrenze lagen, aber in den immunhistochemischen Färbungen spezifische Reaktionen zeigten.

Nur eines dieser fünf Seren war zuvor positiv auf anti-Azetylcholinrezeptor-Antikörper getestet worden; ebenso enthielt eines der Seren anti-LRP4-Antikörper. Bei vier der fünf Patienten mit anti-Agrin-Antikörpernachweis konnten zusätzlich Antikörper gegen MuSK nachgewiesen werden.

Vier der fünf Patienten mit anti-Agrin-Antikörpernachweis waren Frauen; das Erkrankungsalter lag im Mittel bei 49,2 Jahren, variierte aber stark zwischen 30 und 83 Jahren. Die Diagnose Myasthenia gravis in den untersuchten Patienten beruhte sowohl auf der klinischen Erscheinung als auch auf elektrophysiologischen Untersuchungen. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen sind ebenfalls in der Tabelle dargestellt, wobei nicht zu allen Patienten Informationen diesbezüglich vorlagen. Die fünf Patienten befanden sich bei Abnahme des Testserums in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung: Ein männlicher Patient war im Stadium II, eine Patientin im Stadium IIa, zwei Patientinnen im Stadium IIIB und eine weitere Patientin im Stadium V. Eine Patientin mit anti-Agrin-Antikörpern im ELISA hatte eine myasthene Krise erlitten. Bis auf eine Patientin zeigten alle fünf Patienten eine Schwäche der bulbären Muskulatur, der Gesichtsmuskulatur oder der Nackenmuskulatur. Alle Patienten hatten zu irgendeinem Zeitpunkt Doppelbilder angegeben, in keinem Patienten konnte ein Thymom nachgewiesen werden. Die meisten der untersuchten Patienten standen zum Zeitpunkt der Abnahme des Serums nicht unter medikamentöser Therapie. Eine Ausnahme diesbezüglich bildet Patient 8733, welcher mit allen in der Tabelle angegebenen Therapiemöglichkeiten behandelt wurde. Die Patienten zeigten eine komplette oder gute Remission unter verschiedenen medikamentösen Therapien; genaue Angaben über die verwendeten Wirkstoffe liegen nicht vor.

**Tabelle 8: Klinische Daten zu den Myasthenia gravis Patienten**

Demographische Daten			Klinische Daten							Therapie						Elektro-physiologie		Autoantikörper					
ID	Erkrankungsalter	Geschlecht	MGFA Stadium	PIS	GNB	Doppelbilder	Gewichtsverlust	Myasthene Krise	Thymektomie	Cholinesterasehemmer	Prednisolon	Azathioprin	IVIG	Plasmaaustausch	CD20	RNS	EMG-SA	Anti-Azetylcholinrezeptor	Anti-MuSK	Anti-LRP4	anti-Agrin		
																					ELISA	HEK	NMJ
8784	51	F	IIIB	R	+	+	+	Nein	Nein	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.
5205	50	F	IIIB	R	+	+	+	Nein	Nein	-	-	-	-	-	-	+	+	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	neg.
8733	30	F	V	R	+	+		Ja	Nein	+	+	+	+	+	+	+	n.a.	neg.	pos.	neg.	pos.	n.t.	pos.
5660	83	M	II	R	+	+	+	Nein	Nein	-	-	-	-	-	-	+	+	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.
6796	32	F	I	KR	Nein	+	.	Nein	Nein	,	+	-	-	-	-	-	n.a.	pos..	neg.	n.t.	pos.	pos.	neg.
7310	47	M	IIA	R	Nein	+	-	Nein	Nein	-	+	+	-	-	-	-	n.a.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.
7224	40	M	IIIB	KR/MM	+	+	+	Nein	Ja	+	+	+	-	-	-	+	n.a.	pos.	neg.		neg.	pos.	pos.

Zusammenfassung der klinischen Details zu den untersuchten Patienten. Die Therapie entspricht dem Therapiestand zum Abnahmezeitpunkt des Serums. Positive Azetylcholinrezeptor und MuSK Nachweise wurden wiederholt bestimmt. (Quelle: Prof. Dr. Arthur Melms)

Abkürzungen:

ID Identifikationsnummer, MGFA MGFA Klassifikation (siehe Tabelle 1), GNB Schwäche der Gesichts-, Nacken- oder bulbären Muskulatur

PIS Postinterventioneller Status: KR Komplette Remission, R pharmakologische Remission, MM Minimale Manifestation, V Verbesserung, U unverändert, S Verschlechterung

Thymektomie: Bei Patient 7224 konnte eine Thymofolikuläre Hyperplasie nachgewiesen werden – kein Thymom

Therapie: + entspricht einem Therapieversuch mit dem genannten Wirkstoff.

IVIG Intravenöse Immunglobulingabe, CD20 Rituximab (therapeutischer Antikörper), RNS Repetitive Nervenstimulation, + entspricht einem Dekrement in der repetitiven Stimulation, EMG SA Spontanaktivitäten in der elektromyographischen Untersuchung

## 4 Diskussion

### 4.1 Anti-Agrin-Autoantikörper in Patienten mit Myasthenia gravis

Agrin spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatte. Mutationen im AGRN-Gen führen zur Entstehung von kongenitalen myasthenen Syndromen in Menschen[60, 72] und Mäusen[73] – ein Hinweis darauf, dass eine Beeinträchtigung der Funktion von Agrin zu einer Störung der Signalübertragung an der neuromuskulären Endplatte führen kann ohne sofort letal zu wirken. In den letzten Jahren konnten sowohl LRP4 als auch MuSK – zwei Proteine, die essentiell für Agrin-induzierte Signalkaskaden zur Bildung der neuromuskulären Endplatte sind – als Antigene für Autoantikörper in einigen Patienten mit Myasthenia gravis identifiziert werden[21, 22, 28, 29]. Der Nachweis von anti-Agrin-Autoantikörpern in Seren von MG Patienten ist also eine Fortsetzung und Ergänzung von bisherigen Untersuchungen und verdeutlicht einmal mehr, dass nicht nur eine direkte Störung der Funktion eines Proteins, sondern auch eine Einschränkung der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Strukturen wie beispielsweise der neuromuskulären Endplatte zu einer autoimmunen Erkrankung mit sehr ähnlichen Symptomen führen kann.

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, in der in fünf von 54 Seren von Patienten mit Myasthenia gravis erhöhte Konzentrationen von anti-Agrin-Antikörpern nachgewiesen werden konnten. Diese Ergebnisse bestätigen einen vorausgegangenen Tagungsabstrakt von Cossins et al.[74], welcher ebenfalls auf das Vorhandensein von anti-Agrin-Antikörpern in Myasthenia gravis Patienten hindeutete, aber keine Details bezüglich der Erkrankung und keine klinischen Daten lieferte. In der Studie von Cossins et al. wurde eine größere Anzahl von Patienten mit Myasthenia gravis mithilfe von transfizierten Zellen auf Antikörper gegen Agrin untersucht. Diese konnten dort in 15 Prozent aller untersuchten Patientenseren nachgewiesen werden, während in dieser Studie etwa 10 Prozent der Seren anti-Agrin-seropositiv waren. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied sind neben der größeren Anzahl an untersuchten Seren auch Unterschiede in der Sensitivität der angewandten Methoden. Auch die Verwendung von mini-Agrin als Antigen hier und von Volllängen-Agrin in der Studie von Cossins et al. könnte zu den Abweichungen in den Ergebnissen beitragen.

Es bleibt also einer großen epidemischen Studie überlassen, den genauen Prozentsatz aller Myasthenia gravis Patienten mit anti-Agrin-Autoantikörpern zu bestimmen.

Kurz nach der Fertigstellung der Experimente der vorliegenden Studie wurde eine weitere Arbeit zu anti-Agrin-Antikörpern in Patienten mit Myasthenia gravis veröffentlicht[75]. Der Großteil der dabei untersuchten 93 Seren war anti-AChR-seropositiv. Dabei wurden mithilfe von einem ELISA in sieben Patientenseren erhöhte Konzentrationen an Autoantikörpern gegen Agrin nachgewiesen, darunter in zwei dreifach-seronegativen Seren – also Seren ohne Antikörper gegen den AChR, MuSK und LRP4. Auch Hanisch et al. konnten anti-Agrin-Antikörper in zwei Patientenseren ohne Antikörper gegen den AChR oder MuSK nachweisen[76].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen und ergänzen die Erkenntnis, dass Myasthenia gravis nicht nur durch Antikörper direkt gegen den Azetylcholinrezeptor sondern auch durch Antikörper gegen Bestandteile des Agrin-LRP4-MuSK-Signalweges ausgelöst werden kann. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass neben der direkten Reduktion der Acetylcholinrezeptoren durch anti-AChR-Autoantikörper auch durch Antikörper gegen die Signalmoleküle, die an der Aggregation der Rezeptoren während der Entwicklung und an der Aufrechterhaltung der hohen Rezeptor-Konzentration im adulten Organismus beteiligt sind, eine Reduktion der Rezeptoren erreicht werden kann.

## **4.2 Pathogenität der anti-Agrin-Antikörper**

In den letzten Jahren wurden in den Seren von Patienten mit Myasthenia gravis zahlreiche neue Autoantikörper nachgewiesen, die nach bisherigem Wissenstand keinen Beitrag zum klinischen Phänotyp der Erkrankten leisten. Beispiele dafür sind Autoantikörper gegen Titin[24, 26], gegen den Ryanodinrezeptor[24, 25] und den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.4[77, 78]. Es stellt sich also die Frage, ob die im Serum nachgewiesenen anti-Agrin-Antikörper an der myasthenen Pathologie beteiligt sind, oder ob sie Beiprodukte degenerierender Muskelfasern darstellen.

Um eine mögliche Pathogenität von Autoantikörpern zu evaluieren, werden üblicherweise die folgenden fünf Kriterien evaluiert[79, 80]: (1) Vorhandensein der Antikörper im Serum

von Patienten mit der Erkrankung; (2) Nachweis der Bindung des Antikörpers an das Antigen; (3) Reproduktion der Merkmale der Erkrankung durch passiven Transfer; (4) Erstellung einer Modellerkrankung durch Immunisierung mit dem Antigen und (5) Besserung (der Symptomatik) der Erkrankung durch Reduktion der Antikörperkonzentration.

Die vorliegende Studie erfüllt die ersten beiden Kriterien. In etwa zehn Prozent der 54 untersuchten Seren von Patienten mit Myasthenia gravis waren erhöhte Konzentrationen von anti-Agrin-Antikörpern nachweisbar. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen zwei anderer Studien, in denen in 15 Prozent[74] bzw. 7 bis 8 Prozent[75] der Seren Autoantikörper gegen Agrin nachgewiesen werden konnten. Das zweite Kriterium – die Bindung der Antikörper an das Antigen – konnte in der vorliegenden Studie durch die spezifische Färbung von mit mini-Agrin transfizierten HEK293 Zellen und durch die Bindung an mini-Agrin im ELISA gezeigt werden. Eine Untersuchung des dritten und des vierten Kriteriums wurde bisher noch nicht durchgeführt und könnte Bestandteil zukünftiger Studien sein. Das fünfte Kriterium – eine Verbesserung der Symptomatik durch die Reduktion der Antikörper – kann beispielsweise durch die Evaluation der Wirksamkeit von Immuntherapie oder Plasmapherese geprüft werden. Durch das Ansprechen von Patienten mit seronegativer Myasthenia gravis auf Plasmaaustausch und immunsuppressiver Therapie mit Prednisolon oder Azathioprin[34, 35] wurde schon früh angenommen, dass auch in diesen Fällen Antikörper für die Symptomatik verantwortlich sind. Für die fünf anti-Agrin-seropositiven Patienten in der vorliegenden Studie sind lediglich die Therapien bekannt, die bei Abnahme des Serums eingenommen wurden. Allerdings kann man in Tabelle 8 erkennen, dass diese Patienten eine komplette oder gute Remission nach verschiedenen medikamentösen Therapien gezeigt haben. Informationen über die verabreichten Wirkstoffe lagen nicht vor. Um nun aber aus diesen Informationen Rückschlüsse auf die Pathogenität der anti-Agrin-Antikörper machen zu können, müssten Patienten mit Myasthenia gravis, in deren Seren ausschließlich Autoantikörper gegen Agrin nachgewiesen werden, auf ein Ansprechen auf die oben genannten Therapien untersucht werden. Da in dieser Studie keiner der Patienten nur Antikörper gegen Agrin hatte, sind die klinischen Informationen in diesem Sinne nicht verwertbar. In den von Zhang et al. und Cossins et al. veröffentlichten Berichten[74, 75] werden keine Angaben zur Behandlung der Patienten gemacht.

Bisher ist noch unklar, ob und in welchem Ausmaß anti-Agrin-Antikörper an der Entstehung der für die Myasthenia gravis typischen Muskelschwäche beteiligt sind. Huijbers et al. und Konecny et al. zeigten, dass anti-MuSK-IgG4-Antikörper, welche in den meisten Fällen von anti-MuSK-seropositiver Myasthenia gravis nachgewiesen werden können, die Bindung zwischen LRP4 und MuSK und damit auch die durch neuronales Agrin stimulierte Phosphorylierung von MuSK und die Bildung von AChR-Aggregaten inhibieren[81, 82]. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass auch anti-Agrin-Antikörper durch eine verminderte Phosphorylierung von MuSK zu der für Myasthenia gravis typischen Muskelschwäche führen könnten. Dass Seren von anti-Agrin-seropositiven Myasthenia gravis Patienten die Phosphorylierung von MuSK und die Aggregation von Azetylcholinrezeptoren in Myotuben vermindern, konnte bereits gezeigt werden[75]. Trotzdem sind zur genauen Untersuchung einer möglichen Pathogenität von anti-Agrin-Antikörpern in Patienten mit Myasthenia gravis weitere Studien notwendig.

### **4.3 Antikörperkonzentrationen bei Myasthenia gravis**

Die in der vorliegenden Studie bestimmten anti-Agrin-Antikörperkonzentrationen in den Patientenseren schwanken zwischen 0,045 und 0,12 nM (Tabelle 6). Diese Konzentrationswerte liegen unter den Werten, die für Autoantikörper gegen den Azetylcholinrezeptor in Myasthenia gravis Patienten bestimmt werden können, welche zwischen 0,5 nM und mehr als 1000 nM liegen[29, 70]. Die Konzentrationen für Autoantikörper gegen MuSK und LRP4 aber, die in einer unterschiedlichen Anzahl von seronegativen MG Patienten bestimmt werden konnten, liegen im Bereich von den in dieser Studie bestimmten Antikörperkonzentrationen: für anti-MuSK-Antikörper liegen sie bei >0,05 nM[71] und für anti-LRP4 Antikörpern zwischen 0,019 und 2,07 nM[22]. In den zuvor genannten zwei weiteren Publikationen über Autoantikörper gegen Agrin in Patienten mit Myasthenia gravis[74, 75] werden keine Angaben zur Konzentration der Antikörper gemacht, sodass diesbezüglich noch kein Vergleich unserer Ergebnisse mit denen anderer Studien erfolgen kann. Da die Konzentrationen an anti-Agrin-Antikörpern in der vorliegenden Untersuchung im Bereich der Konzentrationen von anti-LRP4 und anti-MuSK-Antikörpern in Myasthenia gravis Patientenseren liegen, kann davon ausgegangen werden, dass die Konzentrationen ausreichend die Entwicklung einer myasthenen Symptomatik sind.

#### **4.4 Doppel-seropositive Myasthenia gravis**

In allen fünf Seren mit erhöhten Konzentrationen an anti-Agrin-Antikörpern konnten zusätzlich Antikörper gegen andere Proteine der neuromuskulären Endplatte nachgewiesen werden. Vier der Seren enthalten Autoantikörper gegen MuSK, eines enthält Autoantikörper gegen den Azetylcholinrezeptor und zwei Seren enthalten Autoantikörper gegen LRP4. Dies deutet darauf hin, dass ein großer Anteil der untersuchten Seren Antikörper gegen mehr als nur ein Protein der neuromuskulären Endplatte enthält. Diese große Anzahl von Autoantikörpern gegen mehrere Antigene ist ungewöhnlich und soll deshalb im Folgenden diskutiert werden.

Mehrere vorhergehende Studien haben bereits das Auftreten von Autoantikörpern gegen multiple Proteine an der neuromuskulären Endplatte beschrieben; darunter die Koexistenz von Antikörpern gegen den AChR und MuSK[27, 83], AChR und LRP4[74], sowie LRP4 und MuSK[22, 29, 74]. Zuletzt berichteten Zisimopoulou et al.[33] über Patienten mit doppel-seropositiver Myasthenia gravis, darunter acht Patienten mit Antikörpern gegen den Acetylcholinrezeptor und LRP4 und acht Patienten mit Antikörpern gegen MuSK und LRP4. Dabei zeigten diese sechzehn Patienten im Vergleich zu Patienten, welche ausschließlich Antikörper gegen LRP4 hatten, eine deutlich schwerere Symptomatik – nur einer der 16 Patienten entspricht einer MGFA-Klasse I oder II. Es kann also vermutet werden, dass die klinischen Symptome von Patienten mit doppel-seropositiver Myasthenia gravis schwerer sein könnten als bei einer Erkrankung mit nur einem Autoantigen.

Es stellt sich die Frage, was die Ursache für das Auftreten von Antikörpern gegen multiple Autoantigene sein könnte. In einzelnen Fällen von anti-AChR-seropositiver Myasthenia gravis konnten in unterschiedlich großen Zeitabständen zu einer erfolgten Thymektomie erhöhte Konzentrationen von anti-MuSK-Antikörpern sowie zum Teil auch eine Veränderung des klinischen Bildes mit der für anti-MuSK-seropositive Myasthenia gravis typischen Beteiligung der bulbären, fazialen und respiratorischen Muskulatur sowie der Nackenmuskulatur nachgewiesen werden. In einigen der beschriebenen Fälle waren die Autoantikörper gegen den AChR zum Zeitpunkt, zu dem anti-MuSK-Antikörper nachgewiesen werden konnten, nicht mehr nachweisbar[84-86]. In einem Fall blieb auch der Titer der anti-AChR-Antikörper erhöht[87]. Obwohl in den meisten Fällen die anti-MuSK-Antikörpertiter zum Diagnosezeitpunkt nicht bestimmt worden waren, konnte im letzteren Fall eindeutig gezeigt

werden, dass das Serum zu einem früheren Zeitpunkt keine Antikörper gegen MuSK enthielt. Dies bedeutet, dass erst im Laufe der Erkrankung nach der Durchführung einer Thymektomie Antikörper gegen MuSK gebildet worden sind.

Eine Ursache für das Neuauftreten von anti-MuSK-Antikörpern in Patienten mit anti-AChR-positiver Myasthenia gravis können die durch die Thymektomie verursachten immunologischen Veränderungen wie eine Vergrößerung des T-Zell-Repertoires und eine höhere Prävalenz von Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen nach Thymektomie sein[87, 88]. Außerdem besteht theoretisch die Möglichkeit, dass sich durch das Entstehen von neuen Epitopen aufgrund der Zerstörung von neuromuskulären Endplatten neue Autoantikörper – wie beispielsweise auch anti-Agrin-Antikörper – bilden.

In der vorliegenden Studie enthält jedes der Seren mit anti-Agrin-Antikörpern auch Antikörper gegen ein anderes Protein der neuromuskulären Endplatte, wodurch ein Rückschluss auf eine mögliche Pathogenität der anti-Agrin-Antikörper nicht möglich ist. In der von Zhang et al. veröffentlichten Studie zu anti-Agrin-Antikörpern in Myasthenia gravis hingegen werden zwei Seren beschrieben, welche dreifach-seronegativ – anti-AChR-, anti MuSK und anti-LRP4-seronegativ – sind und erhöhte Antikörper gegen Agrin aufweisen[75]; Dies legt die Vermutung nahe, dass Agrin ein neues Antigen in dreifach-seronegativer Myasthenia gravis sein könnte.

Die vorliegende Studie berichtet erstmals von der Koexistenz von Autoantikörpern gegen Agrin und gegen MuSK in Patienten mit Myasthenia gravis. Dies unterscheidet sich von den Ergebnissen von Zhang et al., in deren Untersuchung in keinem der Seren mit erhöhten Konzentrationen von anti-Agrin-Antikörpern Autoantikörper gegen MuSK nachgewiesen wurden. Des Weiteren wird in der vorliegenden Studie zum ersten Mal ein Patient mit dreifach-seropositiver Myasthenia gravis vorgestellt – mit Autoantikörpern gegen Agrin, MuSK und LRP4. Dadurch konnte erneut gezeigt werden, dass in einigen Myasthenia gravis Patientenseren multiple Antikörper gegen Proteine der neuromuskulären Endplatte vorhanden sind.

#### **4.5 Auswirkungen der anti-Agrin-Autoantikörper auf die klinischen Symptome der Patienten**

Als Hoch et al. im Jahr 2000 in etwa 30 Prozent der anti-Azetylcholinrezeptor-seronegativen Myasthenia gravis Patienten Antikörper gegen MuSK nachweisen konnte, stellte sich die Frage, ob sich die Symptome von Patienten mit anti-MuSK-Antikörpern von Patienten ohne anti-MuSK-Antikörper unterscheiden. Während Hoch et al. von keinen Unterschieden in der klinischen Symptomatik der anti-MuSK-seropositiven und anti-MuSK-seronegativen MG Patienten berichtete, wurden bei einem Vergleich des klinischen und neurophysiologischen Bildes von 52 SNMG Patienten (davon 25 anti-MuSK-seropositiv, entsprechend 48,1 Prozent) 2006 signifikante Unterschiede gefunden[71, 89]. Patienten mit nachgewiesenen Antikörpern gegen MuSK zeigten eine signifikant häufigere Beteiligung sowohl der bulbären, als auch der respiratorischen Muskulatur mit einer insgesamt häufigeren schwerwiegenden Ausprägung der Erkrankung. Bei rein okulären Formen von Myasthenia gravis konnten keine anti-MuSK-Antikörper nachgewiesen werden. Neurophysiologische Test wie die repetitive Nervenstimulation und die Einzelfaser-Elektromyographie hingegen zeigten bei anti-MuSK-seronegativer Myasthenie gravis stärkere Abweichungen; im Edrophoniumchlorid-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen anti-MuSK-seropositiven und anti-MuSK-seronegativen SNMG Patienten nachgewiesen werden. Auffällig war außerdem ein größerer Anteil an weiblichen Patienten in der Gruppe mit nachgewiesenen anti-MuSK-Antikörpern. Auf der Suche nach möglichen Erklärungen für die Unterschiede in der klinischen Symptomatik zwischen der anti-MuSK-seronegativen und anti-MuSK-seropositiven Myasthenia gravis konnten Punga und Ruegg 2011 zeigen, dass MuSK in verschiedenen Muskeln unterschiedlich stark exprimiert wird[90]. In einem Mausmodell für anti-MuSK-seropositive Myasthenia gravis wurden unterschiedliche Muskeln auf die Fragmentierung der AChR und eine darauffolgende Denervierung untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass Muskeln mit einer hohen Expression von MuSK signifikant geringere Veränderungen zeigten als Muskeln mit einer niedrigeren MuSK Expression. Der in dieser Studie am stärksten betroffene Muskel war der Musculus masseter – einer der vier Kaumuskel. Zwei Muskeln der Extremitäten, der Soleusmuskel und der Extensor digitorum longus, wiesen hingegen eine hohe Expression von MuSK und nur geringe Veränderungen der neuromuskulären Endplatte auf[90, 91].

Neben dem klinischen Bild können auch im Ansprechen auf verschiedene Therapien Unterschiede zwischen Patienten mit anti-AChR- und anti-MuSK-seropositiver Myasthenia gravis beobachtet werden. So wirkt die Behandlung mit Rituximab, einem chimerischen monoklonalen Antikörper gegen das CD20-Protein, vor allem im Bezug auf Langzeitergebnisse besser bei anti-MuSK-seropositiver Myasthenia gravis[92]. Außerdem sprechen Patienten mit anti-MuSK-seropositiver Myasthenia gravis schlechter auf Azetylcholinesterase-Hemmer an als Patienten mit anti-AChR-seropositiver Myasthenia gravis. Dabei konnten sowohl eine Verschlechterung der Symptomatik als auch ein gehäuftes Auftreten von cholinergen Nebenwirkungen wie Diarrhö, Bauchkrämpfe, vermehrter Speichelfluss oder Muskelkrämpfe beobachtet werden[93-96].

Nachdem in dieser Studie der Nachweis von Autoantikörpern gegen Agrin in Patienten mit Myasthenia gravis gelang, stellt sich die Frage nach den Auswirkungen dieser Antikörper auf die klinische Symptomatik der Patienten. Wie in Tabelle 8 ersichtlich, lässt sich in den fünf anti-Agrin-seropositiven Patienten in dieser Studie keine wesentliche Gemeinsamkeit in den erhobenen klinischen Daten erkennen. Die MGFA-Stadien, in welchen sich die Patienten bei Abnahme des Serums befanden, variieren von Stadium II bis Stadium V, sodass keine Aussage zur Krankheitsschwere getroffen werden kann. Allerdings fällt auf, dass alle fünf Patienten zu einem Zeitpunkt Doppelbilder angegeben hatten und dass in allen fünf Fällen die Gesichts-, Nacken- und bulbäre Muskulatur mitbetroffen war. Trotzdem kann aufgrund der kleinen Anzahl noch keine allgemeine Aussage zur Klinik von anti-Agrin-seropositiven Myasthenia gravis Patienten getroffen werden. Weder Zhang et al. noch Cossins et al., denen ebenfalls der Nachweis von anti-Agrin-Antikörpern in Myasthenia gravis gelang, geben in ihren Berichten klinische Informationen zu den Patienten. So bleibt es also abzuwarten, ob zukünftige Studien mit großen Patientenzahlen mit anti-Agrin-Antikörpern diesbezüglich weitere Informationen liefern können.

#### **4.6 Auswirkungen von anti-Agrin-Autoantikörpern in anderen Geweben**

Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglykan und wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert; unter anderem im Gehirn, Rückenmark, Muskel, Niere, Leber und der Lunge[43-45]. Durch das Vorhandensein von drei Spleißstellen, genannt x-, y- und z-Stelle, kommt es zur Bildung von mehreren Isoformen mit gewebstypischer Expression; zwei alternative Transkriptionsstartstellen bedingen die Bildung einer transmembranen und einer löslichen, Basalmembran-gebundenen Form von Agrin. Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich lediglich durch kurze Sequenzen von acht oder elf Aminosäuren an der z-Stelle oder vier Aminosäuren an der y-Stelle. Da es unwahrscheinlich ist, dass die anti-Agrin-Antikörper genau gegen die für neuronales Agrin typischen kurzen Spleißsequenzen gebildet werden, liegt die Vermutung nahe, dass Antikörper gegen neuronales Agrin auch mit anderen Agrin-Isoformen reagieren könnten – beispielsweise mit Agrin-Isoformen in den Nieren und Blutgefäßen.

Über die Auswirkungen eines Mangels an Agrin oder einer beeinträchtigten Funktion in den bekannten Geweben mit hoher Expression von Agrin ist bisher wenig bekannt. Dies liegt unter anderem auch daran, dass Agrin-defiziente Mäuse aufgrund von neuromuskulären Defekten bereits während der Geburt versterben[65].

1998 konnten Groffen et al. zeigen, dass Agrin ein Hauptbestandteil der glomerulären Basalmembran der Nieren ist und damit möglicherweise eine Rolle in der renalen Ultrafiltration und der Ladungsselektivität der Blut-Harn-Schranke spielt[97, 98]. Die genaue Funktionsweise dieser Ladungsselektivität und die Bedeutung von Agrin dafür sind allerdings auch heute noch nicht vollständig bekannt und Gegenstand zahlreicher Studien. Mit Mäusen, bei denen die Expression von Agrin nur in Podozyten spezifisch unterdrückt wurde, konnte gezeigt werden, dass Agrin zwar wesentlich für die anionische Ladung der glomerulären Basalmembran ist, dass aber die glomeruläre selektive Permeabilität durch das Fehlen von Agrin nicht verändert wird[99]. Erst kürzlich wurde das C-terminale Agrin Fragment (CAF), welches durch die Spaltung von Agrin durch Neurotrypsin entsteht, als potentieller Biomarker für die Nierenfunktion in Patienten mit Niereninsuffizienz unter Behandlung mit Dialyse oder nach einer Nierentransplantation identifiziert[26, 100-102].

Auch in der alveolären Basalmembran der Lunge konnte eine Expression von Agrin nachgewiesen werden[97]. Die Rolle von Agrin und anderen Heparansulfat-Proteoglykanen wie Perlecan und Typ XVIII-Kollagen ist aber auch hier noch nicht bekannt[103].

Es wäre interessant, Patienten mit Autoantikörpern gegen Agrin auf Symptome und Defekte in den genannten Geweben zu untersuchen, die unabhängig von der neuromuskulären Endplatte sind und in Patienten mit anti-Agrin-seronegativer Myasthenia gravis nicht auftreten. Dies könnte schließlich sogar neue Hinweise auf die Funktionen von Agrin außerhalb der neuromuskulären Endplatte liefern. Möglich ist aber auch, dass die Autoantikörper nur gegen Domänen gebildet werden, die bei der Funktion der Niere und der Lunge keine Rolle spielen.

#### **4.7 Mini-Agrin als Antigen für die Detektion von Antikörpern gegen Agrin**

Die meisten Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden mit einem Plasmid durchgeführt, welches für humanes mini-Agrin kodiert. Isoliertes und gereinigtes humanes mini-Agrin wurde als Antigen an ELISA-Platten gebunden, um in den Seren Antikörper gegen Agrin nachzuweisen; HEK293 Zellen wurden mit humanem mini-Agrin transfiziert, um eine spezifische Färbung von mini-Agrin durch die Seren zu zeigen.

Mini-Agrin vereint ein N-terminales und ein C-terminales Fragment unterschiedlicher Größen miteinander[60]. Es ist ein Polypeptid mit einer Größe von etwa 960 Aminosäuren und einer berechneten Masse von ungefähr 100 kDa. Die Sequenz für mini-Agrin enthält die für die Induktion der AChR-Aggregation notwendigen C-terminalen Sequenzbereiche und die für neuronales Agrin typischen Sequenzen an den Spleißstellen. Somit enthält mini-Agrin die LRP4-Bindungsstelle, die für die Aktivierung von MuSK nötige Sequenz und auch die mit Laminin interagierende Domäne, und ist damit bezüglich der Signaltransduktion zur Bildung, Aufrechterhaltung und Regeneration der neuromuskulären Endplatte funktionsfähig. So ist es beispielsweise möglich, in Agrin-defizienten-Mausmodellen durch die Expression von mini-Agrin in der Skelettmuskulatur die Bildung der neuromuskulären Endplatten, insbesondere auch der präsynaptischen Nervenendigungen, wiederherzustellen[104]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von mini-Agrin die Symptome

der Muskeldystrophie in einem Mausmodell einer kongenitalen muskulären Dystrophie mildern kann[105].

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegende Hypothese, dass Autoantikörper gegen Agrin an der Symptomatik in Myasthenia gravis Patienten beteiligt sein könnten, beruht auf der entscheidenden Rolle, die Agrin in der Entwicklung und der Aufrechterhaltung der neuromuskulären Endplatten spielt. Antikörper gegen Agrin könnten diese Funktion von Agrin beeinträchtigen und damit beispielsweise durch Behinderung der Aggregation von Azetylcholinrezeptoren zu einer verminderten Signalübertragung an der neuromuskulären Endplatte führen. Diese könnte dann eine Ursache für die Muskelschwäche sein. Die Sequenzbereiche von Agrin, denen diese Funktionen – insbesondere die Bindung an LRP4 – zugeschrieben werden, sind im mini-Agrin-Konstrukt enthalten. Andererseits kodiert die mini-Agrin-DNA für nur etwa 50 Prozent der Proteinsequenz von Agrin, weshalb eine große Anzahl von möglichen Epitopen im mini-Agrin nicht vorhanden sind. Vor allem die zentralen Bereiche des Proteins, welche die Anlagerungsstellen für Glykosaminoglykane beinhalten, die Bindungsstelle für die O-Glykosylierung und die meisten der Follistatin-ähnlichen Domänen sind nicht im mini-Agrin-Konstrukt enthalten[40, 60, 106]. In unseren Untersuchungen könnten deshalb einige Patienten mit Autoantikörpern gegen Agrin möglicherweise als falsch negativ eingestuft worden sein. Durch die Verwendung von Vollängen-Agrin als Grundlage für den ELISA könnten möglicherweise weitere Patienten als seropositiv für anti-Agrin-Autoantikörper identifiziert werden.

## 4.8 Ausblick

Die Detektion von Autoantikörpern gegen den Azetylcholinrezeptor in Myasthenia gravis Patienten wurde erstmals in den 1970er Jahren erfolgreich durchgeführt und bildet heute einen wesentlichen Bestandteil in der Diagnostik der Erkrankung. Eine der gängigsten Methoden für die Bestimmung von Antikörpern gegen den Rezeptor ist die Immunpräzipitation von mit  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -Bungarotoxin markierten Azetylcholinrezeptoren[12]; es werden jedoch auch ELISAs mit immobilisierten Azetylcholinrezeptoren durchgeführt[107, 108]. Nachdem in den letzten Jahren Antikörper gegen weitere Antigene – insbesondere MuSK und LRP4 – nachgewiesen werden konnten, ist es notwendig, auch hochsensitive Assays für Autoantikörper gegen diese Proteine zu entwickeln. Aufgrund der gleichzeitig vorhandenen Antikörper gegen mehrere Proteine sollten diese Assays in der Lage sein, mehrere Typen von Autoantikörpern gleichzeitig zu detektieren. Es bleibt abzuwarten, ob die geringe Anzahl an Patienten einerseits sowie die patentrechtliche Situation andererseits eine kommerzielle Entwicklung dieser Diagnostika ermöglicht.

In dieser Studie wurden in zehn Prozent der untersuchten Seren erhöhte Konzentrationen von Antikörpern gegen Agrin nachgewiesen, was gemeinsam mit vergleichbaren Ergebnissen von zwei weiteren Studien[74, 75] einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang dieser Antikörper mit dem Auftreten von Myasthenia gravis gibt. Aufgrund der Tatsache, dass in allen fünf anti-Agrin-seropositiven Seren zuvor Antikörper gegen MuSK, LRP4 oder den Azetylcholinrezeptor nachgewiesen wurden, konnten in dieser Studie keine weitergehenden funktionellen Experimente durchgeführt werden. So besteht der Bedarf nach weiteren funktionellen Analysen mit größeren Kohorten an Patienten mit anti-Agrin-Antikörpern, um einen tieferen Einblick in die Beteiligung der anti-Agrin-Antikörper an der neuromuskulären Störung in Patienten mit Myasthenia gravis zu erlangen.

Diese Studie ist ein erster Schritt in Richtung Erforschung eines möglichen ursächlichen Zusammenhangs von anti-Agrin-Antikörpern und Myasthenia gravis. Sollte der Nachweis der Pathogenität der Antikörper gelingen, so könnte die Entwicklung von Nachweismethoden für Autoantikörper gegen Agrin neue Ansätze für die Diagnostik von Myasthenia gravis bieten, vor allem für Fälle der Erkrankung ohne nachweisbare Antikörper gegen den Azetylcholinrezeptor, MuSK oder LRP4.

## 5 Literatur

1. Aragonés, J.M., et al., *Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly*. Neurology, 2003. **60**(6): p. 1024-6.
2. McGrogan, A., S. Sneddon, and C.S. de Vries, *The incidence of myasthenia gravis: a systematic literature review*. Neuroepidemiology, 2010. **34**(3): p. 171-83.
3. Carr, A.S., et al., *A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis*. BMC Neurol, 2010. **10**: p. 46.
4. Phillips, L.H., 2nd, *The epidemiology of myasthenia gravis*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **998**: p. 407-12.
5. Kalb, B., et al., *Epidemiology of myasthenia gravis: a population-based study in Stockholm, Sweden*. Neuroepidemiology, 2002. **21**(5): p. 221-5.
6. Poulas, K., et al., *Epidemiology of seropositive myasthenia gravis in Greece*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001. **71**(3): p. 352-6.
7. Vincent, A., J. Palace, and D. Hilton-Jones, *Myasthenia gravis*. Lancet, 2001. **357**(9274): p. 2122-8.
8. Namba, T., N.G. Brunner, and D. Grob, *Myasthenia gravis in patients with thymoma, with particular reference to onset after thymectomy*. Medicine (Baltimore), 1978. **57**(5): p. 411-33.
9. Jaretzki, A., 3rd, et al., *Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America*. Neurology, 2000. **55**(1): p. 16-23.
10. Osserman, K.E., *Myasthenia gravis*. Grune & Stratton, 1958: p. 79-86.
11. Diener, H.C., C. Weimar, and e. al., *Diagnostik und Therapie der Myasthenia gravis und des Lambert-Eaton-Syndroms*. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Thieme Verlag, Stuttgart, 2012.
12. Lindstrom, J.M., et al., *Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value*. Neurology, 1976. **26**(11): p. 1054-9.
13. Lindstrom, J., *'Seronegative' myasthenia gravis is no longer seronegative*. Brain, 2008. **131**(Pt 7): p. 1684-5.
14. Lindstrom, J.M., *Acetylcholine receptors and myasthenia*. Muscle Nerve, 2000. **23**(4): p. 453-77.
15. Vincent, A., B. Lang, and K.A. Kleopa, *Autoimmune channelopathies and related neurological disorders*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 123-38.
16. Engel, A. and R. Hohlfeld, *Acquired autoimmune myasthenia gravis*, in *Myology 2004*, McGraw-Hill: New York. p. 1755-90.
17. Toyka, K.V., *Ptosis in myasthenia gravis: extended fatigue and recovery bedside test*. Neurology, 2006. **67**(8): p. 1524.
18. Oh, S.J., et al., *Diagnostic sensitivity of the laboratory tests in myasthenia gravis*. Muscle Nerve, 1992. **15**(6): p. 720-4.
19. Osserman, K.E. and G. Genkins, *Critical reappraisal of the use of edrophonium (tensilon) chloride tests in myasthenia gravis and significance of clinical classification*. Ann N Y Acad Sci, 1966. **135**(1): p. 312-34.
20. Lindstrom, J., *An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis*. Clin Immunol Immunopathol, 1977. **7**(1): p. 36-43.
21. Hoch, W., et al., *Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies*. Nat Med, 2001. **7**(3): p. 365-8.
22. Higuchi, O., et al., *Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis*. Ann Neurol, 2011. **69**(2): p. 418-22.
23. Leite, M.I., et al., *IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis*. Brain, 2008. **131**(Pt 7): p. 1940-52.

24. Wang, W.W., H.J. Hao, and F. Gao, *Detection of multiple antibodies in myasthenia gravis and its clinical significance*. Chin Med J (Engl), 2010. **123**(18): p. 2555-8.
25. Mygland, A., et al., *Ryanodine receptor autoantibodies in myasthenia gravis patients with a thymoma*. Ann Neurol, 1992. **32**(4): p. 589-91.
26. Aarli, J.A., et al., *Patients with myasthenia gravis and thymoma have in their sera IgG autoantibodies against titin*. Clin Exp Immunol, 1990. **82**(2): p. 284-8.
27. Zouvelou, V., et al., *Double-seropositive myasthenia gravis*. Muscle Nerve, 2013. **47**(3): p. 465-6.
28. Pevzner, A., et al., *Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis*. J Neurol, 2012. **259**(3): p. 427-35.
29. Zhang, B., et al., *Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis*. Arch Neurol, 2012. **69**(4): p. 445-51.
30. Kim, N., et al., *Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK*. Cell, 2008. **135**(2): p. 334-42.
31. Zhang, B., et al., *LRP4 serves as a coreceptor of agrin*. Neuron, 2008. **60**(2): p. 285-97.
32. Zhang, W., et al., *Agrin binds to the N-terminal region of Lrp4 protein and stimulates association between Lrp4 and the first immunoglobulin-like domain in muscle-specific kinase (MuSK)*. J Biol Chem, 2011. **286**(47): p. 40624-30.
33. Zisimopoulou, P., et al., *A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis*. J Autoimmun, 2014. **52**: p. 139-45.
34. Mossman, S., A. Vincent, and J. Newsom-Davis, *Myasthenia gravis without acetylcholine-receptor antibody: a distinct disease entity*. Lancet, 1986. **1**(8473): p. 116-9.
35. Soliven, B.C., et al., *Seronegative myasthenia gravis*. Neurology, 1988. **38**(4): p. 514-7.
36. Argov, Z., *Current approach to seronegative myasthenia*. J Neurol, 2011. **258**(1): p. 14-8.
37. Nemoto, Y., et al., *Patterns and severity of neuromuscular transmission failure in seronegative myasthenia gravis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005. **76**(5): p. 714-8.
38. Romi, F., J.A. Aarli, and N.E. Gilhus, *Seronegative myasthenia gravis: disease severity and prognosis*. Eur J Neurol, 2005. **12**(6): p. 413-8.
39. Tsen, G., et al., *Agrin is a heparan sulfate proteoglycan*. J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 3392-9.
40. Winzen, U., G.J. Cole, and W. Halfter, *Agrin is a chimeric proteoglycan with the attachment sites for heparan sulfate/chondroitin sulfate located in two multiple serine-glycine clusters*. J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 30106-14.
41. Cole, G.J. and W. Halfter, *Agrin: an extracellular matrix heparan sulfate proteoglycan involved in cell interactions and synaptogenesis*. Perspect Dev Neurobiol, 1996. **3**(4): p. 359-71.
42. Nitkin, R.M., et al., *Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 1): p. 2471-8.
43. O'Connor, L.T., et al., *Localization and alternative splicing of agrin mRNA in adult rat brain: transcripts encoding isoforms that aggregate acetylcholine receptors are not restricted to cholinergic regions*. J Neurosci, 1994. **14**(3 Pt 1): p. 1141-52.
44. Rupp, F., et al., *Structure and expression of a rat agrin*. Neuron, 1991. **6**(5): p. 811-23.
45. Gesemann, M., et al., *Agrin is a high-affinity binding protein of dystroglycan in non-muscle tissue*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 600-5.
46. Daniels, M.P., *The role of agrin in synaptic development, plasticity and signaling in the central nervous system*. Neurochem Int, 2012. **61**(6): p. 848-53.
47. Denzer, A.J., et al., *An amino-terminal extension is required for the secretion of chick agrin and its binding to extracellular matrix*. J Cell Biol, 1995. **131**(6 Pt 1): p. 1547-60.
48. Smith, M.A., et al., *Isolation and characterization of a cDNA that encodes an agrin homolog in the marine ray*. Mol Cell Neurosci, 1992. **3**(5): p. 406-17.
49. Tsim, K.W., et al., *cDNA that encodes active agrin*. Neuron, 1992. **8**(4): p. 677-89.
50. Gesemann, M., et al., *Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor*. Neuron, 1996. **16**(4): p. 755-67.

51. O'Toole, J.J., et al., *Alternative splicing of agrin regulates its binding to heparin alpha-dystroglycan, and the cell surface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7369-74.
52. Cornish, T., et al., *Globular domains of agrin are functional units that collaborate to induce acetylcholine receptor clustering*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 8)**: p. 1213-23.
53. Neumann, F.R., et al., *An alternative amino-terminus expressed in the central nervous system converts agrin to a type II transmembrane protein*. Mol Cell Neurosci, 2001. **17**(1): p. 208-25.
54. Burgess, R.W., W.C. Skarnes, and J.R. Sanes, *Agrin isoforms with distinct amino termini: differential expression, localization, and function*. J Cell Biol, 2000. **151**(1): p. 41-52.
55. Campanelli, J.T., et al., *Agrin mediates cell contact-induced acetylcholine receptor clustering*. Cell, 1991. **67**(5): p. 909-16.
56. Rupp, F., et al., *Structure and chromosomal localization of the mammalian agrin gene*. J Neurosci, 1992. **12**(9): p. 3535-44.
57. Hoch, W., et al., *Developmental regulation of highly active alternatively spliced forms of agrin*. Neuron, 1993. **11**(3): p. 479-90.
58. Ferns, M.J., et al., *The ability of agrin to cluster AChRs depends on alternative splicing and on cell surface proteoglycans*. Neuron, 1993. **11**(3): p. 491-502.
59. Scotton, P., et al., *Activation of muscle-specific receptor tyrosine kinase and binding to dystroglycan are regulated by alternative mRNA splicing of agrin*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 36835-45.
60. Huze, C., et al., *Identification of an agrin mutation that causes congenital myasthenia and affects synapse function*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(2): p. 155-67.
61. Hughes, B.W., L.L. Kusner, and H.J. Kaminski, *Molecular architecture of the neuromuscular junction*. Muscle Nerve, 2006. **33**(4): p. 445-61.
62. Szent-Gyorgyi, A.G., *Calcium regulation of muscle contraction*. Biophys J, 1975. **15**(7): p. 707-23.
63. Witzemann, V., *Development of the neuromuscular junction*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(2): p. 263-71.
64. Sanes, J.R. and J.W. Lichtman, *Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(11): p. 791-805.
65. Gautam, M., et al., *Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice*. Cell, 1996. **85**(4): p. 525-35.
66. Wu, H., W.C. Xiong, and L. Mei, *To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly*. Development, 2010. **137**(7): p. 1017-33.
67. Samuel, M.A., et al., *Agrin and synaptic laminin are required to maintain adult neuromuscular junctions*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46663.
68. Winkler, C., et al., *Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS*. Electrophoresis, 2007. **28**(12): p. 2095-9.
69. Weiss, W., F. Weiland, and A. Gorg, *Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis*. Methods Mol Biol, 2009. **564**: p. 59-82.
70. Vincent, A., et al., *Myasthenia gravis seronegative for acetylcholine receptor antibodies*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1132**: p. 84-92.
71. Sanders, D.B., et al., *Clinical aspects of MuSK antibody positive seronegative MG*. Neurology, 2003. **60**(12): p. 1978-80.
72. Maselli, R.A., et al., *LG2 agrin mutation causing severe congenital myasthenic syndrome mimics functional characteristics of non-neural (z-) agrin*. Hum Genet, 2012. **131**(7): p. 1123-35.
73. Bogdanik, L.P. and R.W. Burgess, *A valid mouse model of AGRIN-associated congenital myasthenic syndrome*. Hum Mol Genet, 2011. **20**(23): p. 4617-33.
74. Cossins, J., et al., *The search for new antigenic targets in myasthenia gravis*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1275**: p. 123-8.
75. Zhang, B., et al., *Autoantibodies to agrin in myasthenia gravis patients*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91816.

76. Hanisch, F., *Antibodies to agrin in immunosuppressed "quadruple-seronegative" myasthenia gravis*. 2014: Reply to Anti-Agrin antibodies in myasthenia gravis. <http://www.neurology.org>.
77. Romi, F., et al., *Anti-voltage-gated potassium channel Kv1.4 antibodies in myasthenia gravis*. *J Neurol*, 2012. **259**(7): p. 1312-6.
78. Suzuki, S., et al., *Novel autoantibodies to a voltage-gated potassium channel Kv1.4 in a severe form of myasthenia gravis*. *J Neuroimmunol*, 2005. **170**(1-2): p. 141-9.
79. Drachman, D.B., *How to recognize an antibody-mediated autoimmune disease: criteria*. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 1990. **68**: p. 183-6.
80. Drachman, D.B. and H.J. Kaminski, *Neuromuscular junction as Achilles' heel: Yet another autoantibody?* *Neurology*, 2014. **82**(22): p. 1942-43.
81. Huijbers, M.G., et al., *MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(51): p. 20783-8.
82. Konecny, I., et al., *MuSK myasthenia gravis IgG4 disrupts the interaction of LRP4 with MuSK but both IgG4 and IgG1-3 can disperse preformed agrin-independent AChR clusters*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e80695.
83. Diaz-Manera, J., et al., *Antibodies to AChR, MuSK and VGKC in a patient with myasthenia gravis and Morvan's syndrome*. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007. **3**(7): p. 405-10.
84. Sanders, D.B. and V.C. Juel, *MuSK-antibody positive myasthenia gravis: questions from the clinic*. *J Neuroimmunol*, 2008. **201-202**: p. 85-9.
85. Kostera-Pruszczyk, A. and H. Kwieciniski, *Juvenile seropositive myasthenia gravis with anti-MuSK antibody after thymectomy*. *J Neurol*, 2009. **256**(10): p. 1780-1.
86. Saulat, B., et al., *Anti-musk antibody after thymectomy in a previously seropositive myasthenic child*. *Neurology*, 2007. **69**(8): p. 803-4.
87. Zouvelou, V., et al., *AChR-myasthenia gravis switching to double-seropositive several years after the onset*. *J Neuroimmunol*, 2014. **267**(1-2): p. 111-2.
88. Gerli, R., et al., *Long-term immunologic effects of thymectomy in patients with myasthenia gravis*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **103**(5 Pt 1): p. 865-72.
89. Padua, L., et al., *Seronegative myasthenia gravis: comparison of neurophysiological picture in MuSK+ and MuSK- patients*. *Eur J Neurol*, 2006. **13**(3): p. 273-6.
90. Punga, A.R., et al., *MuSK levels differ between adult skeletal muscles and influence postsynaptic plasticity*. *Eur J Neurosci*, 2011. **33**(5): p. 890-8.
91. Punga, A.R., et al., *Muscle-selective synaptic disassembly and reorganization in MuSK antibody positive MG mice*. *Exp Neurol*, 2011. **230**(2): p. 207-17.
92. Diaz-Manera, J., et al., *Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia*. *Neurology*, 2012. **78**(3): p. 189-93.
93. Hatanaka, Y., et al., *Nonresponsiveness to anticholinesterase agents in patients with MuSK-antibody-positive MG*. *Neurology*, 2005. **65**(9): p. 1508-9.
94. Punga, A.R., et al., *Cholinergic neuromuscular hyperactivity in patients with myasthenia gravis seropositive for MuSK antibody*. *Muscle Nerve*, 2006. **34**(1): p. 111-5.
95. Evoli, A., et al., *Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis*. *Brain*, 2003. **126**(Pt 10): p. 2304-11.
96. Evoli, A., et al., *Response to therapy in myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1132**: p. 76-83.
97. Groffen, A.J., et al., *Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney*. *Eur J Biochem*, 1998. **254**(1): p. 123-8.
98. Groffen, A.J., et al., *Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane*. *J Histochem Cytochem*, 1998. **46**(1): p. 19-27.
99. Harvey, S.J., et al., *Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity*. *Am J Pathol*, 2007. **171**(1): p. 139-52.
100. Steubl, D., et al., *C-terminal agrin fragment--a new fast biomarker for kidney function in renal transplant recipients*. *Am J Nephrol*, 2013. **38**(6): p. 501-8.

101. Steubl, D., et al., *C-terminal agrin fragment (CAF) as a serum biomarker for residual renal function in peritoneal dialysis patients*. *Int Urol Nephrol*, 2014.
102. Steubl, D., et al., *Influence of high-flux hemodialysis and hemodiafiltration on serum C-terminal agrin fragment levels in end-stage renal disease patients*. *Transl Res*, 2014. **164**(5): p. 392-9.
103. Smits, N.C., et al., *Heparan sulfates in the lung: structure, diversity, and role in pulmonary emphysema*. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010. **293**(6): p. 955-67.
104. Lin, S., et al., *Muscle-wide secretion of a miniaturized form of neural agrin rescues focal neuromuscular innervation in agrin mutant mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(32): p. 11406-11.
105. Moll, J., et al., *An agrin minigene rescues dystrophic symptoms in a mouse model for congenital muscular dystrophy*. *Nature*, 2001. **413**(6853): p. 302-7.
106. Denzer, A.J., et al., *Electron microscopic structure of agrin and mapping of its binding site in laminin-1*. *EMBO J*, 1998. **17**(2): p. 335-43.
107. Hinman, C.L., et al., *Clinical correlates of enzyme-immunoassay versus radioimmunoassay measurements of antibody against acetylcholine receptor in patients with myasthenia gravis*. *J Neurol Sci*, 1986. **75**(3): p. 305-16.
108. Franciotta, D., et al., *TE671 cell-based ELISA for anti-acetylcholine receptor antibody determination in myasthenia gravis*. *Clin Chem*, 1999. **45**(3): p. 400-5.

## 6 Danksagung

Ich möchte meinem Betreuer Professor Stephan Kröger für die Möglichkeit dieser interessanten Dissertation und für seine wertvolle und lehrreiche Unterstützung während meiner Arbeit an der Studie danken.

Außerdem danke ich herzlichst allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Professor Kröger, Dr. Andromachi Karakatsani, Katja Peters, Anna Schick, Vivien Westermayer und Dr. Yina Zhang, die als Berater und Freunde immer für mich da waren.

Ich danke Professor Dr. Arthur Melms, Professor Dr. Benedikt Schoser und Professor Dr. Berthold Schalke für die Bereitstellung der Patientenseren und die gute Zusammenarbeit sowie den Patienten, die bereit waren, als Probanden für wissenschaftliche Arbeiten wie diese zur Verfügung zu stehen. Dr. Valerie Risson und Dr. Laurent Schaeffer danke ich für die Bereitstellung des human-mini-Agrin-pCEPPu-BM40-Vektors.

Ich danke meinen Schwestern Sarah und Nina Gasperi für den großen Beistand, den zu geben sie jederzeit bereit sind und meinen Eltern Paola und Arno, meiner Großmutter Maria und meinem Freund Gábor Heimann für ihre uneingeschränkte Unterstützung und ihre Ruhe, Geduld und Ausdauer, mit der sie mir zu Seite standen.

Diese Arbeit wäre ohne euch nicht möglich gewesen. Danke!

## 7 Appendix

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der Myasthenia gravis (modifizierte MGFA-Klassifikation 2000)[9, 11] .....	10
Tabelle 2: Puffer und Lösungen .....	24
Tabelle 3: Erstantikörper .....	28
Tabelle 4: Zweitantikörper .....	28
Tabelle 5: Zellmedien .....	29
Tabelle 6: Antikörperkonzentrationen in den fünf Patientenseren mit erhöhtem anti-Agrin-Titer .....	53
Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse .....	57
Tabelle 8: Klinische Daten zu den Myasthenia gravis Patienten .....	59

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Agrin und mini-Agrin[60] .....	16
Abbildung 2: Durch Agrin aktivierte intrazelluläre Signalwege führen zur Aggregation der Azetylcholinrezeptoren .....	18
Abbildung 3: pCEPPu-BM40-mini-Agrin .....	31
Abbildung 4: Proteinherstellung und –reinigung von humanem mini-Agrin .....	36
Abbildung 5: pMES mini-Agrin Vektor .....	42
Abbildung 6: Reinigung von mini-Agrin aus dem Zellüberstand transfizierter HEK 293 Zellen .....	44
Abbildung 7: Konzentrationsbestimmung des gereinigten humanen mini-Agrins .....	45
Abbildung 8: Western Blot des gereinigten mini-Agrins .....	46
Abbildung 9: Konzentrationsbestimmung des anti-Agrin-Antikörpers .....	48
Abbildung 10: Antikörper gegen mini-Agrin in Myasthenia gravis Patientenseren .....	49
Abbildung 11: Optische Dichte der humanen Seren an der unbeschichteten ELISA-Platte .....	51
Abbildung 12: Standardkurve zur Konzentrationsbestimmung der anti-Agrin-Antikörper .....	52
Abbildung 13: Färbung neuromuskulärer Endplatten mit MG Seren .....	54
Abbildung 14: Färbung transient transfizierter HEK293 Zellen mit MG Seren .....	56

