

Aus der Klinik der Neurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. K. Faßbender

GALAKTOSYLIERUNG UND SIALINISIERUNG
VON IMMUNGLOBULIN G
IN LIQUOR UND SERUM
VON PATIENTEN MIT MULTIPLER SKLEROSE

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2021

vorgelegt von: Artem Vitkin
geboren am: 08.08.1990 in Minsk

Tag der Promotion: 19.01.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Faßbender

Prof. Dr. Martina Sester

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Zusammenfassung	3
3	Abstract	5
4	Einleitung	6
4.1	Multiple Sklerose	6
4.1.1	Definition und Ätiologie	6
4.1.2	Epidemiologie	6
4.1.3	Symptomatik	7
4.1.4	Verlaufsformen	7
4.1.5	Diagnostik	9
4.1.6	Ätiologie und Pathogenese	9
4.2	Glykosylierung und Immunglobuline	13
4.2.1	Glykane und Glykoproteine	13
4.2.2	Immunglobuline	14
4.2.3	Glykosylierung von Immunglobulinen	15
4.2.4	Glykosylierung von IgG von gesunden Individuen	19
4.2.5	Glykosylierung von IgG in Zusammenhang mit Krankheit	20
4.2.6	Glykosylierung im Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose	20
4.3	Ziele der Arbeit	22
5	Material und Methoden	23
5.1	Material	23
5.1.1	Geräte und Instrumente	23
5.1.2	Gebrauchsmaterialien	23
5.1.3	Substanzen und Chemikalien	24
5.1.4	Pufferlösungen	25

5.2	Methoden	26
5.2.1	Patientenrekrutierung	26
5.2.2	Probenentnahme	26
5.2.3	Bestimmung von oligoklonalen Banden, Quantifizierung und Analyse von IgG	27
5.2.4	Isolierung von Immunglobulin G	27
5.2.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
5.2.6	Lektin-bindender Assay	27
5.2.7	Statistische Analyse	28
6	Ergebnisse	29
6.1	Galaktosylierung im Liquor in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht	29
6.2	Galaktosylierung: Vergleich von MS-Gruppe und Kontrollgruppe	32
6.2.1	Liquor cerebrospinalis	32
6.2.2	Serum	34
6.3	Zusammenhang von Galaktosylierung im Liquor cerebrospinalis mit klinischen Parametern und Laborparametern	35
6.3.1	Intrathekale IgG-Synthese und klinische Parameter	35
6.3.2	Progression von MS	37
6.4	Galaktosylierung bei Patienten mit viraler Meningitis	39
6.5	Sialinisierung im Serum: Vergleich von MS-Gruppe und Kontrollgruppe . . .	41
6.5.1	Zusammenhang von Sialinisierung mit der intrathekalien IgG-Synthese und klinischen Parametern	43
6.5.2	Zusammenhang mit der Progression von MS	43
7	Diskussion	44
7.1	Die Glykosylierung von IgG ist bei MS-Patienten verändert	44
7.2	Die Glykosylierung von IgG ist nicht verändert bei Patienten mit viraler Me- ningitis	45
7.3	Veränderte Glykosylierung kann zu aggressiverem Milieu führen	45
7.4	Methodik	47
7.5	Einordnung und Relevanz der Arbeit in den Kontext bekannter wissenschaft- licher Erkenntnisse	48
8	Literaturverzeichnis	50

9	Abbildungsverzeichnis	57
10	Publikationen	59
11	Lebenslauf	60

1 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl. antibody dependent cellular cytotoxicity)
AF	Agalactosylation factor (Faktor für Agalaktosylierung)
Asn	Asparagin
CDC	Komplementabhängige Zytolyse (engl. Complement Dependent Cytolysis)
CIS	Clinical isolated syndrome (klinisch isoliertes Syndrom)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dt.	deutsch
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Encephalomyelitis disseminata
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
Fab	Antigen-binding fragment (antigen-bindendes Fragment)
Fc	Cristalizable fragment (kristallisierbares Fragment)
GlcNAc	N-Acetyl-D-glucosamin
GSL-II	Griffonia simplicifolia (Lektin)
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HIV	Human immunodeficiency virus (humanes Immundefizienz-Virus)
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MBP	myelin-basic protein
MEP	Motorisch evozierte Potenziale
MgCl₂	Magnesiumchlorid
µl	Mikroliter

MnCl₂	Mangan(II)-chlorid
MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PLP	Proteolipid protein
PPMS	Primary Progressive Multiple Sclerosis (Primär Progrediente Multiple Sklerose)
RA	Rheumatoide Arthritis
RCA-I	Ricinus communis (Lektin)
RRMS	Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (Schubförmig remittierende Multiple Sklerose)
ROC	Receiver Operating Characteristic
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNA-I	Sambucus nigra (Lektin)
SPMS	Secondary Progressive Multiple Sclerosis (sekundär progrediente Multiple Sklerose)
SSEP	Somatosensibel evozierte Potenziale
TBS	Tris-buffered saline
VEP	Visuell evozierte Potentiale
ZNS	Zentrales Nervensystem

2 Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS).

Bei verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis, wurden Veränderungen der Glykosylierung von Antikörpern festgestellt.

Die Glykosylierung hat direkte Auswirkungen auf die Funktion der Antikörper. So nimmt beispielsweise die zellvermittelte Zytotoxizität oder auch die Komplementsystem-Aktivierung ab.

Ziel dieser Arbeit ist, zu untersuchen, ob die Multiple Sklerose, als chronisch-entzündliche Erkrankung, welche sich auf das zentrale Nervensystem beschränkt, auch mit Veränderungen der Glykosylierung einhergeht. Ebenfalls sollte untersucht werden, ob solche Veränderungen bei chronischen Entzündungen im Zentralnervensystem auftreten, welche mit einer viralen Meningitis einhergehen.

Untersucht wurden Serum- und Liquorproben von Patienten mit Multipler Sklerose, viraler Meningitis sowie einer Kontrollgruppe ohne entzündliche Erkrankung oder Autoimmunerkrankung.

Immunglobulin G wurde aus diesen Proben isoliert und anschließend auf Veränderungen bei der Glykosylierung mittels Lektin-Assay untersucht.

Die Ergebnisse zeigten bei der Galaktosylierung von Immunglobulin G im Liquor von gesunden Probanden eine Abhängigkeit von Alter und Geschlecht.

Desweiteren zeigte sich eine signifikante Abnahme der Galaktosylierung von Immunglobulin G im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose. Diese Veränderungen zeigten sich allerdings nicht im Serum der Patienten. Außerdem konnte eine Korrelation von Galaktosylierung und Progress der Krankheit gezeigt werden.

Es konnte auch gezeigt werden, dass die abnehmende Galaktosylierung nicht einfach nur auf eine Entzündungsreaktion zurückzuführen ist, da keine solchen Veränderungen bei Patienten mit viraler Meningitis festgestellt werden konnten.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Sialinisierung von Immunglobulin G im Serum von Patienten mit Multipler Sklerose signifikant erhöht ist.

Möglicherweise kann weitere zukünftige Forschung darauf aufbauen, dass es messbare Verän-

derungen bei der Glykosylierung von Immunglobulin G bei Patienten mit Multipler Sklerose gibt, um beispielsweise Marker für Krankheitsaktivität zu entwickeln oder neue Therapieoptionen zu schaffen.

3 Abstract

Title: Investigation of galactosylation and sialylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid and serum of Multiple Sclerosis patients

Multiple Sclerosis is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS).

Alterations in glycosylation of antibodies were discovered in various chronic inflammatory diseases, like rheumatoid arthritis.

Glycosylation has a direct effect on antibody functions. For example, it can reduce antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity or activation of the complement system.

Objective of this thesis is to examine, if Multiple Sclerosis - a chronic inflammatory disease which constrains its inflammatory activity on the central nervous system - is also a disease affected by glycosylation changes in antibodies. Another goal is to find out, if such changes in glycosylation also occur in other states of chronic inflammation in the CNS, like Viral Meningitis.

Serum and cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients with Multiple Sclerosis and Viral Meningitis were analyzed and compared to a control group of healthy probands without any inflammatory or autoimmune disease. Immunoglobulin G (IgG) was isolated from the samples and a lectin-based assay was used to investigate potential alterations of glycosylation.

Results showed that galactosylation of Immunoglobulin G in CSF is dependent on age and gender. Furthermore a significant decrease in galactosylation of IgG in CSF of Multiple Sclerosis patients could be shown, which could not be found in serum samples of patients. Additionally a correlation between galactosylation and disease progression could be indicated.

Loss of galactose residues is not simply result of inflammation, since no significant differences could be shown in Viral Meningitis patients.

Furthermore a significant increase of sialylation of IgG could be shown in serum of Multiple Sclerosis patients.

The task of future research will be to find out if this measurable glycosylation changes can be utilized as markers for disease activity or for development of new therapy options.

4 Einleitung

4.1 Multiple Sklerose

4.1.1 Definition und Ätiologie

Multiple Sklerose (MS), auch als Encephalomyelitis disseminata (ED) bezeichnet, ist die am häufigsten vorkommende entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS). [52] Erstmals beschrieben wurde MS von Jean Martin Charcot 1868 in Paris, als er Ansammlungen von Entzündungszellen in der weißen Substanz der Gehirne von Patienten fand, die an neurologischen Ausfällen litten. [35]

Charakteristisch für die Multiple Sklerose sind Demyelinisierungsherde an mehreren Orten im ZNS sowie ein Verlust von Oligodentroyten und ein axonaler Schaden. [57]

Die Ätiologie der MS ist bis heute nicht abschließend geklärt. Exogene Faktoren sowie die Genetik scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen. Außerdem wurden Zusammenhänge mit diversen Faktoren, wie dem Vitamin D-Haushalt und Epstein-Barr-Virus (EBV), identifiziert. [52]

4.1.2 Epidemiologie

Von der Multiplen Sklerose sind weltweit etwa 2 Millionen Menschen betroffen. [36] Allein in Deutschland waren im Jahr 2010 knapp unter 200.000 Menschen an MS erkrankt. [66] Die jährliche Inzidenz beträgt 3,5 bis 5 pro 100.000 Einwohner. [41]

Frauen sind von der Multiplen Sklerose etwa doppelt bis dreifach so häufig betroffen wie Männer. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 30 Jahren. [41]

Es kann ein eindeutiges Nord-Süd-Gefälle bei der Prävalenz der Erkrankung beobachtet werden. So gibt es in tropischen Regionen weniger als 5 Erkrankungsfälle pro 100.000 Einwohner während in Nordeuropa, den Vereinigten Staaten von Amerika und Kanada über 100 - 200 Erkrankte pro 100.000 Einwohner beschrieben werden. [52] Es scheint also eine Korrelation zwischen der Erkrankungsfrequenz und der geographischen Breite zu geben. [43]

Es gibt allerdings auch Ausnahmen von dieser Regel, sodass diese Korrelation nicht auf die bloße Beziehung zum Breitengrad oder zur Temperatur zurückzuführen sein kann. Es ist wahrscheinlich, dass weitere Umweltfaktoren sowie die Genetik eine wichtige Rolle spielen. [52]

4.1.3 Symptomatik

Das klinische Bild der Multiplen Sklerose kann eine Vielzahl neurologischer Auffälligkeiten aufweisen. Symptome entwickeln sich meist über mehrere Tage und können sich, je nach Form der MS, spontan - komplett oder teilweise - zurückbilden oder auf Corticosteroide ansprechen. Zu den häufigen Erstsymptomen gehören beispielsweise Sehstörungen, einseitige Retrobulbärneuritis, Doppelbilder, Ataxie, die Schwäche einer oder mehrerer Extremitäten oder neurogene Blasen- und Mastdarmstörungen. [56]

Um die klinischen Befunde bzw. die Behinderungen durch MS zu quantifizieren, wird vorzugsweise die Expanded Disability Status Scale (EDSS) verwendet. Diese stellt eine Ordinalskala dar und erfasst die Untersuchung der funktionellen Systeme Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorium, Blasen- und Mastdarmfunktion, Sehfunktion und zerebrale Funktion. [42] Einen Überblick über den Score gibt Tabelle 4.1.

4.1.4 Verlaufsformen

Bei der Multiplen Sklerose können folgende Stadien bzw. Verläufe unterschieden werden:

- das klinisch isolierte Syndrom (KIS, im englischen 'CIS'),
- die schubförmige Verlaufsform ('relapsing-remitting', RRMS),
- die primär progrediente Verlaufsform (PPMS) und
- die sekundär progrediente Verlaufsform (SPMS).

[47] [69]

Im Anfangsstadium erscheint meist das klinisch isolierte Syndrom (CIS). Es beschreibt das erstmalige Auftreten einer für die MS typischen Symptomatik, jedoch ohne die Kriterien einer zeitlichen Dissemination zu erfüllen (siehe Abschnitt 4.1.5) [51]

Bei der schubförmigen Form der MS (RRMS) kann man auftretende Schübe der Erkrankung eindeutig voneinander abgrenzen. Zwischen diesen Schüben können sich die Symptome vollständig oder teilweise zurückbilden.

EDSS-Grad	Symptome
0	Normale neurologische Untersuchung.
1,0	Keine Behinderung, minimale Abnormität in einem funktionellen System.
1,5	Keine Behinderung, minimale Abnormität in mehr als einem funktionellen System.
2,0	Minimale Behinderung in einem funktionellen System
2,5	Minimale Behinderung in zwei funktionellen Systemen
3,0	Mäßiggradige Behinderung in einem funktionellen System oder leichte Behinderung in drei oder vier funktionellen Systemen, aber voll gehfähig.
3,5	Patient ist voll gehfähig, aber mit mäßiger Behinderung in einem funktionellen System und leichter Behinderung in einem oder zwei funktionellen Systemen; oder mäßige Behinderung in zwei funktionellen Systemen; oder leichte Behinderung in fünf funktionellen Systemen.
4,0	Patient ist gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 m. Aktiv während ca. 12 Stunden pro Tag trotz relativ schwerer Behinderung.
4,5	Patient ist gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 m. Ganztätig arbeitsfähig. Gewisse Einschränkung der Aktivität, benötigt minimale Hilfe, relativ schwere Behinderung.
5,0	Patient ist gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 200 m. Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivität zu beeinträchtigen (z. B. ganztätig zu arbeiten ohne besondere Vorkehrungen).
5,5	Patient ist gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 100 m. Behinderung schwer genug, um normale tägliche Aktivität unmöglich zu machen.
6,0	Patient bedarf intermittierend oder auf einer Seite konstant der Unterstützung (Krücke, Stock, Schiene), um etwa 100 m ohne Rast zu gehen.
6,5	Patient benötigt konstant beidseits Hilfsmittel (Krücke, Stock, Schiene), um etwa 20 m ohne Rast zu gehen.
7,0	Patient ist unfähig, selbst mit Hilfe, mehr als 5 m zu gehen. Weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Bewegt den Rollstuhl selbst und transferiert ohne Hilfe.
7,5	Patient ist unfähig, mehr als ein paar Schritte zu tun. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbst, aber vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen. Benötigt eventuell motorisierten Rollstuhl.
8,0	Patient ist weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden. Pflegt sich weitgehend selbständig. Meist guter Gebrauch der Arme.
8,5	Patient ist weitgehend ans Bett gebunden, auch während des Tages. Einiger nützlicher Gebrauch der Arme, einige Selbstpflege möglich.
9,0	Hilfloser Patient im Bett. Kann essen und kommunizieren.
9,5	Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu essen, zu schlucken oder zu kommunizieren.
10,0	Tod infolge MS.

Tabelle 4.1: Expanded Disability Status Scale nach Kurtzke et al. [42] (Darstellung vereinfacht)

Als primär progrediente Form der Multiplen Sklerose wird ein Verlauf mit einer von Beginn an stetigen Zunahme der Symptome bezeichnet.

Eine sekundär progrediente MS (SPMS) entwickelt sich aus einer schubförmigen Form, welche einen chronisch-progredienten Verlauf annimmt. [47]

4.1.5 Diagnostik

Zur Diagnose der Multiplen Sklerose werden die McDonald-Kriterien herangezogen. [69] Dabei muss der Nachweis einer zeitlichen und einer örtlichen Dissemination erfolgen.

Neben Anamnese und klinischer Untersuchung stehen verschiedene apparative diagnostische Methoden zur Verfügung:

- Die **Messung von evozierten Potentialen** (visuell evozierte Potenziale (VEP), somatosensibel evozierte Potenziale (SSEP), motorisch evozierte Potenziale (MEP)) kann Hinweise auf subklinische Veränderungen geben. [69]
- Die **Magnetresonanztomographie** wird zum Nachweis von multifokalen Läsionen genutzt. Prädilektionsstellen dafür sind der Nervus opticus, das periventriculäre Marklager, das Kleinhirn, der Hirnstamm und das Rückenmark. Durch Kontrastmittelgabe kann zwischen frischeren (Gadolinium aufnehmenden) und älteren Herden (welche kein Gadolinium aufnehmen) unterschieden werden. [31]
- in der **Liquordiagnostik** kann sich als Zeichen einer chronischen Entzündungsreaktion eine leichte lymphozytäre Pleozytose zeigen. Des Weiteren sind der Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese sowie positive oligoklonale Banden typische Befunde bei MS-Patienten. [6]

4.1.6 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der MS ist bis heute nicht abschließend geklärt. In den folgenden Abschnitten werden die bisherigen Erkenntnisse zusammengefasst.

Die Rolle der Genetik

Wie oben bereits erwähnt, scheint die Genetik bei der Krankheitsentstehung der MS eine prägende Rolle einzunehmen. Es gibt mehrere Beobachtungen, die dafür sprechen:

Das Lebenszeitrisko, an einer Multiplen Sklerose zu erkranken, beträgt etwa 1:400. Geschwister von MS-Patienten allerdings haben ein 8-faches Risiko ebenfalls zu erkranken, bei Zwillingen steigt dies sogar auf das 140-fache. [19]

Unter den verschiedenen ethnischen Gruppen der Erde gibt es einige, wie etwa Kaukasier, die häufiger von der Erkrankung betroffen sind und wiederum andere, wie die Völker asiatischer und afrikanischer Abstammung und Eskimos, welche nur sehr selten von MS betroffen sind. [52]

Die Wahrscheinlichkeit, an Multipler Sklerose zu erkranken, ist bei Verwandten ersten Grades von MS-Patienten um etwa 5 % erhöht. [28]

Alle diese Hinweise verdichten den Verdacht auf eine genetische Komponente, jedoch wurde ein verantwortliches Gen bis heute nicht identifiziert. [52]

Die Genetik allein kann jedoch Folgendes nicht erklären: Die direkten Nachkommen von Migranten, die aus einer ethnischen Gruppe mit niedriger Prävalenz von MS stammen (z.B. Afrika) und in eine Region mit vergleichsweise hoher MS-Prävalenz kommen (z.B. Irland), haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an MS zu erkranken, vergleichbar eher mit der Prävalenz der neuen Heimat, als der alten Heimatregion ihrer Eltern. [39]

Diese und ähnliche Beobachtungen deuten auf einen starken Einfluss von Umweltfaktoren hin.

Die Rolle von Vitamin D

Einen dieser Faktoren beschreibt die sogenannte 'Vitamin D Hypothese'. Diese bringt die geringere Sonnenexposition in weiter vom Äquator entfernten Ländern, über die Aktivierung von Vitamin D durch ultraviolette Strahlung in der Haut und die immunmodulatorischen Effekte von Vitamin D, mit einer Verringerung des Erkrankungsrisikos für MS bei konstant höheren Vitamin D-Spiegeln, zusammen. [52]

Molekulares Mimikry

Eine andere Hypothese sieht den Auslöser von Multipler Sklerose in einem infektiösen Agens. Das Risiko für MS ist assoziiert mit der infektiösen Mononukleose, einer durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) ausgelösten Erkrankung, die vor allem Jugendliche betrifft. Das Virus hat durchaus Eigenschaften, die eine Rolle bei der Entstehung von MS plausibel machen, da es B-Zellen infiziert und in diesen persistiert. Zusätzlich ist die Proteinsequenz eines EBV-Antigens homolog zu der eines Epitops von Myelin, was eine Reaktion im Sinne eines

molekularen Mimikry bei der MS-Entstehung möglich erscheinen lässt. [9]

Hygiene-Hypothese

Infektionen spielen auch bei einer weiteren Hypothese, der Hygiene-Hypothese, eine Rolle. Diese besagt, dass ein Kontakt mit bestimmten Krankheitserregern in der frühen Kindheit vor dem Erkranken an MS schützt, während ein späterer Kontakt mit denselben Erregern MS auslösen kann. [52]

Die Rolle des Immunsystems

Eine weitere wichtige Rolle spielt das Immunsystem. Im Körper von gesunden Individuen befinden sich autoreaktive, gegen Myelin (oder ein anderes ZNS-Antigen) gerichtete T-Zellen, die normalerweise von regulatorischen T-Zellen in Schach gehalten werden. Nach der Theorie des 'molecular mimicry' werden diese autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie durch Umwelt-Antigene aktiviert. Daraufhin exprimieren die aktivierten T-Lymphozyten Adhäsionsmoleküle und ermöglichen sich so die Bindung an das Endothel und damit einen Weg durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS. Dort angekommen, erkennen die Lymphozyten ihr Autoantigen, aktivieren daraufhin Mikrogliazellen und führen so, durch eine sich wiederholende Entzündungskaskade, zu einem Infiltrat aus aktivierten T-Zellen, Mikrogliazellen und einigen neutrophilen Granulozyten. [20] Auch B-Zellen sowie deren Antikörperproduktion scheinen bei der Pathogenese eine Rolle zu spielen. Die intrathekale Synthese von Antikörpern wird sogar zur Diagnostik verwendet. [18]

Die Rolle von B-Zellen und Antikörpern

Reife, aus dem Knochenmark stammende B-Zellen gehen durch einen Prozess der Affinitätsreifung in peripheren Keimzentren von Lymphknoten. Bei diesem Prozess können die Gene für Immunglobuline durch somatische Hypermutation beträchtlich verändert werden. Auf den anschließenden Selektionsprozess folgend differenzieren die B-Lymphozyten zu Gedächtniszellen. Diese Zellen können nun potentiell ZNS-reaktiven T-Zellen Antigene präsentieren und diese aktivieren. Aktivierte Lymphozyten können die Blut-Hirn-Schranke überwinden und zu perivaskulären Infiltraten führen. Im Gehirn angekommen, wandern einige B-Zellen unter anderem in den Liquor cerebrospinalis aus und sind dort unter anderem verantwortlich für die Produktion von klonalen Immunglobulinen. [18]

Antikörper können in Liquor cerebrospinalis sowie im Hirngewebe von MS-Patienten nachgewiesen werden. [84] Ihre Anwesenheit im Liquor wird unter anderem (als Nachweis von

oligoklonalen Banden) für die Diagnostik der Erkrankung genutzt. [80] Diese Befunde sind nicht spezifisch und können beispielsweise auch bei Patienten nach Schlaganfall auftreten. [11] Allerdings wurden Antikörper gegen Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), myelin-basic protein (MBP) und Proteolipid protein (PLP) in den Gehirnläsionen und im Liquor von MS-Patienten gefunden. [18] Es ist noch nicht abschließend bewiesen, wie sehr und in welcher Form die Anwesenheit dieser Antikörper krankheitsrelevant ist, es gibt aber immer wieder Studien, welche in diese Richtung deuten. [18] Zusammenfassend lässt sich jedoch kein eindeutig relevantes Zielantigen von pathogenen Antikörpern identifizieren. [18]

Die Rolle von oligoklonalen Banden

Eine häufig vorkommende immunologische Auffälligkeit bei Patienten mit Multipler Sklerose ist das Vorhandensein einer intrathekalen Synthese von Immunglobulin G (IgG). [6]

Eine erhöhte Immunglobulin-Konzentration im Liquor kann verschiedene Gründe haben. Eine Erhöhung kann durch eine erhöhte Immunglobulin-Konzentration im Blut entstehen oder auf eine Störung der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen sein. [21] Diesem Umstand muss bei der Analyse Rechnung getragen werden. Um eine Herkunft der oligoklonalen Banden aus dem Blut auszuschließen bzw. nachzuweisen, wird bei jeder Liquor-Untersuchung zeitgleich eine Serum-Untersuchung des selben Patienten durchgeführt. Zudem wird auch die Albumin-Konzentration im Liquor sowie im Serum bestimmt. Da Albumin im zentralen Nervensystem (ZNS) nicht produziert wird, ergibt das Verhältnis der Albumin-Konzentration in Liquor und Serum einen Anhaltspunkt für die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke. [82]

Durch die Gel-Elektrophorese ist es möglich zu zeigen, dass Proteine bei Patienten mit Multipler Sklerose (und anderen neuroinflammatorischen Erkrankungen) zu mehreren Banden akkumulieren. Diese Banden werden als oligoklonal bezeichnet, im Gegensatz zum polyklonalen Verteilungsmuster bei gesunden Probanden. Wenn das oligoklonale Muster im dazugehörigen Serum nicht reproduzierbar ist, lässt dies eine IgG-Produktion von einigen wenigen Plasmazell-Klonen im Zentralnervensystem vermuten. [58] Hingegen deuten gleiche oligoklonale Banden in Liquor und Serum auf eine systemische Aktivierung des Immunsystems, wie z.B. bei Infektionen oder Tumoren, hin. [21]

4.2 Glykosylierung und Immunglobuline

4.2.1 Glykane und Glykoproteine

'Glykane sind Zucker oder eine Anordnung von Zuckern (Oligo- oder Polysaccharide), die in freier Form oder an andere Moleküle gebunden vorkommen können.' (frei übersetzt nach [55])

Lange Zeit wurden Glykane von der naturwissenschaftlichen Welt nur als einfache Dekorationen von Zellen betrachtet. [49] Dabei sind sie neben Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden ein sehr wichtiger Baustein von lebenden Organismen. [50] Alle lebenden Zellen besitzen Glykane, eingebaut in ihrer Zellmembran oder ihrer Zellwand. Sie nehmen teil an zellulären Signalwegen und spielen eine Rolle bei Immunität und Inflammation. [55] Glykane sind beispielsweise die Merkmale beim ABO-Blutgruppensystem und dienen auch als Erkennungsmuster für das Zellalter und beeinflussen so die Lebensdauer von Erythrozyten. [50, 55]

Der Informationsweg in einer Zelle führt typischerweise ausgehend von der DNA über die RNA bis zum fertig translatierten Protein. Dieses Protein funktioniert aber meistens nur dann korrekt, wenn post-translationale Modifikationen vorgenommen werden. Eine der häufigsten Formen von post-translationaler Modifikation ist die Glykosylierung von Proteinen, also das Anhängen von Glykanen. [55]

Wenn Glykane an Proteine oder Lipide gebunden vorkommen, werden diese Strukturen dann auch Glykoproteine oder Glykolipide genannt. Von den Proteinen auf der Zelloberfläche und den von der Zelle sezernierten Proteinen ist die Mehrheit glykosyliert.

Die Glykane können auf zwei Arten mit den Aminosäuren des jeweiligen Proteins verbunden sein: über ein Stickstoff-Atom (N-Glykosylierung) oder ein Sauerstoff-Atom (O-Glykosylierung). Nicht immer haben die Glykane eine direkte Funktion, beispielsweise als Erkennungsstruktur für andere Proteine. Sie können auch die Eigenschaften des Proteins verändern, mit dem sie verbunden sind. [27] Weitgehend tragen Glykane auf drei Arten zur Funktion von Proteinen bei [44]:

- Durch ihren nicht unerheblichen Anteil an der Größe des Proteins beeinflussen sie Struktur (Faltung des Proteins) und funktionelle Eigenschaften (Löslichkeit und Stabilität).
- Durch alterierende Glykosylierung wird die Funktion der Proteine (z.B. Bindungsaffinität zu Rezeptoren) verändert (anders aufgebaute Glykanstrukturen an der selben

Bindungsstelle im Protein haben Einfluss auf die Funktion).

- Durch Glykane werden Bindungsstellen für Glykan-bindende Rezeptoren (genannt Lektine) geformt.

Der Fortschritt der Erforschung von Glykanen sowie ihrer Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen befindet sich weit hinter dem von Genen und Proteinen. Dies liegt wohl vor allem an methodischen Schwierigkeiten bei der Analyse von kleinen Mengen an Glykanen sowie deren struktureller Komplexität. [44]

Lektine

Zum Erkennen von Glykanstrukturen gibt es in der Natur spezielle Kohlenhydrat-bindende Proteine. Diese werden Lektine genannt. [77] Sie sind Bestandteil von vielen Rezeptoren und Signalwegen. Beispiele dafür sind:

- Lektine helfen dem Immunsystem dabei, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Eine wichtige Rolle nehmen dabei die sogenannten Mannose-bindenden Lektine (MBL) ein. [50]
- Sogenannte Asialoglycoprotein-Rezeptoren in der Leber sind in der Lage, alternde Erythrozyten zu erkennen und einen Vernichtungsprozess in Gang zu bringen. [4]
- Selektine, ebenfalls Kohlenhydrat-bindende Proteine, initiieren die Leukozytenwanderung nach extravasal z.B. während entzündlichen Prozessen. [50]

4.2.2 Immunglobuline

Bereits im Jahr 1890 berichteten Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato von einer Substanz im Blut, die Diphterietoxin neutralisieren könne. 1939 wurde von Tiselius und Kabat eine Serum-Elektrophorese durchgeführt und so auch die γ -Globuline entdeckt. Seit mehr als 100 Jahren wird an Antikörpern geforscht und bis heute ist deren komplexe Eigenschaften noch nicht vollständig verstanden. [76]

Immunglobuline bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Jede dieser Ketten besitzt eine variable und eine oder mehrere konstante Domänen. Beide leichten Ketten eines Immunglobulins verfügen über eine konstante Domäne. Die schweren Ketten dagegen besitzen, je nach Immunglobulin-Klasse,

drei oder vier solche Domänen, welche dann als C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} (und eventuell C_{H4}) bezeichnet werden. Ein Immunglobulin-Molekül lässt sich in drei Fragmente aufteilen: zwei Fragmente Fab und ein Fragment Fc (siehe Abbildung 4.2). Diese entstehen bei einer enzymatischen Spaltung mittels Papain. [76]

Immunglobuline können sowohl als lösliche Moleküle als auch als Rezeptoren auf der Zelloberfläche fungieren und so zelluläre Signalwege aktivieren. Die Funktion des Fab-Fragments ist die Bindung von Antigenen (ab = engl. 'antigen binding'). Das Fc-Fragment ist für die Effektorfunktion der Antikörper verantwortlich, wie beispielsweise die Bindung an Fc-Rezeptoren von Effektorzellen oder die Aktivierung des Komplementsystems. Veränderungen des Fc-Teils eines Antikörpers können dessen Bindungsverhalten zu Antigenen wesentlich verändern. [76]

Beim Menschen gibt es fünf verschiedene Immunglobulin-Klassen: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD. Die Immunglobuline A und G können in mehrere Unterklassen eingeteilt werden (IgA1, IgA2 und IgG1-4). [8] Alle Klassen verfügen über die gleichen Leichtketten (κ und λ). Unterschieden werden die Klassen über ihre verschiedenen schweren Ketten (γ , μ , α , ϵ und δ). Die Klassen IgM und IgA bilden über weitere verknüpfende Disulfidbrücken Dimere bzw. Pentamere, was ihnen eine rigidere Struktur verleiht, während die Klassen IgA, IgD und IgG zwischen Fab- und Fc-Fragment flexibler sind. [50] Die am häufigsten im menschlichen Serum vorkommende Klasse ist IgG. [5]

Eine schematische Darstellung der verschiedenen Immunglobulinklassen wird in Abbildung 4.1 dargestellt.

4.2.3 Glykosylierung von Immunglobulinen

Immunglobuline sind Glykoproteine, Proteine mit einem Anteil an Kohlenhydraten, der zur Struktur und auch zur Funktion beiträgt. Je nach Klasse machen Glykane bis zu 15% des Gewichtes von Antikörpern aus. [44] Das am häufigsten im menschlichen Serum vorkommende IgG1 verfügt an seiner schweren Kette über eine einzige N-glykosylierte Proteinstelle in seiner Aminosäuresequenz - an der Stelle Asn-297 (siehe Abbildung 4.2; mitunter in der Literatur auch als Asn-180 (bei IgG1) bezeichnet, nach dem 'International Immunogenetics Information System (IMGT) numbering protocol' bezeichnet als CH2-84.4 [50]). [27] Selbes trifft für die Unterklassen IgG2 und IgG4 zu, während IgG3 über eine weitere N-glykosylierte Stelle verfügt. [50]

Die Zuckerreste werden im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat der Zelle an die schweren Ketten des Immunglobulins angehängt bzw. umgebaut, bis ein fertiges Glykan

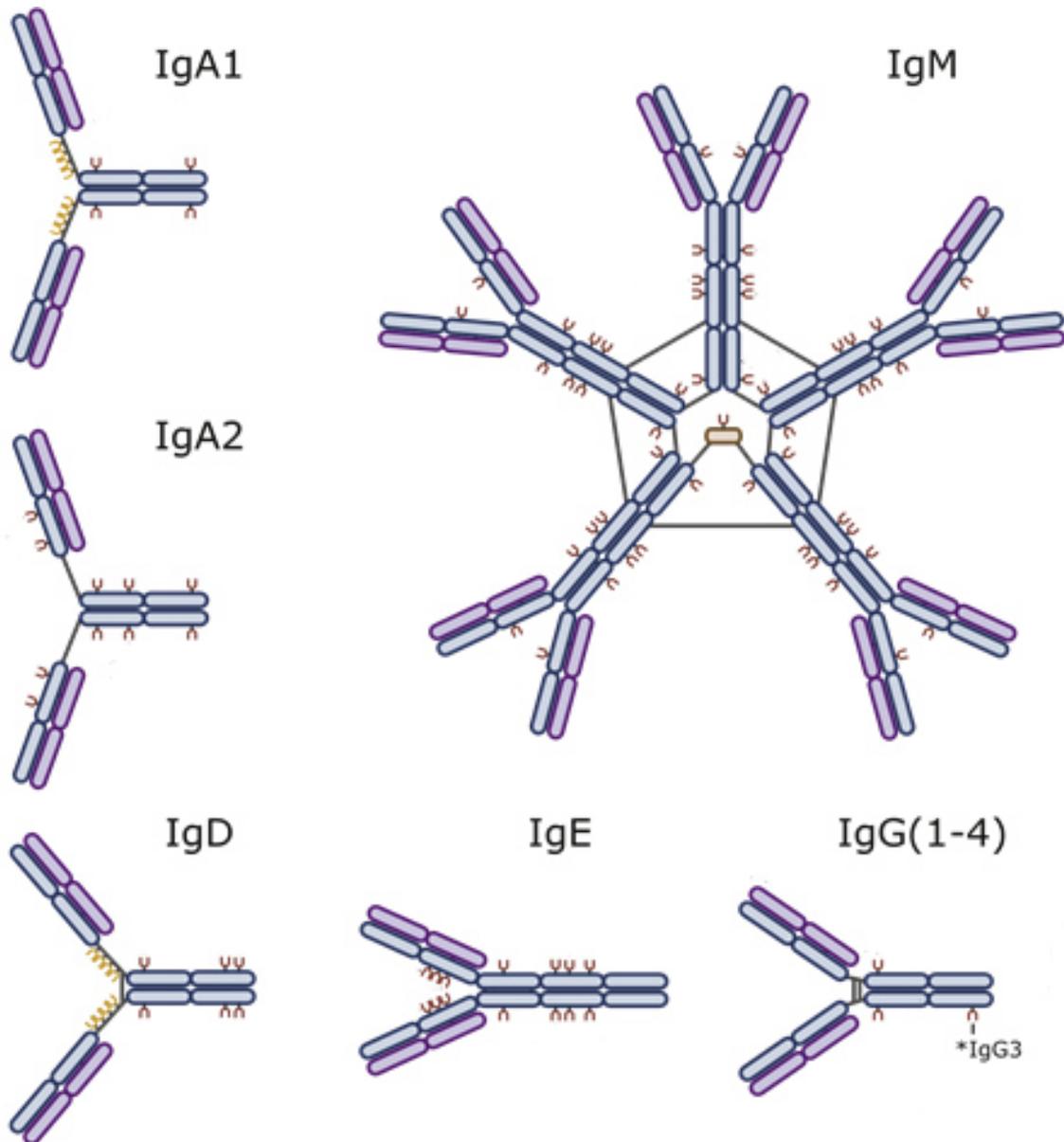


Abbildung 4.1: Schematische vereinfachte Darstellung der verschiedenen Immunglobulin-Klassen.

Jedes Immunglobulin besteht in seiner Grundstruktur aus zwei schweren Ketten (blau) sowie zwei leichten Ketten (lila), welche durch Disulfidbrücken (schwarze Linien) verbunden sind. Die Protein-Stellen mit O-Glykosylierung (gelb) und N-Glykosylierung (braun) sind ebenfalls schematisch dargestellt.

(Darstellung von Maverakis et al. [50](vereinfacht))

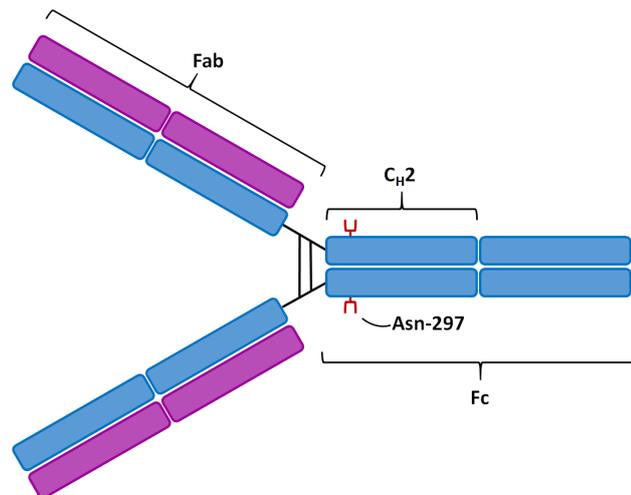


Abbildung 4.2: Schematische vereinfachte Darstellung von Immunglobulin G und seiner Glykosylierungsstellen an Asn-297 (CH2-84.4).

IgG besteht aus zwei schweren Ketten (blau) und zwei leichten Ketten (lila), welche durch Disulfidbrücken (schwarze Linien) miteinander verbunden sind. Zwischen dem Rezeptor-bindenden Fc-Teil und den Antigen-bindenden Fab-Teilen besitzt IgG eine flexible 'Scharnier'-Region. (Darstellung in Anlehnung an Maverakis et al. [50])

entsteht. [7] Dieses Glykan trägt unter anderem zur Stabilität und zur Aufrechterhaltung der Quartärstruktur des Fc-Fragmentes bei. Außerdem ist das Glykan in der Lage, Lektine (Proteine, die spezifisch Zuckerstrukturen binden können) zu binden.

Jede der beiden schweren Ketten des IgG-Moleküls kann unterschiedlich glykosyliert sein. Es gibt 32 bekannte Formen von Glykanen, die mehrheitlich über zwei Antennen verfügen. [8] Einige von ihnen können in drei Untergruppen, IgG-G2, -G1 und -G0 eingeteilt werden, je nachdem ob sich am Ende der Antennen insgesamt zwei, ein oder kein Galaktose-Rest befindet (siehe Abbildung 4.3). [26] Bei der Untergruppe G2 findet sich an beiden Antennen ein endständiges Galaktose-Molekül. Bei Gruppe G1 fehlt einer der Galaktose-Reste, was einen N-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc)-Rest in endständige Position bringt. Der Gruppe G0 fehlen beide Galaktose-Reste an den Antennen, sodass sie über zwei endständige GlcNAc-Moleküle verfügt. [8, 26] Diese drei Gruppen machen 86% des durchschnittlichen im menschlichen Serum zirkulierenden Glykan-Pools aus. Die restlichen 14% bestehen aus IgG-G1 und -G2, welche zusätzlich endständige Sialinsäure-Reste besitzen. Außerdem verfügen ca. 70% des Glykan-Pools über einen ansatznahen Fucose-Rest und ca. 30% über einen GlcNAc-Rest zwischen beiden Antennen. [8]

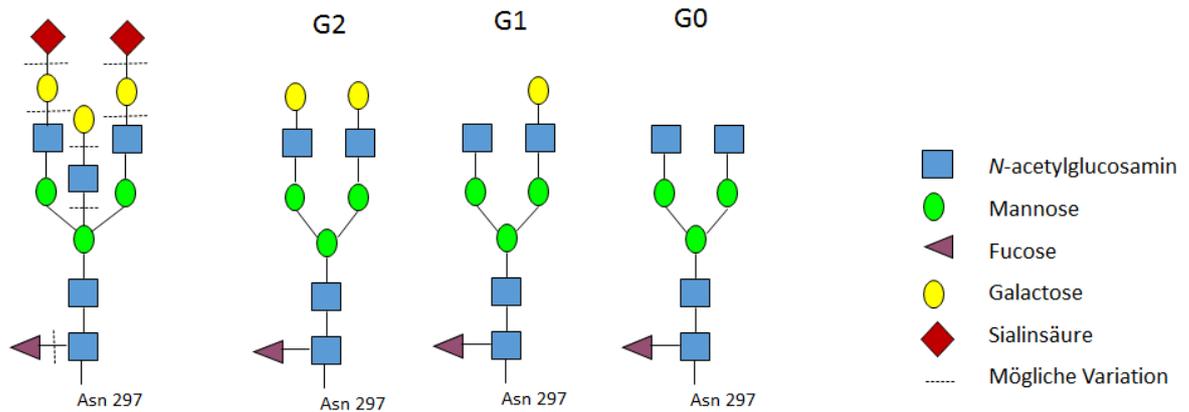


Abbildung 4.3: Vereinfachte Darstellung der Glykanstrukturen an der Stelle Asn-297 und ihrer möglichen Variationen. Die Glykane mit endständiger Galactose können in die Untergruppen IgG-G2, -G1, und G0, je nach Anzahl der Galactose-Reste auf den Antennen, zugeordnet werden. (In Anlehnung an Huhn et al. [38])

Funktion von Glykanen auf Immunglobulinen

Antikörper binden an Antigene und ermöglichen so antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), Opsonierung und Phagozytose. [86] Diese Funktionen sind abhängig von den Glykanresten an Asn-297. Die Glykane halten die Konformation des Antikörpers stabil, sodass diese mit Fc-Rezeptoren interagieren können. [7]

In verschiedenen Publikationen konnte gezeigt werden, welche Auswirkungen die Veränderungen der Glykanstrukturen am Fc-Fragment von IgG hat:

Halb-glykosylierte (eine schwere Kette glykosyliert, die andere nicht) IgG zeigen eine geringere Bindungsaffinität zu allen Fc γ -Rezeptoren, was zu einer Abschwächung der ADCC-Aktivität um das 3,5-fache führt. [34]

Eine erhöhte Rate an terminalen Galaktoseresten steigerte die Bindung von Komplementfaktoren am Antikörper und somit die komplementabhängige Zytolyse (CDC). [37]

Agalaktosylierte Fc-Fragmente binden 15-20-fach schlechter an den Fc γ RIII-Rezeptor. [72]

Agalaktosyliertes cetuximab (pharmakologisch genutzter monoklonaler Antikörper) bindet nicht an den gewünschten Fc-Rezeptoren und entwickelt auch keine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). [65] Dieses Phänomen limitiert den therapeutischen Nutzen von klinisch eingesetzten Antikörpern, da dieser auf einer Interaktion

zwischen Antikörpern und Immunzellen angewiesen ist.

Im Mausmodell für die rheumatoide Arthritis konnte gezeigt werden, dass sialinisierte Antikörper die inflammatorische Aktivität deutlich reduzieren konnten. [59]

Es konnte gezeigt werden, dass intravenöses Immunglobulin, welches unter anderem zur Therapie verschiedener Autoimmun-Krankheiten eingesetzt wird, auf Sialinsäure-Reste auf den Fc-Fragmenten der Antikörper angewiesen ist. [40]

Die größte Rolle in der Forschung spielen die Galaktose-Reste auf den Glykanstrukturen von Antikörpern. Aber nicht nur Galaktose-Reste spielen eine Rolle. Auch Fucose- sowie Sialinsäure-Reste der Glykanstrukturen können die Eigenschaften der Antikörper verändern. Ansatznahe Fucose-Reste haben Einfluss auf die Funktionsweise und Aktivität von Antikörpern. So konnte gezeigt werden, dass IgG mit fehlenden Fucose-Resten in ihrer Glykanstruktur eine höhere Affinität zu bestimmten Fc γ -Rezeptoren aufweisen. [78]

Auch Sialinsäure-Reste sind in etwa 14% der Fälle auf den Glykanstrukturen von IgG anzufinden. [8] Einige Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass ein hoher Grad an mit Sialinsäure-Resten bestückten IgG mit einer geringeren Aktivität selbiger einhergeht, welche auf geringere Affinität der Antikörper zum Fc-Rezeptor sowie weniger Komplementsystem-Aktivierung zurückzuführen ist. [71, 75]

4.2.4 Glykosylierung von IgG von gesunden Individuen

Die Antikörper-Glykosylierung ist nicht bei jedem Menschen gleich. Unter anderem ist der prozentuale Anteil an IgG-G0, also agalaktosylierten Antikörpern im Serum, von Alter, Geschlecht oder auch dem Bestehen einer Schwangerschaft abhängig.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass sich der Anteil von nicht-galaktosylierten IgG mit dem Alter verändert. [38] So liegt der Prozentsatz agalaktosylierter IgG bei ca. 30%, fällt um das 25. Lebensjahr auf etwa 20% ab und nimmt danach mit dem Alter kontinuierlich zu, um bei einem Alter von ca. 70 Jahren eine Marke von 40% zu erreichen. [62]

Auch das Geschlecht spielt eine Rolle. Bei Frauen zeigt sich im Durchschnitt eine niedrigere Rate an agalaktosylierten Serum-Antikörpern als bei Männern. [87] Im Vergleich dazu haben Frauen in der Schwangerschaft eine erhöhte Rate an glykosylierten Antikörpern. Besonders im dritten Trimenon haben Frauen nach Studien eher niedrige IgG-G0-Werte, die nach der Schwangerschaft auch wieder ansteigen. Bei Vergleichen von mütterlichem Serum mit dem Serum aus den fetalen Umbilikalvenen wurde festgestellt, dass die Galaktosylierung im fe-

talen Serum um 25% höher war, als die des mütterlichen Serums. Dies könnte auf einen glykosylierungsabhängigen Transportmechanismus in der Plazenta hindeuten. [38]

Insgesamt lässt sich sagen, dass der Grad der Galaktosylierung von IgG sich von Mensch zu Mensch sehr stark unterscheidet. Sowohl Alter als auch Geschlecht haben Einfluss darauf, wobei der Einfluss des Alters größer ist. Auch die Schwangerschaft kann sich auf die Galaktosylierung auswirken. [38]

4.2.5 Glykosylierung von IgG in Zusammenhang mit Krankheit

Das Thema 'Glykosylierung von IgG' wurde schon in Bezug auf viele unterschiedliche Krankheiten untersucht. Am meisten Aufmerksamkeit hat dabei die Galaktosylierung der Oligosaccharide erfahren. [38] Eine Auswahl an Krankheiten, für die eine erniedrigte Galaktosylierung berichtet wurde, ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

Zu den ersten Forschungsgruppen gehörten Parekh et al. im Jahr 1985. Sie untersuchten Patienten mit rheumatoider Arthritis und primärer Osteoarthritis. [61] Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Galaktosylierung bei der rheumatoiden Arthritis mit einem schwereren Krankheitsverlauf korreliert. [89] Ebenfalls wurde festgestellt, dass eine Remission der Arthritis, welche oftmals in Schwangerschaft beobachtet wird, auch mit einer Verminderung von IgG-G0 einhergeht. [38] Rademacher et al. konnten zeigen, dass agalaktosylierte IgG eine nicht unerhebliche Rolle im Tiermodell der rheumatoiden Arthritis spielen. Mit β -Galaktosidase behandelte Typ-II-Kollagen-IgG lösten bei DBA/1-Mäusen (ein anerkanntes Tiermodell für rheumatoide Arthritis) eine viel stärkere arthritische Immunreaktion aus als nicht behandelte Antikörper. [73] Ebenfalls im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass IgG während einer aktiven humoralen Immunantwort einen niedrigeren Grad von Galaktosylierung aufweisen und dieser Grad wieder ansteigt, wenn die gesamt-IgG-Titer nach der akuten Immunantwort wieder fallen. [38]

4.2.6 Glykosylierung im Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose

Es ist bisher wenig bekannt über den Einfluss der Glykosylierung von Antikörpern auf den Verlauf oder die Pathogenese der Multiplen Sklerose. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Aktivität von Enzymen, welche für die N-Glykosylierung zuständig sind, Einfluss auf das Krankheitsbild hat:

Das Gen MGAT5 kodiert für ein Enzym namens Alpha-1,6-mannosylglycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase A, ein Enzym, welches verantwortlich ist für das Hinzufügen von N-Acetylglucosamin an Oligosaccharide. [3] Eine genomweite Assoziationsstudie identi-

Krankheit	Studienkohorte	Analysemethode	Ref.
Rheumatoide Arthritis (RA)	19 Patienten	Glykan-Freisetzung & Chromatographie	[61]
RA	127 Patienten	Lektin-bindender Assay	[89]
RA	29 Patienten	Lektin-bindender Assay	[15]
Adult onset RA	53 Patienten	Glykan-Freisetzung & Chromatographie	[62]
Juvenile onset RA	27 Patienten	Glykan-Freisetzung & Chromatographie	[62]
Juvenile onset RA	9 Patienten	Lektin-bindender Assay	[15]
Osteoarthritis	13 Patienten	Glykan-Freisetzung & Chromatographie	[61]
Osteoarthritis	13 Patienten	Lektin-bindender Assay	[15]
Morbus Chronn	9 Patienten	Glykan-Freisetzung & Chromatographie	[63]
Morbus Chronn	17 Patienten	Lektin-bindender Assay	[15]
Systemischer Lupus erythematodes (SLE)	12 Patienten	Lektin-bindender Assay	[14, 15]
SLE mit Sjögren-Syndrom	10 Patienten	Glykan-Freisetzung & Chromatographie	[63]
Spondylitis ankylosans	12 Patienten	Lektin-bindender Assay	[15]
Colitis ulcerosa	32 Patienten	Immunoassay mit anti-GlcNAc mAb	[25]
Colitis ulcerosa	16 Patienten	Lektin-bindender Assay	[15]
Infektiöse Endokarditis	12 Patienten	Lektin-bindender Assay	[15]
Tuberkulose	21 Patienten	Glykan-Freisetzung & Chromatographie	[63]
HIV Infektion	28 Patienten	Lektin-bindender Assay; Glykan-Freisetzung & Massenspektrometrie	[53]
Ovarialkarzinom	3 Patienten	Glykan-Freisetzung & Chromatographie	[74]

Tabelle 4.2: Auswahl von Krankheiten, für welche ein erhöhtes IgG-G0 und/oder erniedrigte IgG-Galaktosylierung berichtet wurden. (nach Huhn et al. [38])

fizierte MGAT5 als Marker für den Schweregrad der Krankheit bei MS-Patienten. [17] Eine gezielte Deletion von MGAT5 bei Mäusen mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) führte zu einer erhöhten inflammatorischen Demyelinisierung und einer erhöhten Neurodegeneration. [23, 45]

4.3 Ziele der Arbeit

Bereits in mehreren verschiedenen Krankheiten sowie Krankheitsmodellen konnte ein Zusammenhang zwischen Galaktosylierung von Fc-Fragmenten und einer erhöhten Rate von agalaktosylierten Antikörpern festgestellt werden (siehe Tabelle 4.2). In dieser Arbeit sollte betrachtet werden, ob das auch für die Multiple Sklerose zutrifft.

Auch die Sialinisierung scheint Einfluss auf die Funktion von IgG zu haben und so zu Veränderungen der inflammatorischen Aktivität zu führen. Es sollte daher in dieser Arbeit ebenfalls betrachtet werden, ob es auch bei Patienten mit Multipler Sklerose Veränderungen bei der Sialinisierung von IgG gibt.

Da es sich bei der Multiplen Sklerose um einen Entzündungsprozess im Zentralnervensystem handelt, sollte untersucht werden, ob sich eine mögliche Agalaktosylierung auf diesen Raum beschränkt oder auch in anderen Körperkompartimenten zu finden ist. Daher wurden sowohl Serumproben als auch Liquorproben von Patienten mit Multipler Sklerose mit Proben einer Kontrollgruppe verglichen.

Die konkreten Fragestellungen lauteten:

- Besteht ein Unterschied hinsichtlich der Galaktosylierung sowie Sialylierung des Fc-Fragments von IgG bei Patienten mit Multipler Sklerose im Vergleich mit gesunden Probanden?
- Lässt sich ein Unterschied hinsichtlich dieser Fragestellung zwischen Serum und Liquor cerebrospinalis feststellen?
- Lässt sich ein Unterschied bei einer Entzündungsreaktion im Zentralnervensystem wie einer viralen Meningitis beobachten?

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte und Instrumente

Bezeichnung	Firma
Rotationsmischer (Titer plate shaker)	Thermo Scientific, Waltham, USA
SUNRISE™ remote microplate absorbance reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Statistical Package for the Social Sciences 15.0 for Windows	IBM, New York, USA

Tabelle 5.1: verwendete Geräte, Instrumente und Software

5.1.2 Gebrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
ELISA-Plate Microton, 96W, Flatt-Bott, High binding	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Mikroröhre 2ml mit Verschluss	Sarstedt, Numbrecht, Deutschland
Protein LoBind Tube 1,5ml Cat.No.: 022431081	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Protein G Dynabeads 10003D	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
S-Monovette	Sarstedt, Numbrecht, Deutschland

Tabelle 5.2: verwendete Gebrauchsmaterialien

5.1.3 Substanzen und Chemikalien

Bezeichnung	Firma
Albumin, from bovine serum ¹ A2153-100G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Calcium chloride fuesd granular	Merck, Darmstadt, Germany
DL-Dithiothreitol for electrophoresis ² D9163-5G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Biotinylated ³ Griffonia Simplicifolia Lectin II B-1215 2mg	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotynolated ³ Ricinus communis Agglutinin I B-1085 5mg	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Biotinylated ³ Sambucus nigra Lectin I B-1305 2mg	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mangan(II)-chlorid (MnCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure 95-97%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin-HRP	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Tris-HCl 1.08219.1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
TWEEN 20 P1379 500ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 5.3: verwendete Substanzen und Chemikalien

¹dt.: Albumin, aus bovinem Serum

²dt.: DL-Dithiotreititol für Elektrophorese

³dt.: biotinyliert

5.1.4 Pufferlösungen

Bezeichnung	Inhalt
10X-Bindungspuffer	1 M Natriumacetat 1,5 M NaCl pH = 5,0
1X-Bindungspuffer	0,1 M Natriumacetat 0,15 M Natriumchlorid (NaCl) pH = 5,0
Elutionspuffer	0,1 M Citrat pH = 2,2
Ausgleichspuffer	Tris 1 M pH = 12,99
Phosphate buffered saline (Phosphat- gepufferte Salzlösung) (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O 2,0 mM KH ₂ PO ₄
Dithiothreitol (DTT) - Lösung	0.1 M Tris-HCl 2mg/ml dithiotreitol pH = 8.0
RCA-I-Lösung	0.5 µg /ml TBS-T 1 mM Ca ²⁺ , 1 mM Mg ²⁺ , 1% BSA, 1% Tween
GSL-II-Lösung	10 µg /ml TBS-T 1 mM Ca ²⁺ , 1 mM Mg ²⁺ , 1% BSA, 1% Tween
TBS - Tween (TBS-T)	150 mM NaCl 50 mM Tris-Base 0,5% Tween 20 in dH ₂ O

Tabelle 5.4: verwendete Pufferlösungen

5.2 Methoden

Alle im Folgenden genannten Materialien und Pufferlösungen werden in Kapitel 5.1 (ab S. 23) aufgeführt und näher bezeichnet.

5.2.1 Patientenrekrutierung

Für die Untersuchungen wurden drei Probanden- bzw. Patientengruppen Proben von Blutserum und Liquor cerebrospinalis abgenommen. Diese drei Gruppen waren:

- Patienten mit Multipler Sklerose (einbegriffen wurde auch das klinisch isolierte Syndrom (CIS)). Diese Patienten wurden nach Bestätigung der Diagnose anhand der revidierten McDonald-Kriterien [69] ausgewählt.
- Patienten mit viraler Meningitis. Diese Diagnose wurde zusätzlich zu klinischen Kriterien durch positive PCR für virale DNA oder den Nachweis von antiviralen IgG im Liquor cerebrospinalis bestätigt.
- Probanden ohne Vorgeschichte und Nachweis einer inflammatorischen oder autoimmunen Erkrankung des zentralen Nervensystems. Diese Gruppe wurde als Kontrollgruppe verwendet.

Für diese Arbeit wurde auf rückgefrorene Proben zurückgegriffen. Das Vorgehen wurde von der saarländischen Ethikkommission bewilligt (Kenn-Nr. 08/11).

5.2.2 Probenentnahme

Die Blutproben wurden über venöse Punktion in S-Monovetten entnommen. Die Proben wurden mindestens 30 Minuten ruhen gelassen, um Koagulation zu ermöglichen und dann für 10 Minuten bei 276 G zentrifugiert. Die Liquorproben wurden über Lumbalpunktion in eine Monovette (S-Monovette, Sarstedt) entnommen und bei 970 G für 10 Minuten zentrifugiert. Die routinemäßigen Laboranalysen von Serum und Liquor wurden nach gültigen klinischen Standards durchgeführt.

Blutsera und Liquorüberstände wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C in Mikroröhren gelagert.

5.2.3 Bestimmung von oligoklonalen Banden, Quantifizierung und Analyse von IgG

Die Bestimmung von oligoklonalen Banden wurde mittels isoelektrischer Fokussierung mit nachfolgender IgG-Färbung durchgeführt. Die Immunglobuline A, M und G und Albumin wurden mittels Nephelometrie aus Liquor und Serum bestimmt. Die quantitative Bestimmung der intrathekalen IgG-Synthese.

5.2.4 Isolierung von Immunglobulin G

Das Immunglobulin G aus den Proben wurde durch Protein G-Affinitätschromatographie nach beschriebener Methodik[58] mit einigen Anpassungen durchgeführt.

Zu 450 µl einer Probe (Serum oder Liquor) wurden 50 µl 10X-Bindungspuffer gegeben. Danach wurde der pH-Wert der Proben mittels einmolarer Salzsäurelösung auf 5,00 angepasst. Die Proben wurden in Reaktionsgefäße mit schwacher Proteinbindung (Protein LoBind Tube) überführt. 200 µl 'Protein G Dynabeads'-Lösung wurden dazugegeben. Die Proben wurden in einem Rotationsmischer für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimalig mit 1X-Bindungspuffer gewaschen. Das IgG wurde mit 90 µl Elutionspuffer herausgelöst und der pH-Wert mit 10 µl Ausgleichspuffer neutralisiert. Das isolierte IgG wurde bei -20°C in schwach Protein bindenden Reaktionsgefäßen (Protein LoBind Tube) verstaubt. Die Reinheit der isolierten Proben wurde kontrolliert mittels SDS-PAGE gefolgt von Coomassie-Färbung.

5.2.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels 'Bio-Rad Protein Assay' entsprechend der Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

5.2.6 Lektin-bindender Assay

Für die Bestimmung des Galactosylierungsgrades der Antikörper wurde ein Lektin-bindender Assay durchgeführt. Die verwendeten Lektine waren Ricinus communis (RCA-I), Griffonia simplicifolia (GSL-II) und Sambucus nigra SNA-I. Unser Verfahren orientierte sich weitgehend an bereits beschriebenen Protokollen. [64]

Mikrotiter-Platten wurden mit je 0,25 µg isolierten IgG in PBS pro Nöpfchen beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten drei mal mit TBS-Tween

gewaschen. Die Immunglobuline wurden unter Verwendung von Dithiotreitol (DTT-Lösung) für 70 Minuten bei 37°C reduziert. Nach nochmals dreimaligem Waschen mit TBS-Tween wurde GSL-II-Lösung, RCA-I-Lösung oder SNA-I dazugegeben und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurde nochmals 5-malig mit TBS-Tween gewaschen. Streptavidin-HRP, gelöst in TBS-Tween, wurde anschließend zu den Proben gegeben. Nach nochmals 7-maligem waschen mit TBS-Tween wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine hinzugegeben und die Reaktion durch Hinzugeben von Schwefelsäure (2 M) gestoppt. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450nm auf einem automatischen Mikroplatten-Reader (SUNRISE™ remote, Tecan) gemessen.

Die ELISA-Versuche wurden systematisch mindestens zwei mal, von verschiedenen Personen, durchgeführt. Eine aus mehreren konzentrierten IgG-Proben von Gesunden Vergleichsproben gepoolte Vergleichsprobe wurde als Referenz bei allen dieser Versuche genutzt. Eine stufenweise Verdünnung dieser Referenzprobe wurde verwendet, um eine Standardkurve zu generieren, wie bei ähnlichen Versuchen in der Literatur beschrieben [83]. Die Quantität von gebundenen Lektinen GSL-II und RCA-I sowie SNA-I wurde unter Einbeziehung zu dieser Standardkurve berechnet. Alle untersuchten Proben hatten Absorptionswerte im linear verlaufenden Bereich dieser Standardkurve.

Das Verhältnis von GSL-II / RCA-I wurde als Agalactosylation factor (Faktor für Agalaktosylierung) (AF) definiert. In allen Versuchen wurde der durchschnittliche AF der gesunden Vergleichsgruppe auf den Wert 1,0 gesetzt.

5.2.7 Statistische Analyse

Für den Vergleich zwischen den Gruppen wurde der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für die Analyse von Korrelationen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman mit Hilfe des 'Statistical Package for the Social Sciences 15.0 for Windows' bestimmt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

6 Ergebnisse

6.1 Galaktosylierung im Liquor in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

Um ein Maß für den Grad der Galaktosylierung der Immunglobuline zu haben, wurde artifiziell ein **Faktor AF** (engl. für 'agalactosylation factor') bestimmt. Dieser wurde definiert als das Verhältnis der korrigierten Absorptionswerte der beiden Lektine GSL-II und RCA-I. Ein hoher AF steht dementsprechend für geringere endständige galaktosylierte Immunglobuline und ein niedriger AF für mehr endständige Galaktosylierung.

Der AF der IgG aus Liquor cerebrospinalis von Patienten der Kontroll-Gruppe abhängig vom Alter bei Entnahme in der Abbildung 6.1 dargestellt. Die Probanden waren zwischen 17 und 49 Jahre alt. Der AF zeigte sich bis zu einem Alter von 25 Jahren stabil und stieg dann sukzessive an (Spearman's $\rho = 0,491; p < 0,001$). Auch wenn man Männer und Frauen separat betrachtet, zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Abbildung 6.2 zeigt den AF abhängig vom Alter für Männer (Spearman's $\rho = 0,639; p < 0,001$) und die Abbildung 6.3 für Frauen ($\rho = 0,4; p < 0,005$). Bei einem vergleichbaren mittleren Alter von Männern und Frauen in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 6.1) stellte sich außerdem heraus, dass der durchschnittliche AF der Männer 26% ($p = 0,01$) über dem AF der Frauen lag (siehe Abbildung 6.4).

	Männer	Frauen
Anzahl	23	47
Mittelwert (Alter in Jahren)	30,9	30,9
Standardabweichung	1,9	1,3

Tabelle 6.1: Darstellung der Altersverteilung in der Kontrollgruppe

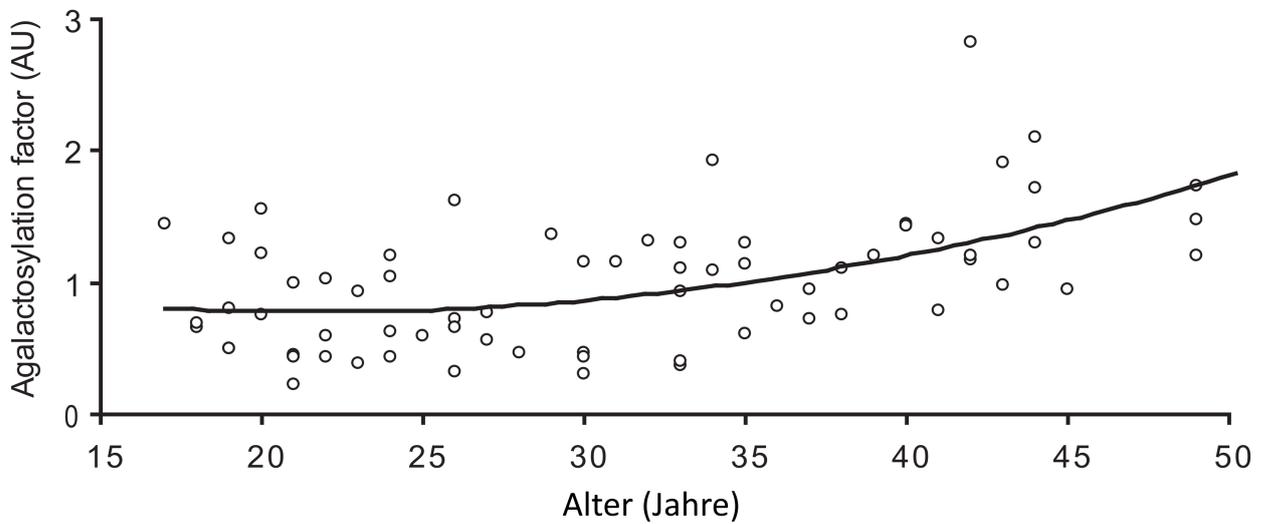


Abbildung 6.1: Darstellung der Galaktosylierung anhand des **AF** (agalactosylation factor) in Relation zum **Alter** der Probanden. Dargestellt sind Proben von gesunden Probanden aus der Kontrollgruppe. Die Regressionskurve wird durch die Funktion $y = 0,0013x^2 - 0,0565x + 1,3949$ beschrieben.

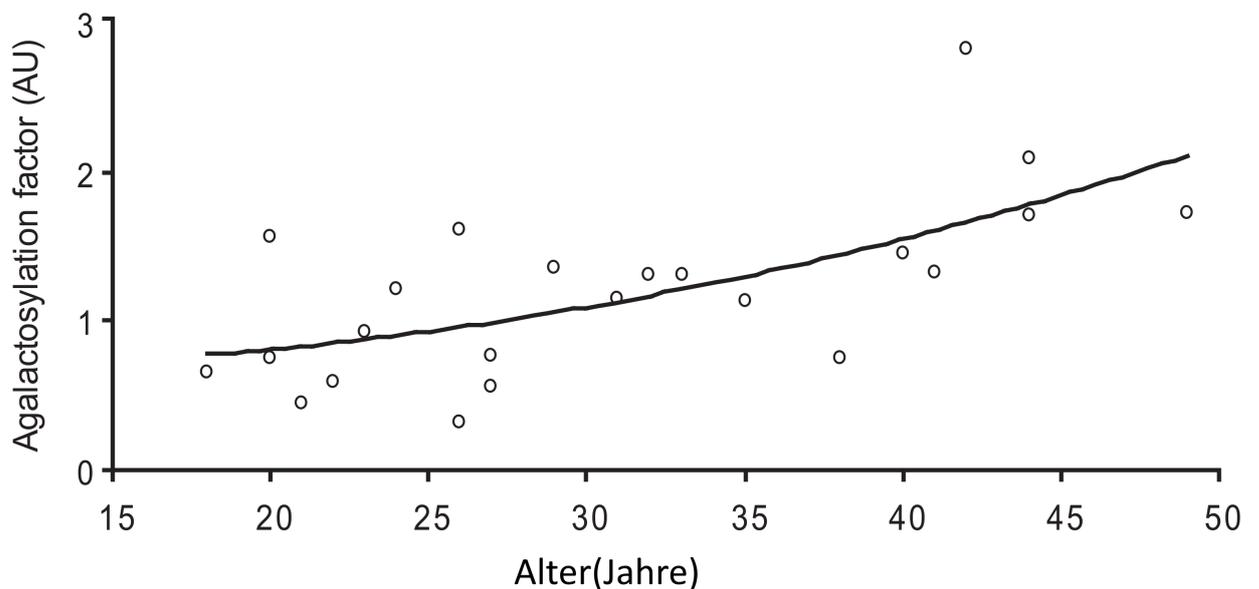


Abbildung 6.2: **Männer** - Galaktosylierung in Abhängigkeit vom Alter.

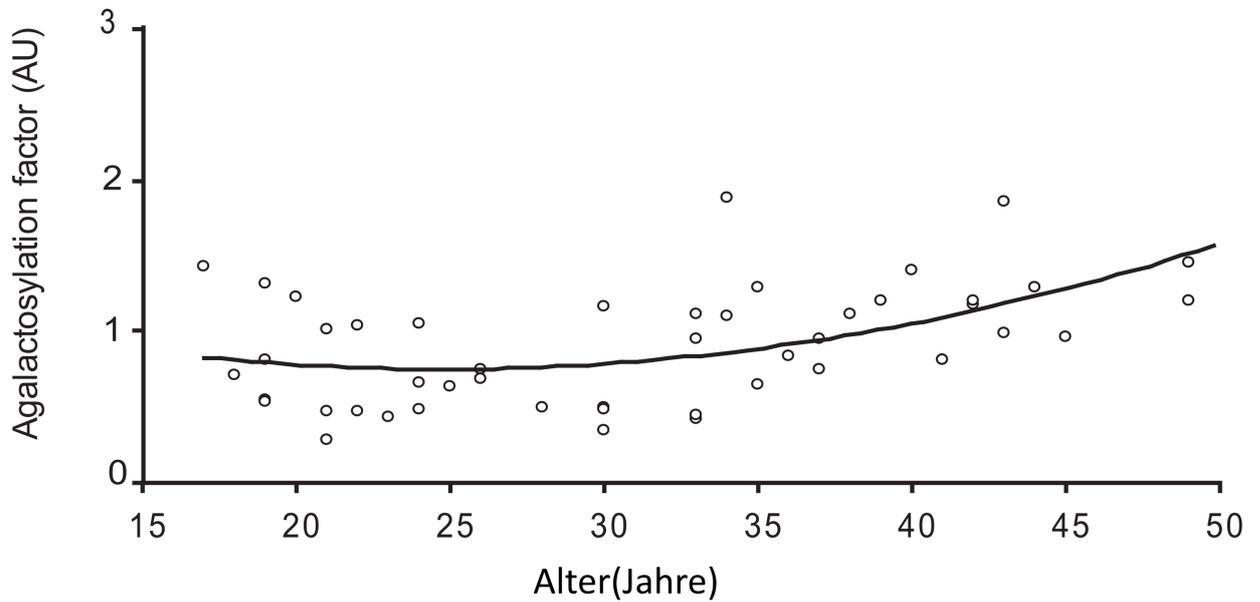


Abbildung 6.3: **Frauen** - Galaktosylierung in Abhängigkeit vom Alter.

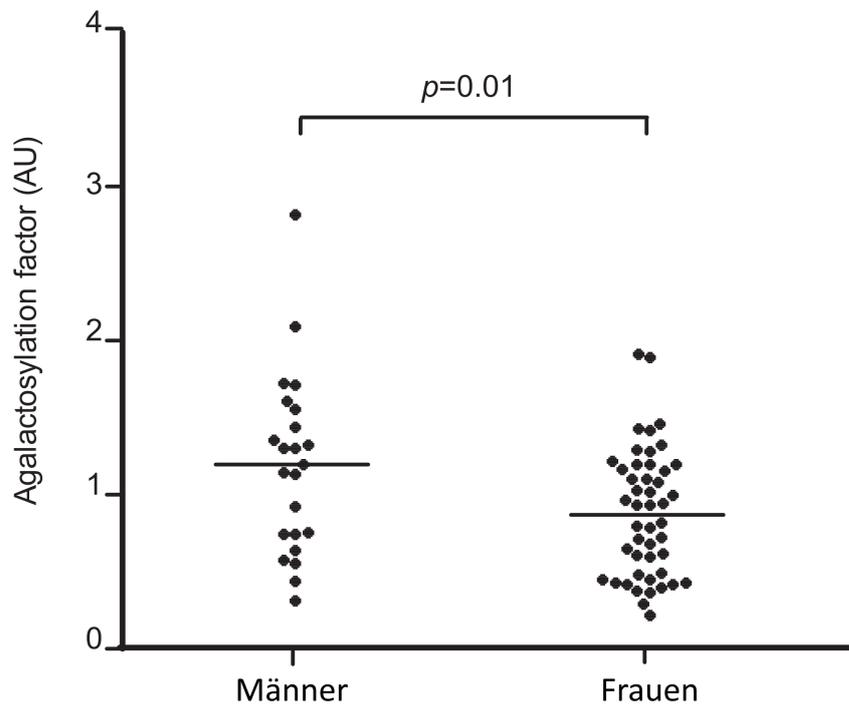


Abbildung 6.4: Galaktosylierung von Männern und Frauen im Vergleich. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen (1.2 ± 0.12 für Männer und 0.89 ± 0.05 für Frauen; $p = 0.01$).

6.2 Galaktosylierung: Vergleich von MS-Gruppe und Kontrollgruppe

6.2.1 Liquor cerebrospinalis

Eine der wichtigsten Fragestellungen dieser Arbeit war es, die Galaktosylierung von IgG bei Patienten, die an Multipler Sklerose leiden, mit der von gesunden Menschen zu vergleichen. Um diese zu beantworten, wurde der Liquor von zwei nach Alter und Geschlecht vergleichbaren Gruppen (siehe Tabelle 6.2) untersucht.

Der AF war in der Gruppe der MS-Patienten signifikant höher als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 6.5; der mittlere AF der Kontrollgruppe wurde aufgrund von Darstellungszwecken auf 1 gesetzt, mittlerer AF der MS-Gruppe 1,6; $p < 0,003$).

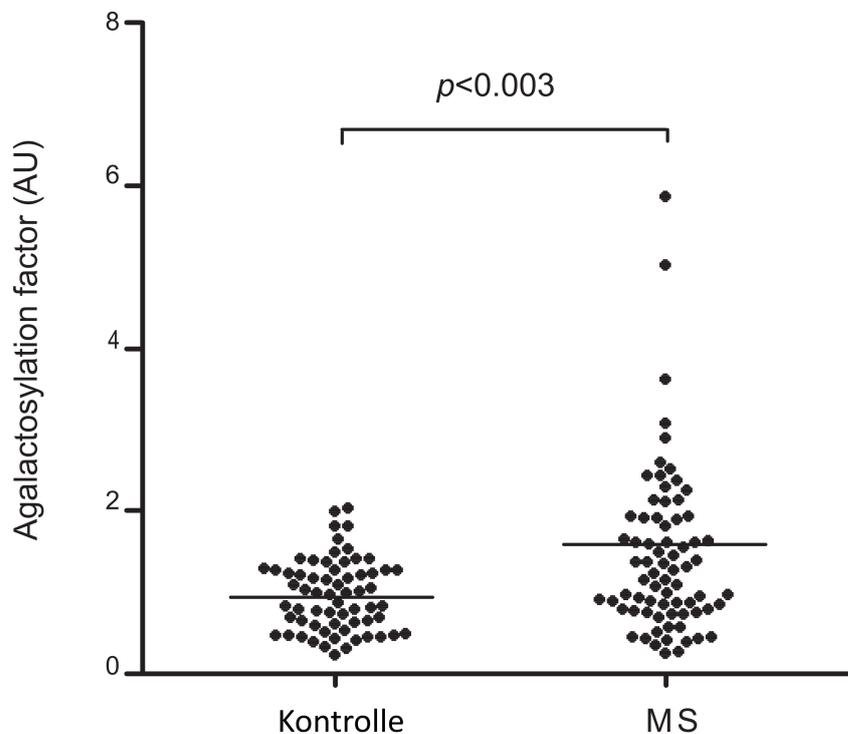


Abbildung 6.5: Unterschiede bei der Galaktosylierung von **Liquorproben** anhand des AF, von Kontrollgruppe (n=64) und Patienten mit Multipler Sklerose (n=74). (Der AF der Kontrollgruppe wurde zu Vergleichszwecken auf 1 gesetzt. Der Mittelwert für die MS-Gruppe beträgt 1,6)

Die ROC (Receiver Operating Characteristic)-Kurvenanalyse wird in Abbildung 6.6 dargestellt. Ein AF von 1,5 war in der Lage, bei einer Spezifität von 90% und einer Sensitivität von 40% zwischen MS-Patienten und Kontrollen zu unterscheiden.

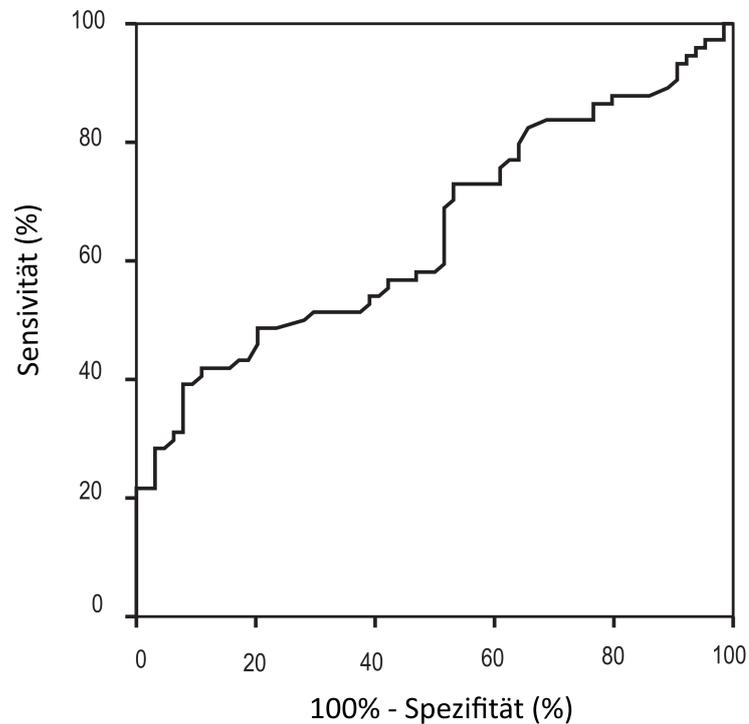


Abbildung 6.6: Receiver operating characteristic (ROC) Kurve für den AF von IgG aus **Liquorproben**. Bei einem Schwellenwert für den **AF von 1,5** beträgt die Spezifität 90% und die Sensitivität 40% für die Unterscheidung zwischen MS-Gruppe und Kontrollgruppe.

	Gruppe MS	Kontrollgruppe
Anzahl gesamt	74	64
Anzahl Männer	22	18
Anzahl Frauen	52	46
Mittelwert (Alter in Jahren)	31,2	31,9
Standardabweichung	1,1	1,1

Tabelle 6.2: Darstellung der Verteilung der **Liquorproben** von Probanden nach Geschlecht und Alter in der MS-Gruppe sowie der Kontrollgruppe.

6.2.2 Serum

Im nächsten Schritt wurde das Serum untersucht, um herauszufinden, ob sich auch hier ein Unterschied bezüglich des AF zwischen den beiden Gruppen zeigen würde. Hierzu wurden ebenfalls zwei nach Alter und Geschlecht vergleichbare Gruppen gebildet (siehe Tabelle 6.3) und das IgG aus Serum isoliert und untersucht.

Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied im AF zwischen diesen Gruppen (siehe Abbildung 6.7).

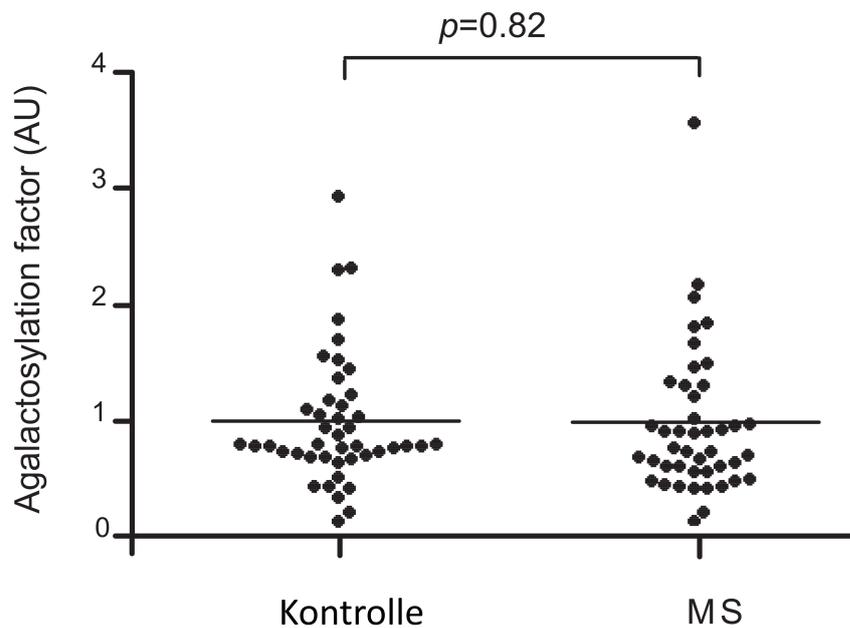


Abbildung 6.7: Vergleich der Galaktosylierung von **Serumproben** anhand des AF, von Kontrollgruppe (n=44) und Patienten mit Multipler Sklerose (n=44). Es war kein Unterschied erkennbar ($p=0,82$).

	Gruppe MS	Kontrollgruppe
Anzahl gesamt	44	44
Anzahl Männer	13	15
Anzahl Frauen	31	29
Mittelwert (Alter in Jahren)	25,3	25,9
Standardabweichung	0,8	0,8

Tabelle 6.3: Darstellung der Verteilung der **Serumproben** von Probanden nach Geschlecht und Alter in der MS-Gruppe sowie der Kontrollgruppe.

6.3 Zusammenhang von Galaktosylierung im Liquor cerebrospinalis mit klinischen Parametern und Laborparametern

6.3.1 Intrathekale IgG-Synthese und klinische Parameter

Im Weiteren wurden die Konzentrationen von Albumin und Immunglobulin G im Serum und im Liquor der Individuen bestimmt und der intrathekale Anteil von IgG errechnet. Der AF korrelierte signifikant mit der intrathekalen IgG-Synthese (Spearman's $\rho = 0,4116$; $p < 0,002$).

Auch die oligoklonalen Banden in Serum und Liquor der Probanden wurden bestimmt und in Typen eingeteilt (nach Andersson et al. [6], siehe Tabelle 6.4). Der AF war um 70% höher ($p = 0,005$) bei Patienten mit den Typen 2 und 3, im Vergleich zu Patienten mit den Typen 1, 4 und 5. Dieser Sachverhalt wird in der Abbildung 6.8 dargestellt.

Es wurde auch die Zellzahl im Liquor bei den Patienten mit Multipler Sklerose untersucht. Die Untersuchung ergab bei Patienten mit mehr als 4 Leukozyten pro μl Liquor eine signifikante Reduktion der Galaktosylierung von IgG ($p = 0,039$; siehe Abbildung 6.9).

Typ 1	Keine Banden in Liquor und Serum
Typ 2	Oligoklonale IgG-Banden im Liquor, nicht im Serum
Typ 3	Oligoklonale Banden im Liquor und zusätzlich identische oligoklonale Banden im Liquor und Serum
Typ 4	Übereinstimmende oligoklonale Bandenmuster in Liquor und Serum
Typ 5	Monoklonales Bandenmuster in Liquor und Serum

Tabelle 6.4: oligoklonale Banden: Typen (nach Andersson et al. [6])

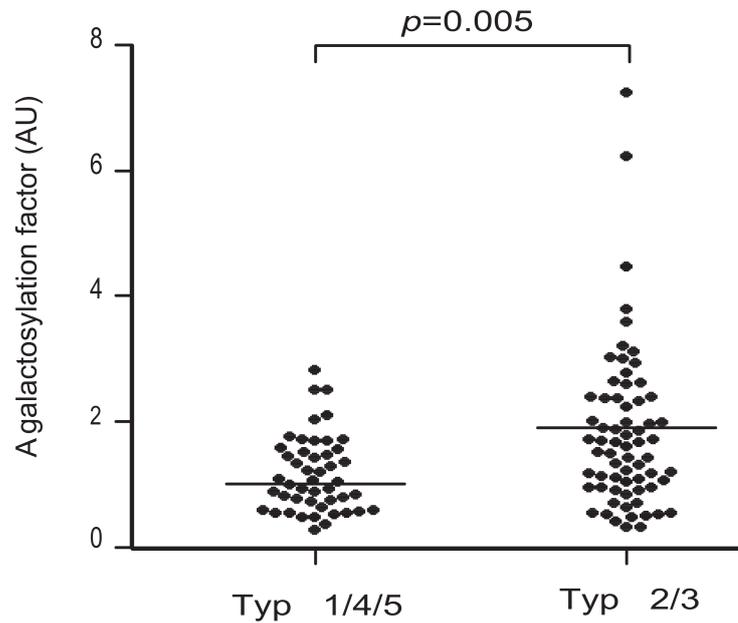


Abbildung 6.8: Vergleich des AF bei Patienten, die Anzeichen für intrathekale IgG-Synthese aufweisen (Oligoklonale Banden Typen 2 und 3) mit Patienten, die keine Anzeichen dafür haben (Oligoklonale Banden Typen 1, 4 und 5).

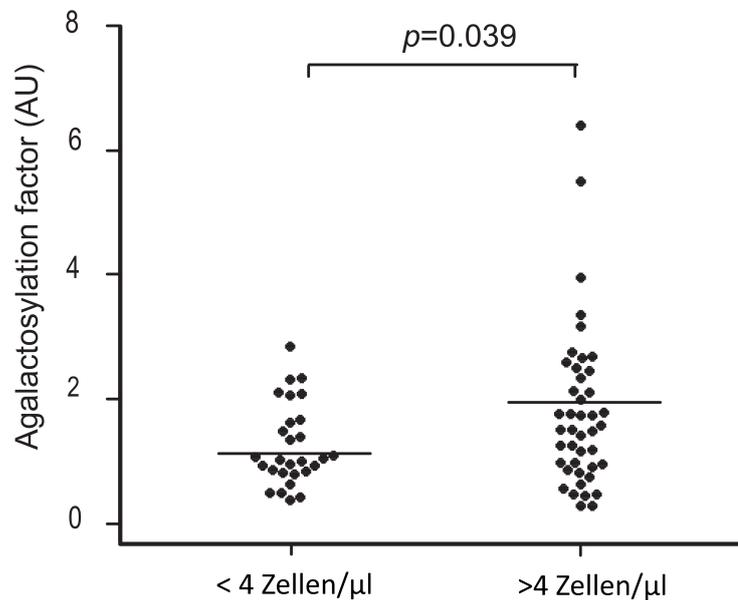


Abbildung 6.9: Vergleich des AF bei MS-Patienten mit weniger als 4 Zellen pro μ l Liquor, mit Patienten mit 4 oder mehr Zellen pro μ l Liquor. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,039$).

6.3.2 Progression von MS

Bei 30 Patienten mit Multipler Sklerose wurden über eine Zeitspanne von über einem Jahr klinische Daten über die Krankheitsaktivität erhoben (mittels ermittelter Veränderung des EDSS über die Zeit).

Das Fortschreiten der Krankheit wurde als Δ -EDSS pro Jahr quantifiziert, bei den Liquorproben zeigte dieses eine starke Korrelation mit dem AF der Patienten (Spearman's $\rho = 0,81$; $n = 15$, $p = 0,0002$, siehe Abbildung 6.10).

Eine Analyse des Receiver Operating Characteristic (ROC) zeigte sich, dass ein AF von über 1,6 im Liquor mit einer Sensitivität von 89% und einer Spezifität von 60% eine Progression des EDSS von über 0,25 Punkten pro Jahr vorhersagte (siehe Abbildung 6.11). Dies heißt im Umkehrschluss, dass ein AF von unter 1,6 einen hohen negativ prädiktiven Wert für eine Progression des EDSS von mehr als 0,25 Punkte im Jahr liefern konnte.

Eine Analyse von AF und EDSS zum Zeitpunkt der Liquorpunktion zeigte keine Korrelation. Ebenso wurde keine Korrelation zwischen AF und der Anzahl von Gadolinium-anreichernden Läsionen im MRT festgestellt.

Zwischen den verschiedenen Subtypen der Multiplen Sklerose (RRMS, PPMS, SPMS; siehe Kapitel 4.1.4) und dem klinisch isolierten Syndrom (CIS) konnten von uns keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Allerdings schien der AF bei Patienten mit CIS niedriger zu sein (siehe Abbildung 6.12).

Typ	mittlerer AF	Anzahl(n)
klinisch isoliertes Syndrom (CIS)	0,83	9
schubförmige Verlaufsform ('relapsing-remitting', RRMS)	1,54	33
primär progrediente Verlaufsform (PPMS)	1,75	2
sekundär progrediente Verlaufsform (SPMS)	1,62	8

Tabelle 6.5: Vergleich des mittleren AF bei den Gruppen der verschiedenen MS-Subtypen und dem klinisch isolierten Syndrom sowie die Darstellung der jeweiligen Gruppengröße.

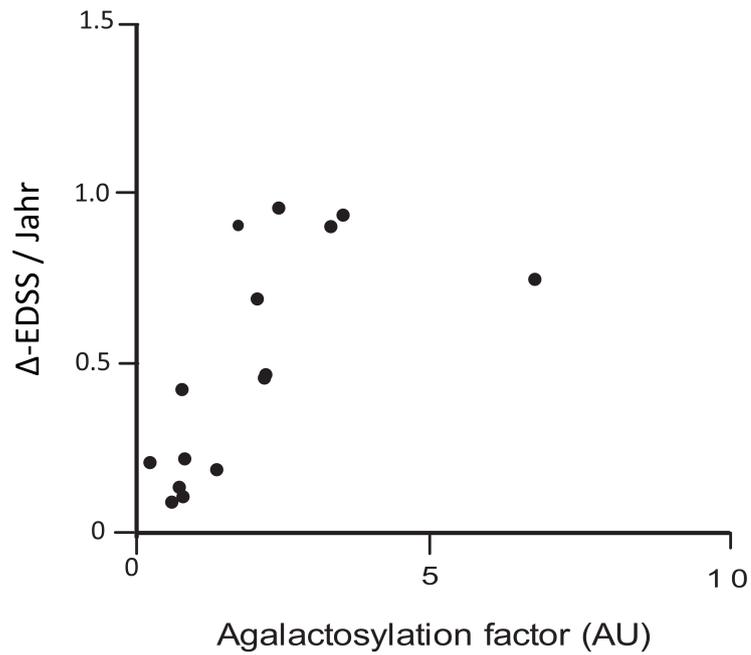


Abbildung 6.10: Darstellung des AF abhängig von der Progression der Erkrankung anhand der Veränderung auf der EDSS-Skala pro Jahr.

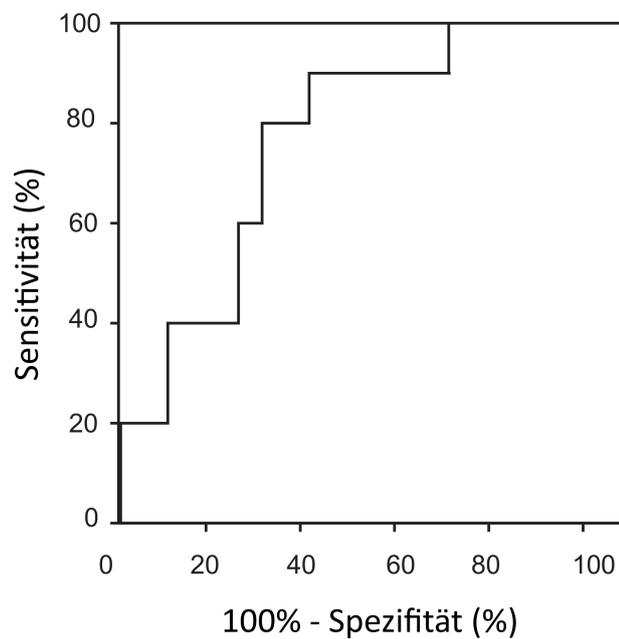


Abbildung 6.11: Receiver operating characteristic (ROC) Kurve für den AF. Der Schwellenwert von 1,6 sagt mit 89% Sensitivität und 60% Spezifität eine Progression auf der EDSS-Skala um mindestens 0,25 pro Jahr voraus.

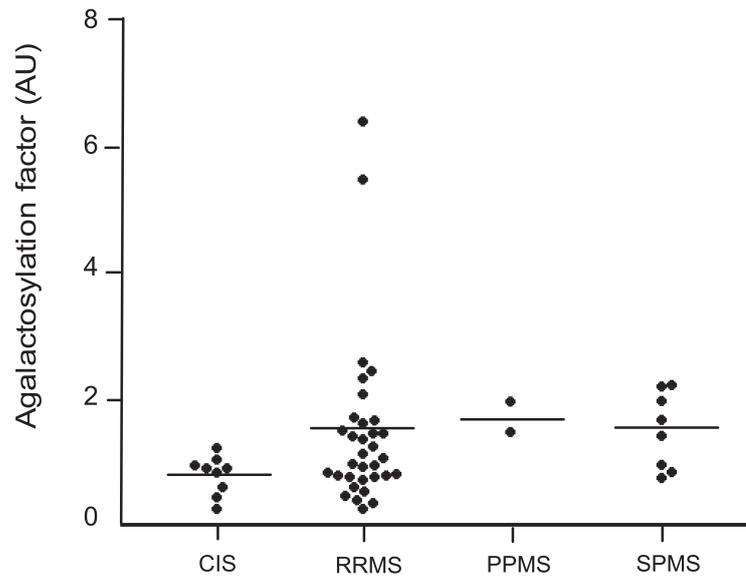


Abbildung 6.12: Vergleich des AF bei den verschiedenen Subtypen der Multiplen Sklerose (das klinisch isoliertes Syndrom (CIS), die schubförmige Verlaufsform ('relapsing-remitting', RRMS), die primär progrediente Verlaufsform (PPMS), und sekundär progrediente Verlaufsform (SPMS)).

6.4 Galaktosylierung bei Patienten mit viraler Meningitis

Als nächstes galt es zu untersuchen, ob die gefundenen Änderungen der Galaktosylierung von IgG speziell bei der Multiplen Sklerose vorkommen oder ob diese auch bei anderen entzündlichen Veränderungen des ZNS zu finden sind.

Dazu wurden Serum und Liquor von Patienten mit viraler Meningitis auf die gleiche Weise untersucht und mit einer nach Alter und Geschlecht gepaarten Kontrollgruppe verglichen. Es konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede im AF, weder im Serum ($p = 0,45$) noch im Liquor ($p = 0,40$), festgestellt werden (siehe Abbildungen 6.13 und 6.14).

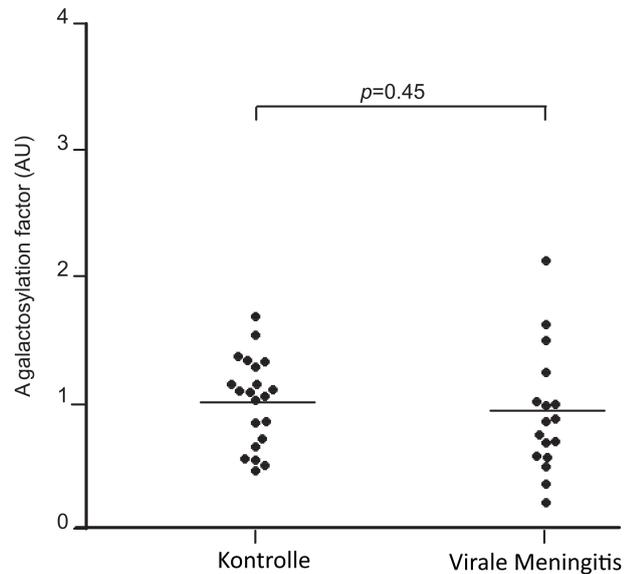


Abbildung 6.13: Vergleich der **Serumproben** von Patienten einer Kontrollgruppe mit Proben von Patienten mit viraler Meningitis. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Mittelwerte: 1 ± 0.08 und 0.92 ± 0.11 ; $p = 0.45$).

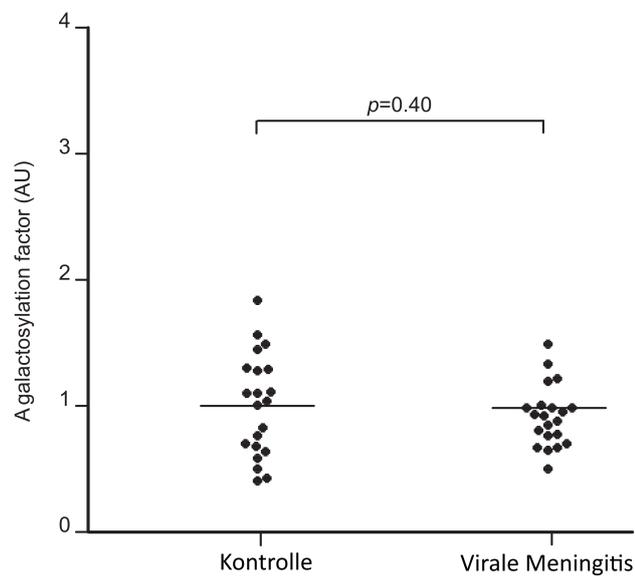


Abbildung 6.14: Vergleich der **Liquorproben** von Patienten einer Kontrollgruppe mit Proben von Patienten mit viraler Meningitis. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Mittelwerte: 1 ± 0.08 und 0.93 ± 0.05 ; $p = 0.40$).

6.5 Sialinisierung im Serum: Vergleich von MS-Gruppe und Kontrollgruppe

Zusätzlich wurde der Fragestellung nachgegangen, ob die Sialinisierung von IgG, also die Anwesenheit von endständiger Sialinsäure an der Asn-297-Bindungsstelle, sich bei Patienten mit Multipler Sklerose von einem gesunden Probandenkollektiv unterscheidet. Da nur eine geringe Menge an Liquorproben für die gesamten Experimente zu Verfügung stand, war nicht mehr ausreichend Probenmaterial vorhanden, um die Sialinisierung im Liquor zu untersuchen. Deswegen wurden bei der Untersuchung von Sialinisierung ausschließlich mit Serumproben gearbeitet. Es wurden zwei nach Alter und Geschlecht vergleichbare Gruppen (siehe Tabelle 6.6) untersucht.

Es wurde für den Vergleich das Verhältnis der Absorptionswerte von den Lektinen SNA-I und GSL-II (SNA-I / GSL-II) berechnet. Ein höherer Wert spricht also für eine größere Anzahl endständige Sialinsäure-Reste im Bezug zu Sialinsäure-freien Bindungsstellen. Das berechnete Verhältnis für die Kontrollgruppe wurde aus Anschauungsgründen im Mittel auf 1,0 gesetzt.

Es zeigte sich, dass das Verhältnis SNA-I / GSL-II in der Gruppe der MS-Patienten signifikant höher war, als in der Kontrollgruppe (siehe Abb 6.15; Mittelwert für die MS-Gruppe war 2,55, $p < 0,004$).

Die ROC-Kurvenanalyse zeigte, dass ein Verhältniswert von 2,0 in der Lage war, bei einer Spezifität von 91% und einer Sensitivität von 45% zwischen MS-Patienten und Kontrollgruppe zu unterscheiden (siehe Abbildung 6.16).

	Gruppe MS	Kontrollgruppe
Anzahl gesamt	33	33
Anzahl Männer	9	10
Anzahl Frauen	24	23
Mittelwert (Alter in Jahren)	24,7	25,4
Standardabweichung	4,6	5,1

Tabelle 6.6: Darstellung der Verteilung der Liquorproben von Probanden nach Geschlecht und Alter in der MS-Gruppe sowie der Kontrollgruppe für die Untersuchung auf Sialinisierung.

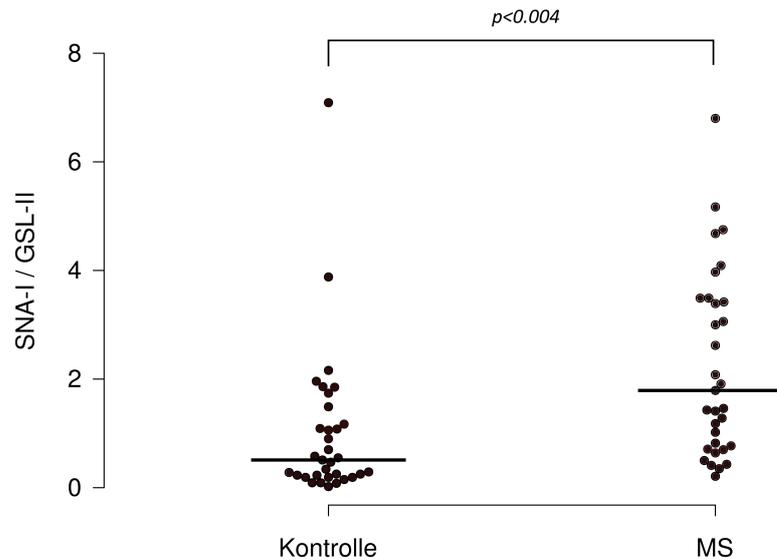


Abbildung 6.15: Unterschiede der Sialinisierung von **Serumproben** anhand des Verhältnisses SNA-I / GSL-II, von Kontrollgruppe (n=33) und Patienten mit Multipler Sklerose (n=33). (Das mittlere Verhältnis SNA-I / GSL-II der Kontrollgruppe wurde zu Vergleichszwecken auf 1 gesetzt. Der Mittelwert für die MS-Gruppe beträgt 2,6.)

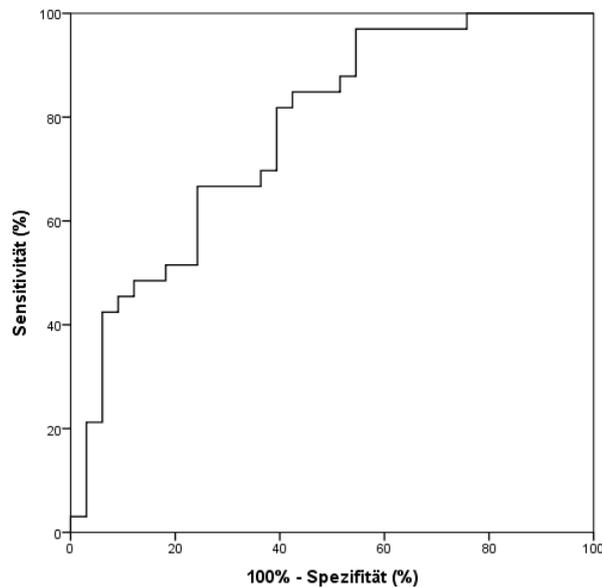


Abbildung 6.16: Receiver operating characteristic (ROC) Kurve für das Verhältnis SNA-I / GSL-II von IgG aus Serumproben. Bei einem Schwellenwert für das Verhältnis SNA-I / GSL-II von **2,0** beträgt die Spezifität 91% und die Sensitivität 45% für die Unterscheidung zwischen MS-Gruppe und Kontrollgruppe.

6.5.1 Zusammenhang von Sialinisierung mit der intrathekalen IgG-Synthese und klinischen Parametern

Es zeigte sich eine Korrelation des Verhältnisses SNA-I / GSL-II zur intrathekalen IgG-Synthese (Spearman's $\rho = 0,455$; $p < 0,03$). Im Gegensatz zur Galaktosylierung (Zur Erinnerung: der AF entspricht Verhältnis GSL-II / RCA-I) ist eine erhöhte Sialinisierung von IgG im Serum mit einer erhöhten intrathekalen IgG-Synthese assoziiert.

Bei dem Vergleich der Typen von oligoklonalen Banden zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen Typ 2/3 und Typ 1/4/5.

Auch konnte kein Unterschied bezüglich der Sialinisierung von IgG im Serum im Zusammenhang mit der Leukozytenzahl im Liquor gezeigt werden.

6.5.2 Zusammenhang mit der Progression von MS

Zur Progression der Krankheit (Δ -EDSS) waren in der Stichprobe keine ausreichenden Daten bekannt.

In der Stichprobe waren nur Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS) und der schubförmigen Verlaufsform der Multiplen Sklerose (RRMS), jedoch keine mit progredienten Verlaufsformen (PPMS oder SPMS). Zwischen den Gruppen CIS und RRMS zeigten sich keine Unterschiede im Verhältnis SNA-I / GSL-II.

7 Diskussion

Veränderungen bei der Glykosylierung von Immunglobulinen wurden bereits in vielen systemischen Krankheiten und Autoimmunkrankheiten festgestellt. Die vollständigen pathophysiologischen Einflüsse sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. [1]

7.1 Die Glykosylierung von IgG ist bei MS-Patienten verändert

In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es auch bei Patienten mit Multipler Sklerose, einer chronischen inflammatorischen Erkrankung des Zentralnervensystems, Unterschiede bezüglich der Glykosylierung der Antikörper im Vergleich mit gesunden Individuen gibt.

Des Weiteren gibt die Arbeit Hinweise darauf, dass die Veränderung der Glykosylierung in manchen Fällen nicht generalisiert auftritt, sondern sich auf einzelne Kompartimente des Körpers beschränkt.

Es konnte eine um 60% niedrigere Galaktosylierung der IgG im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten beobachtet werden. Eine Korrelation mit Zeichen von Krankheitsaktivität (wie die Anzahl von Gadolinium-anreichernde Läsionen im MRT oder der EDSS) zum Zeitpunkt der Liquorentnahme konnte nicht beobachtet werden.

Allerdings fand sich eine Korrelation sowohl mit einer Pleozytose im Liquor (als Hinweis auf ein potentiell aggressives Milieu [30]), als auch mit der Zunahme des EDSS über die Zeit. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine Veränderung der Galaktosylierung von IgG mit einem aktiveren Verlauf der Multiplen Sklerose assoziiert ist. Ähnliche Resultate wie diese konnten schon bei der rheumatoiden Arthritis gezeigt werden. [2]

Zusätzlich konnte die Arbeit zeigen, dass auch die Sialinisierung der IgG im Serum von Patienten mit Multipler Sklerose sich von derer von einer gesunden Population unterscheidet. Im Gegensatz zur Galaktosylierung zeigt diese jedoch einen umgekehrten Trend. Während die Galaktosylierung von IgG abnimmt - jedoch nur im Liquor, nicht aber im Serum von

MS-Patienten, nimmt die Sialinisierung - zumindest im Serum der Patienten - zu. Dieses Resultat kam unerwartet, denn die Galaktosylierung von IgG im Serum zeigte keinerlei messbaren Unterschied. Möglicherweise könnte es sich um einen Kompensationsmechanismus des Organismus handeln - als Reaktion auf erhöhte inflammatorische Reaktionen im ZNS, um einer Überaktivierung von inflammatorischen Prozessen in anderen Kompartimenten des Körpers vorzubeugen.

Leider hat die Quantität an gewonnenen IgG aus Liquorproben in dieser Arbeit nicht gereicht, um der Fragestellung nachzugehen, ob die Sialinisierung auch im Liquor cerebrospinalis verändert ist.

7.2 Die Glykosylierung von IgG ist nicht verändert bei Patienten mit viraler Meningitis

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die beobachteten Veränderungen bei MS-Patienten auch bei anderen Patienten mit einer Entzündung im ZNS und einer erhöhten IgG-Zahl im Liquor gefunden werden können. Für diese Fragestellung schienen Patienten mit viraler Meningitis gut geeignet. Bei diesen Patienten jedoch konnten keine Veränderungen bezüglich der Galaktosylierung ihrer IgG festgestellt werden, weder im Serum dieser Patienten noch im Liquor.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zusammengefasst darauf hin, dass weder Inflammation noch intrathekale IgG-Synthese als solche ein bedeutender Faktor für die Regulation der Galaktosylierung von IgG im Liquor cerebrospinalis sind. Dies stimmt überein mit bisherigen Erkenntnissen, wonach die Reduktion von IgG-Galaktosylierung sich auf bestimmte Krankheiten beschränkt und sich nicht auf inflammatorische Störungen verallgemeinern lässt. [27]

7.3 Veränderte Glykosylierung kann zu aggressiverem Milieu führen

Veränderungen der Glykosylierung an der Asn297-Bindungsstelle von IgG-Fc-Fragmenten können durch Steigerung der Inflammation zu pathogenen Effekten im Körper führen. [22] Während endständige Sialinsäure und Galaktose eher anti-inflammatorische Effekte zu haben scheinen, ist das Fehlen dieser eher pro-inflammatorisch (siehe Abbildung 7.1). [50]

Beispielsweise führt der Transfer von mit β -Galaktosidase behandelten IgG im Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis zu einem ausgeprägteren Ausbruch der Krankheit, was

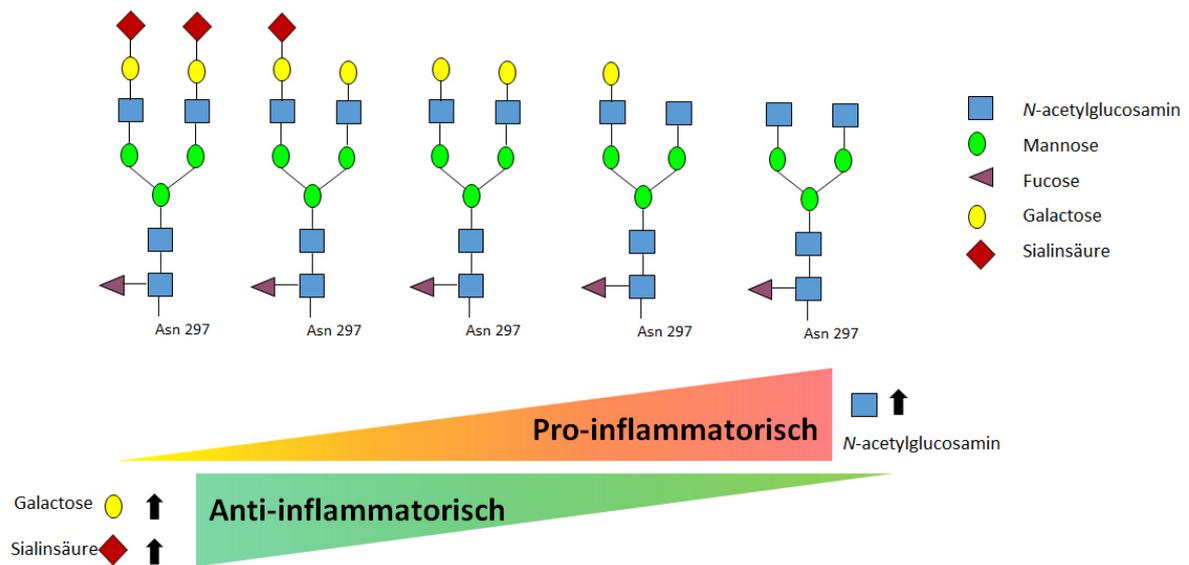


Abbildung 7.1: Effekte auf Inflammationspotential von IgG in Abhängigkeit der Glykosylierung. (Darstellung nach Maverakis et al. [50])

die Pathogenität von agalaktosylierten Antikörpern unterstreicht. [73] Passend dazu ist bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Lupus erythematodes höhere Konzentrationen an agalaktosyliertem IgG festzustellen. [68, 81]

Auch andere Mechanismen dafür, wie veränderte Glykosylierung zu Inflammation beitragen können, wurden beschrieben. So wurde etwa gezeigt, dass die Entfernung von endständiger Galaktose auf IgG zu einer stärkeren Aktivierung des Komplementsystems führt. Dies wird erreicht über die erhöhte Bindungsfähigkeit der IgG zu C1q, dem initialen Protein des Komplementsystems. [48, 67] Das Fehlen von endständiger Galaktose führt desweiteren zu besserem Zugang zu mittiger liegenden Mannose-Resten in den Glykanstrukturen und so zu erhöhter Affinität von Mannose-bindenden Lektin(MBL). [10] Ebenso wird die Affinität von IgG zu $Fc\gamma R$ von Veränderung der Galaktosylierung der Antikörper beeinflusst. [7] Folglich konnte gezeigt werden, dass sowohl die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität sowie die antikörperabhängige Phagozytose verstärkt sind. [54, 79]

Ob die Veränderungen der Glykosylierung aus dem inflammatorischen Milieu entstehen oder es verursachen, kann bisher nicht beantwortet werden. Glykosylierung von Proteinen kann relativ kurzfristig und ohne Ausbruch von Krankheit verändert sein. [12, 13] Andererseits können inflammatorische Zytokine Veränderung der Glykosylierung auslösen. [24] Weitere Forschung ist nötig, um dieser Frage auf den Grund zu gehen.

Die Aggressivität des Milieus scheint bei der Multiplen Sklerose vom jeweiligen Kompar-

timent abzuhängen. Während im Liquor cerebrospinalis (stehend für das Kompartiment ZNS) ein aggressiveres immunologisches Milieu zu herrschen scheint, deuten die Erkenntnisse dieser Arbeit auf ein anti-inflammatorisches Milieu im Blut hin. Ob möglicherweise ein Kompensationsmechanismus dahinter steckt, wird nur weitere Forschung zeigen können. Denkbar ist auch eine Verwendung von Glykosylierung von IgG als Marker, gegebenenfalls auch von prognostischem Wert. Galaktosylierung als spezifische Veränderung im Liquor cerebrospinalis aber auch Sialinisierung als Veränderung im Serum - und daher deutlich weniger invasiv in der Probengewinnung - könnten in diesem Zusammenhang von Nutzen sein. Auch dies wird möglicherweise durch weitere Forschung beantwortet werden können.

7.4 Methodik

In der Literatur ist beschrieben, dass nicht nur das Fc-Fragment von Immunglobulin G Bindungsstellen für Glykane aufweist, sondern auch 15-25% der Fab-Fragmente Glykane beherbergen. [16]

Störungen der Regulierung von IgG-Galaktosylierung wurden am besten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie in der Schwangerschaft untersucht. Dabei wurden auch Fab- und Fc-Fragmente für sich betrachtet. Es stellte sich heraus, dass die beobachtete niedrigere Galaktosylierung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zum weitaus größten Teil auf den Veränderungen am Fc-Fragment beruhen. [60, 88]

Bei Frauen in der Schwangerschaft wurden, im Vergleich zu der Zeit post partum, höhere Galaktosylierung des Fc-Fragmentes im Serum beobachtet. Auch hier wurden jedoch so gut wie keine Veränderungen der Galaktosylierung des Fab-Fragmentes gesehen. Vielmehr wurde in allen Phasen der Schwangerschaft und auch danach eine komplette Galaktosylierung der Fab-Fragmente beobachtet. [16]

Die Veränderungen der Galaktosylierung von IgG scheinen sich also fast ausschließlich am Fc-Fragment abzuspielen. Auch wenn die Methodik dieser Arbeit also die Möglichkeit offen lässt, dass die gemessenen Veränderungen bei Patienten mit Multipler Sklerose sich auch am Fab-Fragment abspielen könnten, halte ich es für äußerst unwahrscheinlich. Fab-Fragmente sind in nur 15-25% der Fälle glykosyliert, und dann auch nur an den variablen Domänen. Im Gegensatz dazu ist die Bindungsstelle am Fc-Fragment hochkonserviert und an jeder schweren Kette zu finden. [7]

Die Methode, die in dieser Arbeit verwendet wurde, um die Glykosylierung der Antikörper zu untersuchen, war das sogenannte Lektin-Bindungsassay. Die Methode ist wohlerprobt

und wurde schon häufig für derartige Untersuchungen verwendet (siehe Tabelle 4.2 auf S.21 sowie [15, 38, 89]). Bei der Erarbeitung unserer Methodik wurde sich zu weiten Teilen an der Arbeit von Pasek et al. [64] orientiert. Die Methodik ist erprobt und weder zeit- noch kostenintensiv und führt dennoch zu aussagekräftigen Ergebnissen.

Eine weitere, ebenfalls gut untersuchte Methode ist die Massenspektroskopie. [38] Auch diese Methode wurde schon in mehreren Publikationen für die Untersuchung von Glykosylierung auf IgG genutzt (siehe ebenfalls Tabelle 4.2 auf S.21). Diese Methode kann im gleichen Untersuchungsschritt nicht nur die endständigen Glykanstrukturen analysieren, sondern den kompletten Aufbau dieser Strukturen wiedergeben. Jedoch ist diese Methode (bzw. die benötigten Gerätschaften) vergleichsweise teuer und daher nur von spezialisierten Laboren durchführbar. Da es zu Beginn der Versuche für diese Arbeit noch keine Daten zu Patienten mit MS und der Glykosylierung der IgG gab, erschien uns der Lektin-Bindungsarray als die beste Methode für die Erlangung erster Daten. Für weitergehende Untersuchungen muss die Wahl der Analysemethode nochmals evaluiert werden.

In dieser Arbeit wurden IgG auf endständige Galaktose-Reste sowie Sialinsäure-Reste bzw. deren Fehlen (und damit die endständigen GlcNAc-Reste) analysiert. Die Glykane am Fc-Teil von IgG sind Strukturen mit zwei Antennen, die an bestimmten Stellen variabel sind (siehe dazu Kapitel 4.2.3 sowie Abbildung 4.3). Abgesehen von der endständigen Galaktose und Sialinsäure gibt es noch andere Moleküle, die in der Vergangenheit untersucht worden sind.

Beispielsweise führt das Entfernen von stammnahen Fucose-Resten zu einer besseren Bindung an bestimmte Fc-Rezeptoren [70], die Aktivierung des Komplementsystems scheint dabei jedoch insgesamt erniedrigt zu sein. [32]

Es ist gewiss weitere Forschung nötig, um die Rolle der einzelnen Glykanreste sowie ihr Zusammenspiel im Zusammenhang mit der Multiplen Sklerose genauer zu erkunden.

7.5 Einordnung und Relevanz der Arbeit in den Kontext bekannter wissenschaftlicher Erkenntnisse

Multiple Sklerose ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Demyelinisierung von Markscheiden im Zentralnervensystem charakterisiert ist. Eine Reihe von pathologischen Prozessen, welche die Inflammation unterstützen, wurde bereits ermittelt. Dazu gehören die Präsenz von Antikörpern gegen Myelinproteine, autoreaktive T-Zellen sowie erhöhte Aktivierung von

NF- κ B. [29, 33, 46] Passend dazu fanden sich in dieser Untersuchung proinflammatorische Glykosylierungsmuster im Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten.

Wuhrer et. al. untersuchten ebenfalls die Glykosylierung von IgG bei Patienten mit Multipler Sklerose. [85] Dabei wurde als Untersuchungsmethode die Massenspektroskopie verwendet. Bezüglich der Galaktosylierung von IgG bei Patienten mit Multipler Sklerose in Liquor und Serum kamen Wuhrer et. al. zum gleichen Ergebnis, wie es unsere Untersuchungen zeigten: Auch hier wurden Unterschiede der Galaktosylierung von IgG im Liquor von MS-Patienten gemessen. Ebenso zeigten die Untersuchungen keinen Unterschied bezüglich der Galaktosylierung von IgG im Serum der Patienten. Die Daten zeigten einen Trend zu einer erhöhten Sialinisierung von IgG im Serum von MS-Patienten, passend den Ergebnissen dieser Arbeit. Ebenso zeigte sich ein Trend zu erniedrigter Sialinisierung von IgG im Liquor von MS-Patienten.

Eine andere, unabhängige Untersuchung des selben Sachverhaltes, unter Verwendung einer anderen Methodik, kam also zum gleichen Ergebnis, welches die Experimente dieser Arbeit gezeigt haben. Dies trägt einen sehr großen Teil zur Glaubwürdigkeit und Richtigkeit der hier gezeigten Ergebnisse bei.

Weitere Forschung ist notwendig, um zu klären, ob Glykosylierung und insbesondere die Galaktosylierung von IgG bei der Pathophysiologie der Multiplen Sklerose eine signifikante Rolle spielen wird. Möglicherweise wird die Verwendung als Marker zur Erkennung von Intensität und/oder Aggressionspotential der Krankheit oder auch in Behandlungsstrategien in Zukunft möglich sein.

8 Literaturverzeichnis

1. Abès R, Teillaud JL (2010) Impact of Glycosylation on Effector Functions of Therapeutic IgG. *Pharmaceuticals* 3:146–158
2. Albrecht S, Unwin L, Muniyappa M, Rudd PM (2014) Glycosylation as a marker for inflammatory arthritis. *Cancer Biomarkers* 14:17–28
3. Alvarez K, Haswell C, St. Clair M et al. (2002) Sequences of the mouse N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) mRNA and an mRNA expressed by an Mgat5-deficient cell line. *Glycobiology* 12:389–394
4. Aminoff D, Bruegge WF, Bell WC, Sarpolis K, Williams R (1977) Role of sialic acid in survival of erythrocytes in the circulation: interaction of neuraminidase-treated and untreated erythrocytes with spleen and liver at the cellular level. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:1521–1524
5. Amzel LM, Poljak RJ (1979) Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins. *Annual Review of Biochemistry* 48:961–997
6. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G et al. (1994) Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57:897–902
7. Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV (2012) Novel roles for the IgG Fc glycan. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1253:170–80
8. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual review of immunology* 25:21–50
9. Ascherio A, Munger K (2007) Environmental Risk Factors for Multiple Sclerosis. Part I: The Role of Infection. *Yearbook of Neurology and Neurosurgery* 61:288–99
10. Banda NK, Wood AK, Takahashi K et al. (2008) Initiation of the alternative pathway of murine complement by immune complexes is dependent on N-glycans in IgG antibodies. *Arthritis and Rheumatism* 58:3081–3089

11. Barnett MH, Parratt JDE, Cho ES, Prineas JW (2009) Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Annals of Neurology* 65:32–46
12. Bilen O, Altun Z, Arslan N, Onvural B, Akan P, Coker C (2014) The effect of malnutrition on protein glycosylation in children. *Iranian Journal of Pediatrics* 24:273–279
13. Biol MC, Martin A, Louisot P (1992) Nutritional and developmental regulation of glycosylation processes indigestive organs. *Biochimie* 74:13–24
14. Bond A, Alavi A, Axford JS, Youinou P, Hay FC (1996) The relationship between exposed galactose and N-acetylglucosamine residues on IgG in rheumatoid arthritis (RA), juvenile chronic arthritis (JCA) and Sjögren’s syndrome (SS). *Clinical and experimental immunology* 105:99–103
15. Bond A, Alavi A, Axford JS et al. (1997) A detailed lectin analysis of IgG glycosylation, demonstrating disease specific changes in terminal galactose and N-acetylglucosamine. *Journal of autoimmunity* 10:77–85
16. Bondt A, Rombouts Y, Selman MHJ et al. (2014) Immunoglobulin G (IgG) Fab Glycosylation Analysis Using a New Mass Spectrometric High-throughput Profiling Method Reveals Pregnancy-associated Changes. *Molecular & Cellular Proteomics* 13:3029–3039
17. Brynedal B, Wojcik J, Esposito F et al. (2010) MGAT5 alters the severity of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 220:120–124
18. Büdingen HC von, Bar-Or A, Zamvil SS (2011) B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Current opinion in immunology* 23:713–20
19. Compston A, Coles A (2002) Multiple sclerosis. *The Lancet* 359:1221–1231
20. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *The Lancet* 372:1502–1517
21. Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M (2002) Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *Journal of neurology* 249:375–89
22. Dall’Olio F, Vanhooren V, Chen CC, Slagboom PE, Wuhrer M, Franceschi C (2013) N-glycomic biomarkers of biological aging and longevity: a link with inflammaging. *Ageing research reviews* 12:685–98
23. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW (2001) Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409:733–9
24. Dewald J, Colomb F, Bobowski-Gerard M, Groux-Degroote S, Delannoy P (2016) Role of Cytokine-Induced Glycosylation Changes in Regulating Cell Interactions and Cell Signaling in Inflammatory Diseases and Cancer. *Cells* 5:43

25. Dubé R, Rook Ga, Steele J et al. (1990) Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: correlation with C-reactive protein. *Gut* 31:431–434
26. Dwek RA, Lellouch AC, Wormald MR (1995) Glycobiology: 'the function of sugar in the IgG molecule'. *Journal of anatomy* 187:279–92
27. Dwek RA (1996) Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical reviews* 96:683–720
28. Dymant DA, Dessa Sadnovich A, Ebers GC (1997) Genetics of multiple sclerosis. *Human Molecular Genetics* 6:1693–1698
29. Egg R, Reindl M, Deisenhammer F, Linington C, Berger T (2001) Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 7:285–289
30. Eisele P, Szabo K, Griebel M, Wolf ME, Hennerici MG, Gass A (2014) Cerebrospinal fluid pleocytosis in multiple sclerosis patients with lesions showing reduced diffusion. *Multiple Sclerosis* 20:1391–1395
31. Filippi M, Rocca MA (2011) MR imaging of multiple sclerosis. *Radiology* 259:659–81
32. Gasdaska JR, Sherwood S, Regan JT, Dickey LF (2012) An afucosylated anti-CD20 monoclonal antibody with greater antibody-dependent cellular cytotoxicity and B-cell depletion and lower complement-dependent cytotoxicity than rituximab. *Molecular Immunology* 50:134–141
33. Goldenberg MM (2012) Multiple sclerosis review. *P & T* 37:175–84
34. Ha S, Ou Y, Vlasak J et al. (2011) Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology* 21:1087–1096
35. Hafler DA (2004) Science in medicine Multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* 113:788–794
36. Hein T, Hopfenmüller W (2000) Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Der Nervenarzt* 71:288–294
37. Hodoniczky J, Yuan ZZ, James DC (2005) Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnology Progress* 21:1644–1652
38. Huhn C, Selman MHJ, Ruhaak LR, Deelder AM, Wuhrer M (2009) IgG glycosylation analysis. *Proteomics* 9:882–913

39. Kahana E, Zilber N, Abramson JH, Biton V, Leibowitz Y, Abramsky O (1994) Multiple sclerosis: genetic versus environmental aetiology: epidemiology in Israel updated. *Journal of Neurology* 241:341–346
40. Kaneko Y (2006) Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science* 313:670–673
41. Koch-Henriksen N, Sørensen PS (2010) The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology* 9:520–532
42. Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–1444
43. Kurtzke JF (2005) Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America* 16:327–49
44. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H (2016) Mechanisms of disease: The human N-glycome. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1860:1574–1582
45. Lee SU, Grigorian A, Pawling J et al. (2007) N-glycan processing deficiency promotes spontaneous inflammatory demyelination and neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry* 282:33725–33734
46. Leibowitz SM, Yan J (2016) NF- κ B Pathways in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and the Therapeutic Implications. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9:84
47. Lublin FD, Reingold SC, Cohen Ja et al. (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83:278–86
48. Malhotra R, Wormald MR, Rudd PM, Fischer PB, Dwek RA, Sim RB (1995) Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature medicine*
49. Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM (2010) A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature chemical biology* 6:713–23
50. Maverakis E, Kim K, Shimoda M et al. (2015) Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. *Journal of Autoimmunity* 57:1–13
51. Miller DH, Filippi M, Fazekas F et al. (2004) Role of magnetic resonance imaging within diagnostic criteria for multiple sclerosis. *Annals of neurology* 56:273–8
52. Milo R, Kahana E (2010) Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmunity Reviews* 9:A387–A394

53. Moore JS, Wu X, Kulhavy R et al. (2005) Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals. *AIDS (London, England)* 19:381–389
54. Nakajima S, Iijima H, Shinzaki S et al. (2011) Functional analysis of agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease patients. *Inflammatory bowel diseases* 17:927–36
55. National Research Council. (2012) *Transforming Glycoscience*. National Academies Press:1–155
56. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 343:938–952
57. Nylander A, Hafler DA (2012) Review series Multiple sclerosis. *Journal of clinical Investigation* 122:1180–1188
58. Obermeier B, Mentele R, Malotka J et al. (2008) Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nature medicine* 14:688–93
59. Ohmi Y, Ise W, Harazono A et al. (2016) Sialylation converts arthritogenic IgG into inhibitors of collagen-induced arthritis. *Nature Communications* 7
60. Parekh RB, Dwek RA, Rademacher TW (1988) Rheumatoid arthritis as a glycosylation disorder. *British journal of rheumatology* 27 Suppl 2:162–9
61. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ et al. (1985) Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316:452–457
62. Parekh R, Roitt I, Isenberg D, Dwek R, Rademacher T (1988) Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *The Journal of experimental medicine* 167:1731–6
63. Parekh R, Isenberg D, Rook G, Roitt I, Dwek R, Rademacher T (1989) A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. *Journal of autoimmunity* 2:101–114
64. Pasek M, Duk M, Podbielska M (2006) Galactosylation of IgG from rheumatoid arthritis (RA) patients—changes during therapy. *Glycoconjugate journal* 23:463–471
65. Patel D, Guo X, Ng S et al. (2010) IgG isotype, glycosylation, and EGFR expression determine the induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro by cetuximab. *Human Antibodies* 19:89–99

66. Pertersen G (2014) Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland. *Nervenarzt* 85:990–998
67. Peschke B, Keller CW, Weber P, Quast I, Lünemann JD (2017) Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. *Frontiers in Immunology* 8:646
68. Pilkington C, Yeung E, Isenberg D, Lefvert AK, Rook GAW (1995) Agalactosyl igg and antibody specificity in rheumatoid arthritis, tuberculosis, systemic lupus erythematosus and myasthenia gravis. *Autoimmunity* 22:107–111
69. Polman CH, Reingold SC, Banwell B et al. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology* 69:292–302
70. Pulendran B, Katsikis PD, Schoenberger SP, Hrsg. (2011) Crossroads between Innate and Adaptive Immunity III. Bd. 780. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY: Springer New York
71. Quast I, Keller CW, Maurer MA et al. (2015) Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation* 125:4160–4170
72. Radaev S, Sun PD (2001) Recognition of IgG by Fcγ receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 276:16478–83
73. Rademacher TW, Williams P, Dwek RA (1994) Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:6123–7
74. Saldova R, Royle L, Radcliffe CM et al. (2007) Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology* 17:1344–1356
75. Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cai AN, Raju TS (2007) Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular Immunology* 44:1524–1534
76. Schroeder HW, Cavacini L (2010) Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125:S41–S52
77. Sharon N, Lis H (1989) Lectins as cell recognition molecules. *Science* 246:227–234
78. Shields RL, Lai J, Keck R et al. (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 277:26733–26740

79. Thomann M, Schlothauer T, Dashivets T et al. (2015) In vitro glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *PLoS one* 10:e0134949
80. Tintoré M, Rovira A, Río J et al. (2008) Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 70:1079–1083
81. Tomana M, Schrohener RE, Koopman WJ, Alarcán GS, Paul WA (1988) Abnormal glycosylation of serum IgG from patients with chronic inflammatory diseases. *Arthritis & Rheumatism* 31:333–338
82. Tourtellotte WW, Potvin AR, Fleming JO et al. (1980) Multiple sclerosis: measurement and validation of central nervous system IgG synthesis rate. *Neurology* 30:240–4
83. Tsuchiya N, Endo T, Yoshinoya S et al. (1993) Detection of Glycosylation Abnormality in Rheumatoid. *Journal of immunology* 151:1137–1146
84. Walsh MJ, Tourtellotte WW, Roman J, Dreyer W (1985) Immunoglobulin G, A, and M-Clonal restriction in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum—Analysis by two-dimensional electrophoresis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 35:313–327
85. Wuhrer M, Selman MHJ, McDonnell LA et al. (2015) Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation* 12:235
86. Xue J, Zhu LP, Wei Q (2013) IgG-Fc N-glycosylation at Asn297 and IgA O-glycosylation in the hinge region in health and disease. *Glycoconjugate journal* 30:735–45
87. Yamada E, Tsukamoto Y, Sasaki R, Yagyu K, Takahashi N (1997) Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconjugate journal* 14:401–5
88. Youings A, Chang SC, Dwek RA, Scragg IG (1996) Site-specific glycosylation of human immunoglobulin G is altered in four rheumatoid arthritis patients. *Biochem J* 314 (Pt 2:621–630
89. Zeben D van, Rook Ga, Hazes JM et al. (1994) Early agalactosylation of IgG is associated with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis: results of a follow-up study. *British journal of rheumatology* 33:36–43

9 Abbildungsverzeichnis

4.1	Schematische vereinfachte Darstellung der verschiedenen Immunglobulinklassen	16
4.2	Schematische vereinfachte Darstellung von Immunglobulin G und seiner Glykosylierungsstellen an Asn-297	17
4.3	Vereinfachte Darstellung der Glykanstrukturen an der Stelle Asn-297 und ihrer möglichen Variationen	18
6.1	Darstellung der Galaktosylierung anhand des AF (agalactosylation factor) in Relation zum Alter der Probanden	30
6.2	Männer - Galaktosylierung in Abhängigkeit vom Alter	30
6.3	Frauen - Galaktosylierung in Abhängigkeit vom Alter	31
6.4	Galaktosylierung von Männern und Frauen im Vergleich	31
6.5	Unterschiede bei der Galaktosylierung von Liquorproben anhand des AF, von Kontrollgruppe und Patienten mit Multipler Sklerose	32
6.6	Receiver operating characteristic (ROC) Kurve für den AF von IgG aus Liquorproben	33
6.7	Vergleich der Galaktosylierung von Serumproben anhand des AF, von Kontrollgruppe und Patienten mit Multipler Sklerose	34
6.8	Vergleich des AF bei Patienten, die Anzeichen für intrathekale IgG-Synthese aufweisen (Oligoklonale Banden Typen 2 und 3) mit Patienten, die keine Anzeichen dafür haben (Oligoklonale Banden Typen 1, 4 und 5).	36
6.9	Vergleich des AF bei MS-Patienten mit weniger als 4 Zellen pro µl Liquor, mit Patienten mit 4 oder mehr Zellen pro µl Liquor	36
6.10	Darstellung des AF abhängig von der Progression der Erkrankung anhand der Veränderung auf der EDSS-Skala pro Jahr.	38
6.11	Receiver operating characteristic (ROC) Kurve für den AF. Der Schwellenwert von 1,6 sagt mit 89% Sensitivität und 60% Spezifität eine Progression auf der EDSS-Skala um mindestens 0,25 pro Jahr voraus.	38
6.12	Vergleich des AF bei den verschiedenen Subtypen der Multiplen Sklerose . .	39

6.13 Vergleich der Serumproben von Patienten einer Kontrollgruppe mit Proben von Patienten mit viraler Meningitis	40
6.14 Vergleich der Liquorproben von Patienten einer Kontrollgruppe mit Proben von Patienten mit viraler Meningitis	40
6.15 Unterschiede der Sialinisierung von Serumproben anhand des Verhältnisses SNA-I / GSL-II, von Kontrollgruppe und Patienten mit Multipler Sklerose .	42
6.16 Receiver operating characteristic (ROC) Kurve für das Verhältnis SNA-I / GSL-II von IgG aus Serumproben	42
7.1 Effekte auf Inflammationspotential von IgG in Abhängigkeit der Glykosylierung. (Darstellung nach Maverakis et al. [50])	46

10 Publikationen

Decker Y, Schomburg R, Németh E, Vitkin A, Fousse M, Liu Y, Fassbender K. (2016) Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis Journal* 22:1794-1803

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

