

Aus dem Institut für Neuroanatomie
(Prof. Dr. med. J. Staiger)
im Zentrum Anatomie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Identifikation und Analyse von
Interaktionen Erreger-spezifischer
Antikörper mit Proteinen des fötalen
Gehirns**

Eine immunologische Grundlage für die Entstehung
schizophrener Erkrankungen?

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Aaron David Kleine

aus
Neustadt an der Aisch

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. B. Reuss

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. A. R. Asif

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. rer. nat. B. Reuss

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. A. R. Asif

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. Ralf Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 11.07.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Identifikation und Analyse von Interaktionen Erreger-spezifischer Antikörper mit Proteinen des fötalen Gehirns - Eine immunologische Grundlage für die Entstehung schizophrener Erkrankungen?“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Kleine AD, Reuss B (2021): Interactions of Antibodies to the Gram-Negative Gastric Bacterium *Helicobacter pylori* with the Synaptic Calcium Sensor Synaptotagmin 5, Correlate to Impaired Vesicle Recycling in SiMa Human Neuroblastoma Cells. *J Mol Neurosci* 71, 481–505

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Schizophrene Erkrankungen und Entstehungs-Hypothesen.....	1
1.1.1 Die Diagnose Schizophrenie	2
1.1.2 Die Entstehung einer schizophrenen Erkrankung	3
1.1.3 Schizophrenie durch „geliehene“ Auto-Immunität	4
1.1.4 Molekulare Mimikry	7
1.2 Spezifische Infektions-Erreger	8
1.2.1 <i>Borrelia burgdorferi</i>	9
1.2.2 <i>Campylobacter jejuni</i>	10
1.2.3 <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.2.4 <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.3 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Primär-Antikörper.....	15
2.1.2 Sekundär-Antikörper	16
2.1.3 HEK293-Überexpressions-Lysate.....	16
2.1.4 Reagenzien.....	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Identifizierung immunreaktiver Interaktions-Partner Erreger-spezifischer Antikörper mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mit Hilfe des <i>hexSelect</i> -Multiprotein-Arrays	17
2.2.2 Western-Blot-Analyse	19
2.2.3 Zwei-Dimensionale Gel-Elektrophorese (2D-Gel-Elektrophorese)	20
2.2.4 Zell-Kultur.....	20
2.2.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	21
2.2.6 Messung des Neuriten-Längen-Wachstums.....	23
2.2.7 FM1-43-Vesikel-Umsatz-Test	23
2.2.8 Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assay	24
2.2.9 MTT-Zell-Vitalitäts-Test.....	24
2.2.10 β -Hexosaminidase-Degradations-Test.....	25
2.2.11 Kern-Zytoplasma-Verhältnis Toluidin Blau gefärbter und mit <i>Compound 48/80</i> stimulierten RBL-2H3-Zellen.....	27
2.2.12 Untersuchung des Einflusses der Mast-Zell-Degranulation auf die subzelluläre Lokalisation von CPLX2 durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	28
2.2.13 Ki-67-Zell-Proliferations-Test.....	29
2.2.14 Mitose-Figuren-Zählung	29

2.2.15	ERBB3-Phosphorylierungs-Assay	30
2.2.16	Epitop-Kartierung mittels <i>Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0</i> und <i>DiscoTope 2.0</i> der <i>Immune Epitope Database</i>	30
2.2.17	Statistische Auswertung.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Identifizierung immunreaktiver Interaktionen der Antiseren gegen <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> und <i>Toxoplasma gondii</i> mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels <i>hEXselect</i> -Multiprotein-Array	32
3.1.1	Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen <i>Borrelia burgdorferi</i>	33
3.1.2	Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen <i>Campylobacter jejuni</i>	35
3.1.3	Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen <i>Helicobacter pylori</i>	39
3.1.4	Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen <i>Toxoplasma gondii</i>	43
3.2	Bestätigung ausgewählter immunreaktiver Interaktions-Partner der Antiseren gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Helicobacter pylori</i> und <i>Toxoplasma gondii</i> anhand von Über-Expressions-Lysaten spezifisch transfizierter-HEK293-Zellen	45
3.2.1	Western-Blot-Analyse mit transfizierten HEK293-Überexpressions-Zell-Lysaten.....	46
3.2.2	Nachweis der Expression ausgewählter Proteine in verschiedenen Zell-Linien.....	46
3.2.3	Untersuchung der Expression identifizierter Interaktions-Partner Erreger-spezifischer Antiseren in den Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D durch ein- und zwei-dimensionale Western-Blot-Analyse	48
3.2.4	Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit RBL-2H3-, SiMa-, SH-SY5Y- und T-47D-Zellen	50
3.3	Messung des Neuriten-Längen-Wachstums von mit Antiseren gegen ASTN2 und <i>Helicobacter pylori</i> behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen	51
3.4	FM1-43-Vesikel-Umsatz-Test mit SiMa- und SH-SY5Y-Zellen	54
3.5	Untersuchung von Effekten Erreger-spezifischer Antikörper auf Acetylcholin-abhängige intrazelluläre Kalzium-Signale in SiMa-Zellen mit dem Kalzium-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3-AM	57
3.6	Immunfluoreszenz-Intensität des Neuroblastom-Zell-Markers Tyrosin-Hydroxylase in SiMa-Zellen	60
3.7	MTT-Zell-Vitalitäts-Test mit RBL-2H3-, SiMa-, SH-SY5Y- und T-47D-Zellen	62
3.8	Untersuchungen zum Effekt von Antikörpern gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> und CPLX2 auf die Exozytose-Aktivität von RBL-2H3-Zellen, anhand eines β -Hexosaminidase-Degranulations-Tests.....	64
3.9	Untersuchungen zum Effekt von Antikörpern gegen <i>Toxoplasma gondii</i> auf die Exozytose-Aktivität durch Bestimmung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses an Toluidin Blau-gefärbten und mit <i>Compound 48/80</i> stimulierten RBL-2H3-Zellen	67
3.10	Fluoreszenz-Mikroskopische Untersuchung des Einflusses eines Antiserums gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> und <i>Toxoplasma gondii</i> auf Expression und subzelluläre Lokalisation von CPLX2 in mit <i>Compound 48/80</i> stimulierten RBL-2H3-Zellen.....	69
3.11	Ki-67-Zell-Proliferations-Test mit SH-SY5Y- und T-47D-Zellen.....	72
3.12	Auszählung der Mitosefiguren von DAPI-gefärbten SH-SY5Y- und T-47D-Zellen als weitere Methode zur Bestimmung der Proliferationsrate	74
3.13	ERBB3-Phosphorylierungs-Assay mit SH-SY5Y- und T-47D-Zell-Lysat	76
3.14	Epitop-Kartierung mittels <i>Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0</i> und <i>DiscoTope 2.0</i> der <i>Immune Epitope Database</i>	78

4	Diskussion.....	81
4.1	Antibakterielle Antikörper als Auslöser von Auto-Immun-Enzephalitiden und ihr Einfluss auf die fötale Gehirnentwicklung.....	81
4.1.1	Die Blut-Hirn-Schranke und ihre Überwindung durch Auto-Antikörper	82
4.2	Neuronale Auto-Antikörper.....	84
4.2.1	Auto-Immun-Enzephalitiden ausgelöst durch Antikörper-Interaktionen mit Membran-Proteinen.....	84
4.2.2	Antikörper-Interaktion mit dem neuronalen Transmembran-Protein ASTN2	85
4.2.3	Antikörper-Interaktion mit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase ERBB3	86
4.3	Interaktion der Antikörper mit intrazellulären Antigenen.....	89
4.3.1	Interaktionen mit intrazellulären synaptischen Proteinen	89
4.3.2	Nicht-spezifische intrazelluläre Aufnahme von IgG-Antikörpern.....	90
4.3.3	Zellulär vermittelte Zytotoxizität	90
4.3.4	Antikörper-Interaktion mit dem synaptischen Protein SYT5.....	91
4.3.5	Antikörper-Interaktion mit dem synaptischen Protein CPLX2.....	92
4.4	Die Rolle des Proteins SSPO in der Genese des Hydrozephalus.....	94
4.5	Effekte einer maternalen Immunantwort auf die fötale Neurogenese und deren Auswirkungen auf die psychische Vulnerabilität.....	95
4.5.1	Immunantwort vermittelt durch komplexe Antikörper-Gemische.....	95
4.5.2	Der maternale Nest-Schutz.....	97
4.5.3	Zerebrale Phänotypen und Gen-Expressionsmuster neuropsychiatrischer Erkrankungen.....	98
4.6	Limitierung der verwendeten Methoden und Materialien	99
4.6.1	Methoden der Proteomik.....	99
4.6.2	Ethische Fragestellungen	99
4.6.3	Die Bedeutung der Verwendung von nicht-menschlichen Antikörpern und <i>in vitro</i> -Experimenten.....	100
5	Zusammenfassung.....	102
6	Literaturverzeichnis	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zur theoretischen Grundlage der Immun-Theorie.....	7
Abbildung 2: <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
Abbildung 3: <i>Campylobacter jejuni</i>	11
Abbildung 4: <i>Helicobacter pylori</i>	12
Abbildung 5: <i>Toxoplasma gondii</i>	13
Abbildung 6: Darstellung der Interaktionen des Antikörpers gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels MPA.....	33
Abbildung 7: Darstellung der Interaktionen des Antikörpers gegen <i>Campylobacter jejuni</i> mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels MPA.....	35
Abbildung 8: Darstellung der Interaktionen des Antikörpers gegen <i>Helicobacter pylori</i> mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels MPA.....	39
Abbildung 9: Darstellung der Interaktionen des Antikörpers gegen <i>Toxoplasma gondii</i> mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels MPA.....	43
Abbildung 10: Western Blot mit ASTN2-transfizierten, CPLX2-transfizierten-, ERBB3-transfizierten- und SYT5-transfizierten HEK-293-Zell-Lysaten	46
Abbildung 11: Interaktion der anti-mikrobiellen-Antikörper mit den Zell-Lysaten der Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D, dargestellt durch Western Blot-Analyse und 2D-Gelelektrophorese.....	48
Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit RBL-2H3-, SiMa-, SH-SY5Y- und T-47D-Zellen	50
Abbildung 13: Messung des Neuriten-Wachstums von nicht-behandelten und mit Anti- <i>Campylobacter jejuni</i> -/ Anti- <i>Helicobacter pylori</i> - und Anti-ASTN2-Antikörper behandelten SiMa-Zellen.....	52
Abbildung 14: FM1-43-Exo/Endozytose-Vesikel-Umsatz-Assay mit nicht-behandelten und mit Antiseren gegen <i>Campylobacter jejuni</i> und <i>Helicobacter pylori</i> vorbehandelten SiMa-Zellen	55
Abbildung 15: FM1-43-Exo/Endozytose-Vesikel-Umsatz-Assay mit unbehandelten und mit Antiseren gegen <i>Helicobacter pylori</i> oder SYT5 vorbehandelten SiMa-Zellen	56
Abbildung 16: Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assay mit unbehandelten und mit Antiseren gegen <i>Campylobacter jejuni</i> und <i>Helicobacter pylori</i> behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen.....	58
Abbildung 17: Statistische Auswertung eines Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assays mit unbehandelten und mit Antiseren gegen <i>Campylobacter jejuni</i> und <i>Helicobacter pylori</i> behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen.....	59
Abbildung 18: Intensitäts-Messung des Enzyms Tyrosin-Hydroxylase in SiMa-Neuroblastom-Zellen.	61
Abbildung 19: MTT-Zell-Vitalitäts-Test mit nicht-behandelten und mit jeweils mit Antiseren gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> und <i>Toxoplasma gondii</i> vorbehandelten RBL-2H3- und SH-SY5Y-Zellen	63
Abbildung 20: β -Hexosaminidase-Freisetzung <i>Compound 48/80</i> stimulierter RBL-2H3-Zellen	65
Abbildung 21: β -Hexosaminidase-Freisetzung <i>Compound 48/80</i> stimulierter RBL-2H3-Zellen	66
Abbildung 22: Messung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses von mit Toluidin Blau gefärbten und mit <i>Compound 48/80</i> stimulierten RBL-2H3-Zellen.	68
Abbildung 23: CPLX2-Intensitäts-Bestimmung Post- <i>Compound 48/80</i> -Stimulation in RBL-2H3-Zellen.....	70
Abbildung 24: Bestimmung der Expression des Proliferations-Markers Ki-67 von SH-SY5Y- und T-47D-Zellen.....	73
Abbildung 25: Statistische Auswertung der Mitose-Figuren-Anzahl pro mm ² in DAPI-gefärbten SH-SY5Y- und T-47D-Zellen.....	75

Abbildung 26: Phosphorylierungs-Assay der Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB3 von behandelten SH-SY5Y- und T-47D-Zellen.....	77
Abbildung 27: Phosphorylierungs-Assay der Rezeptor-Tyrosinkinase ERBB3 von SH-SY5Y- und T-47D-Zellen.....	77
Abbildung 28: Epitop-Kartierung des humanen Proteins ERBB3 mittels <i>Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0</i> und <i>DiscoTope 2.0</i>	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primär-Antikörper.....	15
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Sekundär-Antikörper	16
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten HEK293-Überexpressions-Lysate.....	16
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Reagenzien.....	16
Tabelle 5: Protokoll Immundetektion mittels <i>bEXselect</i> -Multiprotein-Array	18
Tabelle 6: Protokoll Immunfluoreszenz-Mikroskopie	21
Tabelle 7: Protokoll β -Hexosaminidase-Degranulations-Test	26
Tabelle 8: Protokoll Toluidin Blau-Färbung	28
Tabelle 9: Identifizierte Protein-Interaktions-Partner des Anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> -Antikörpers.	33
Tabelle 10: Identifizierte Protein-Interaktions-Partner des Anti- <i>Campylobacter jejuni</i> -Antikörpers	35
Tabelle 11: Identifizierte Protein-Interaktions-Partner des Anti- <i>Helicobacter pylori</i> -Antikörpers	40
Tabelle 12: Identifizierte Protein-Interaktions-Partner des Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> -Antikörpers	44
Tabelle 13: Statistische Auswertung des Neuriten-Wachstums-Tests mit behandelten SiMa- Zellen	53
Tabelle 14: Statistische Auswertung des Neuriten-Wachstums-Tests mit behandelten SiMa- Zellen	53
Tabelle 15: Statistische Auswertung des FM1-43-Exo/Endozytose-Vesikel-Umsatz-Assay mit behandelten SiMa-Zellen.....	56
Tabelle 16: Statistische Auswertung des FM1-43-Exo/Endozytose-Vesikel-Umsatz-Assay mit behandelten SiMa-Zellen.....	57
Tabelle 17: Tabelle 18: Statistische Auswertung des Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assay mit behandelten SiMa-Zellen.....	59
Tabelle 19: Statistische Auswertung des Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assay mit behandelten SiMa- Zellen.	60
Tabelle 20: Statistische Auswertung der Tyrosin-Hydroxylase-Intensität mit behandelten SiMa- Zellen	62
Tabelle 21: Statistische Auswertung des MTT-Zell-Vitalitäts-Tests mit RBL-2H3- und SH- SY5Y-Zellen	64
Tabelle 22: Statistische Auswertung des β -Hexosaminidase-Degranulations-Tests mit RBL- 2H3-Zellen.....	66
Tabelle 23: Statistische Auswertung des Tests zum Zytoplasma-Volumens-Anteil mit Toluidin Blau gefärbten RBL-2H3-Zellen	69
Tabelle 24: Statistische Auswertung des CPLX2-Immunfluoreszenz-Tests von mit <i>Compound</i> <i>48/80</i> stimulierten RBL-2H3-Zellen	71
Tabelle 25: Statistische Auswertung zum Ki-67-Zell-Prolifertations-Tests mit SH-SY5Y- und T-47D-Zellen.....	74
Tabelle 26: Statistische Auswertung zur Mitosefiguren-Rate mit SH-SY5Y- und T-47D-Zellen	76

Abkürzungsverzeichnis

α -Bbu	Anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> -Antikörper
α -Cje	Anti- <i>Campylobacter jejuni</i> -Antikörper
α -Hpy	Anti- <i>Helicobacter pylori</i> -Antikörper
α -Tgo	Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> -Antikörper
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLS	Blut-Liquor-Schranke
BSA	Bovines Serumalbumin
C48/80	<i>Compound 48/80</i>
cDNA	<i>Complementary-DNA</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GAS	Gruppe-A-Streptokokken
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GWAS	<i>Genome-Wide-Association-Study</i>
HPF	<i>High power field</i> (Hauptgesichtsfeld)
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
MPA	<i>hEXselect</i> -Multiprotein-Array
NMO	Neuromyelitis Optica
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
T _H 17	T-Helfer-Zelle Typ 17
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Schizophrene Erkrankungen und Entstehungs-Hypothesen

Psychiatrische Erkrankungen aus dem Spektrum der psychotischen Persönlichkeits-Störungen sind der Menschheit seit langem bekannt. Der Begriff Psychose wurde als psychiatrisches Konzept erstmals 1841 von dem Mediziner Carl Friedrich Canstatt verwendet. Anfang des 20. Jahrhunderts, als die Psychiatrie dann als medizinische Disziplin zunehmend Anerkennung fand, konnten Psychiater wie Emil Kraepelin und Eugen Bleuler das Krankheitsbild weiter präzisieren und ermöglichten es dadurch bei betroffenen Menschen eine eindeutige Diagnose zu stellen (Bürgy 2008). Der von Kraepelin verwendete Begriff der *Dementia praecox* bezog sich dabei auf den für diese Erkrankung typischen intellektuellen Verfall und das vergleichsweise frühe Erkrankungsalter (Kraepelin 1903), während Eugen Bleuler aufgrund der Tatsache, dass die wesentliche Störung der Erkrankten in einer Spaltung des Bewusstseins und der Gesamtpersönlichkeit lag, den Begriff der Schizophrenie einführte (Bleuler 1911).

Über ein Jahrhundert später verwendet man untergliedert in spezifische Diagnosen noch immer den Begriff der Schizophrenie für Menschen, welche an psychotischen Symptomen wie visuelle oder akustische Halluzinationen, wahnhaftem Realitäts-Verlust und Störungen der Ich-Umwelt-Grenze leiden. Mit modernen Pharmakotherapien und psychotherapeutischen Konzepten können die Symptome dieser Erkrankungen zwar gelindert, zum Teil sogar vollständig kontrolliert werden, deren genaue Ätiologie bleibt allerdings bis zum heutigen Tag weitestgehend ungeklärt.

Epidemiologisch geht man davon aus, dass weltweit ca. 1 % der Bevölkerung von Erkrankungen aus dem Spektrum der Schizophrenie betroffen sind. Eine großangelegte Meta-Studie konnte eine mediane Inzidenz von 15,2 pro 100.000 Personen ermitteln, wobei Personen männlichen Geschlechts um den Faktor 1,4 häufiger betroffen waren (McGrath et al. 2008). Erkrankte leiden bis heute trotz moderner und zunehmend optimierter Therapie-Möglichkeiten nicht nur unter den psychotischen Symptomen, sondern ebenfalls an vergesellschafteten Komorbiditäten, den möglichen Nebenwirkungen der Medikation sowie gesellschaftlicher Ausgrenzung, Diskriminierung und wirtschaftlichen Nachteilen (Thornicroft et al. 2009; von Hausswolff-Juhlin et al. 2009). Die Erforschung der genauen Umstände der Entstehung schizophrener Erkrankungen ist daher weltweit unverändert von großer medizinischer und gesellschaftlicher Relevanz.

1.1.1 Die Diagnose Schizophrenie

Die Diagnose Schizophrenie als solche existiert nicht, vielmehr spaltet sie sich in ein breites Spektrum von definierten Diagnosen aus dem Bereich der Schizophrenie, der schizotypen und der wahnhaften Störungen. Nach ICD-10 Codierung umfasst das Spektrum unter anderem die paranoide Schizophrenie, die hebephrene Schizophrenie, die katatone Schizophrenie, die undifferenzierte Schizophrenie, die *Schizophrenia simplex* und sonstige Schizophrenien (DIMDI - ICD-10-GM Version 2013). Im Weiteren werden die Formen des Schizophrenie-Spektrums als schizophrene Erkrankung zusammengefasst. Ihnen allen gemein ist in unterschiedlicher Form, Intensität und Komplexität das Auftreten von psychotischen Symptomen, unterteilt in Negativ- und Positiv-Symptomen, welche in ihrer Zusammensetzung und Ausprägungsform eine spezifische Diagnose-Einteilung zulassen. Positiv-Symptome umfassen eine Veränderung der Gedanken-Wahrnehmung mit empfundenem Lautwerden der Gedanken, Gedanken-Eingebungen oder einem Entzug der Gedanken, sowie einer empfundenen Ausbreitung der Gedanken. Es können auch kommentierende Stimmen wahrgenommen werden und eine Störung der Ich-Umwelt-Grenze auftreten, wobei ein unfreiwilliges Gelangen der Gedanken in die Umwelt empfunden wird und dabei angenommen wird, dass diese Gedanken manipuliert werden könnten. Auch wahnhafte Wahrnehmung im Sinne eines Kontroll-Zwanges von Bewegungen, Tätigkeiten oder Empfindungen können auftreten. Daneben können sich ebenfalls Halluzinationen, welche die verschiedensten Sinnes-Systeme wie das visuelle, das auditorische oder auch das taktile System betreffen, präsentieren. Zu den Negativ-Symptomen gehören eine Verarmung des Sprachumfangs und eine geminderte oder inadäquate emotionale Intensität bis zur Apathie sowie ein damit einhergehender emotionaler und sozialer Rückzug. Funktionell beeinträchtigt diese Erkrankung die allgemeine Kognition, erschwert die Teilhabe am gesellschaftlichen Leben in Bezug auf Berufstätigkeit und Arbeitsleistung und führt zu Schwierigkeiten in der Aufrechterhaltung zwischenmenschlicher Beziehungen (Schultz et al. 2007; Flaum und Schultz 1996; Unger et al. 2018). Je nach Quantität und Qualität der Symptome führt diese Erkrankung zu einem starken Leidensdruck sowohl der Betroffenen als auch der Angehörigen. Doch nicht nur die Lebensqualität der Betroffenen ist stark beeinflusst, auch die Lebenserwartung ist überdurchschnittlich gemindert. Aktuelle Studien zeigen eine weltweite durchschnittliche Lebenserwartung von an Schizophrenie Erkrankten von 66,8 Jahren bei weiblichen und 59,3 Jahren bei männlichen Schizophrenie-Erkrankten. Dies entspricht einer verkürzten Lebenserwartung von 13 bis 15 Jahren. Risikofaktoren, welche diese verkürzte Lebenserwartung erklären können, sind vielfältig. Neben den metabolischen Nebenwirkungen antipsychotischer Medikation ist ein erhöhter Tabak-, Alkohol- und illegaler Drogen-Konsum sowie eine mit weiteren ungesunden Lebensweisen einhergehende Lebens-Gestaltung ausschlaggebend. Auch eine Prädisposition der Betroffenen für kardiovaskuläre oder metabolische Syndrome mindert die erfasste Lebenserwartung. Von besonderer Tragik ist der Effekt der erhöhten Suizidalität der Erkrankten. Das Risiko in suizidaler Absicht zu versterben ist bei an Schizophrenie Leidenden um den Faktor 22 erhöht (Hjorthøj et al. 2017).

1.1.2 Die Entstehung einer schizophrenen Erkrankung

Trotz der langen Bekanntheit und der umfassenden Erforschung dieser neuropsychiatrischen Erkrankung konnte bis heute keine eindeutig zuzuweisende Ursache den komplexen Entstehungs-Prozess der Schizophrenie erklären. Ein anerkanntes Modell zur Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen ist das Vulnerabilitäts-Stress-Modell, welches unabhängig von der genauen Ätiologie, pathologische psychische Kompetenzen und einwirkende Einflüsse auf ein Individuum benennt.

1.1.2.1 Das Vulnerabilitäts-Stress-Modell

Bei dem Vulnerabilitäts-Stress-Modell handelt es sich um ein ätiologisch-pathologisches Konzept, um das Auftreten der Schizophrenie, ebenso wie verschiedener anderer psychiatrischer Erkrankungen zu erklären. Nach diesem Modell muss ein Individuum vulnerabel sein, also eine organische Anfälligkeit besitzen, damit im späteren Verlauf des Lebens Stressoren dazu führen können, dass sich psychische Erkrankungen manifestieren.

In einem interaktiven Modell benennen Nuechterlein und Dawson (1984) dauerhafte Vulnerabilitäts-Merkmale (reduzierte Verarbeitungs-Leistung, autonome Hyper-Reaktivität auf aversive Stimuli, Sozial-Kompetenz-Defizite und defekte *Coping*-Strategien), welche mit Umwelt-Stimuli (soziale Stressoren und nicht-supportiv wirkende soziale Strukturen) in Wechselwirkung treten und in der Folge den psychischen Zustand eines Individuums beeinträchtigen. Ein Zusammenspiel aus Überbeanspruchung der kognitiven Verarbeitungs-Leistung, einer autonomen Übererregbarkeit und eine zunehmend fehlerhafte Verarbeitung sozialer Stimuli kann im Endeffekt zum Auftreten schizophren-psychotischer Symptome führen. Das heißt, dass sich am Ende einer Kette von Ereignissen eine psychiatrische Erkrankung manifestiert.

1.1.2.2 Neuronale Entwicklungs-Hypothese der Schizophrenie

Die entscheidende Frage ist, warum manche Individuen auf unterschiedlich stark ausgeprägte Umwelt-Stressoren dauerhaft adäquat reagieren können, andere aber nicht? Die Grundlage dafür bieten die genannten dauerhaften Vulnerabilitäts-Merkmale bei Erkrankten. Diesen Merkmalen liegen eine gestörte Kognition und Leistung des zentralen Nervensystems (ZNS) zugrunde. Doch wodurch kann eine dauerhafte Leistungs-Beeinträchtigung der zentral-nervösen Funktionen entstehen? Die Erklärung dafür könnte die neuronale Entwicklungs-Hypothese zur Entstehung der Schizophrenie liefern. Diese Hypothese sieht als Grundlage für die Entstehung eine gestörte neuronale Entwicklung des Fötus vor, welche durch schädigende Einflüsse während der Schwangerschaft oder während der Geburt ausgelöst wird (Murray und Lewis 1987).

Hinweise darauf, dass es sich bei der Schizophrenie auch um eine organisch-strukturelle Erkrankung aufgrund einer gestörten Hirn-Entwicklung handelt, stammen unter anderem aus Bild-morphologischen Studien.

1.1.2.3 Gehirn-Anomalien von an Schizophrenie Erkrankten

Es wurden bereits verschiedene zerebrale Bereiche und Funktionen identifiziert, welche sich bei Menschen mit Schizophrenie im Vergleich zu nicht erkrankten Individuen unterscheiden. So konnten Johnstone et al. (1976) mittels Computer-Tomographie einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Vergrößerung der zerebralen Ventrikel bei Menschen mit Schizophrenie und einem schlechteren Abschneiden im Withers- und Hinton-Test für kognitive Leistung nachweisen. Für die Kontroll-Gruppe konnte dabei kein signifikanter Zusammenhang zwischen Ventrikel-Größe und kognitiver Leistung gestellt werden. Anhand moderner bildgebender Verfahren konnten in den letzten Jahrzehnten einige weitere morphologische Anomalien identifiziert werden. So konnte eine signifikante Abnahme des Volumens in präfrontalen, temporalen und occipitalen Regionen des Kortex gemessen werden. Neben gemessenen Volumina können auch andere Parameter signifikante Änderungen im Vergleich zu nicht an Schizophrenie-Erkrankten aufweisen wie z.B. eine verringerte kortikale Dicke im anterioren und posterioren Gyrus cinguli sowie in verschiedenen Bereichen der Inselrinde (Madre et al. 2019). Eine Volumen-Reduktion der grauen Hirn-Substanz konnte bei an Schizophrenie Erkrankten gefunden werden, welche eine erste symptomatische Episode aufwiesen (Bora et al. 2011). Die Volumen-Reduktion in den Regionen fronto-insulärer Kortex, im superioren Gyrus temporalis und im rechten Thalamus fiel bei Menschen mit chronifizierter Schizophrenie am größten aus. Bora et al. (2011) konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer Volumen-Reduktion in kortikalen Regionen und verstärkt auftretenden Negativ-Symptomen finden. Interessanterweise hatten antipsychotische Medikamente keinen Einfluss auf die beobachteten kortikalen Volumina. Neben der grauen Substanz wies aber auch die Myelin-haltige weiße Hirn-Substanz Anomalien auf, für welche reduzierte Volumina bilateral in temporalen Regionen gemessen werden konnten. Im Vergleich zu Menschen mit einer Erst-Episode, zeigten Menschen mit chronischer Schizophrenie zudem eine ausgeprägtere Reduktion der weißen Substanz in fronto-parietalen Regionen, was dafürspricht, dass auch die Dauer der Erkrankung einen Einfluss auf die Dynamik neuronaler Strukturen hat.

Die neuronale Entwicklungs-Hypothese wird ebenfalls durch die Beobachtung unterstützt, dass Kinder, bei denen im späteren Leben eine schizophrene Erkrankung diagnostiziert wird, schon vorab Auffälligkeiten zeigen. So entdeckten Walker et al. (1994) bei der Auswertung von Video-Material aus der Kindheit von an Schizophrenie-Erkrankten, dass diese häufiger neuromotorische Auffälligkeiten zeigten, dabei waren insbesondere Anomalien, welche die linke Körperhälfte betrafen von hoher Signifikanz im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

1.1.3 Schizophrenie durch „geliehene“ Auto-Immunität

Doch welche Mechanismen liegen der neuronalen Entwicklungs-Hypothese zugrunde? Welche Einflüsse müssen wirken, um neuronale Funktionen so zu stören, dass die psychische Gesundheit von Menschen langfristig anfällig für Erkrankungen ist? Aus epidemiologischen und Gen-Assoziations-Studien gehen immer wieder konsistente Ergebnisse hervor, welche

den Schluss nahelegen, dass die grundlegende Ätiologie der schizophrenen Erkrankungen einen immunologischen Hintergrund haben muss.

1.1.3.1 Das Immunsystem als Risikofaktor

So konnten epidemiologische Studien immer wieder maternale Infektionen während der Schwangerschaft als wichtigen Risiko-Faktor für eine später im Nachwuchs auftretende schizophrene Erkrankung identifizieren. Erste Daten für einen solchen Zusammenhang konnte eine finnische Studie liefern, aus welcher hervorgeht, dass Menschen eine höhere Wahrscheinlichkeit aufwiesen eine schizophrene Erkrankung diagnostiziert zu bekommen, falls diese Nachkommen von Müttern waren, welche während der Schwangerschaft eine Influenza-Epidemie von Oktober bis November 1957 in Finnland erlebt hatten. Der signifikante Zusammenhang trat bei Müttern auf, welche sich in diesem Zeitraum im zweiten Trimenon der Schwangerschaft befanden (Mednick 1988). Neuere Studien konnten eine Assoziation zwischen maternalen Infektionen und dem Auftreten psychiatrischer Erkrankungen des Nachwuchses bekräftigen. Bei der systematischen Auswertung populations-basierter Studien konnten Khandaker et al. (2013) einige epidemiologisch relevante Erreger identifizieren, die mit einem erhöhten Schizophrenie-Risiko für den Nachwuchs einhergehen. Dabei konnte eine maternale Infektion mit dem Herpes-Simplex-Virus-2 (HSV-2) mit einem um den Faktor 1,6 bis 2,6 (95 % CI = 1,1-2,3 bzw. 1,4 – 4,6) erhöhten Risiko ermittelt werden (Buka et al. 2008). Auch für eine Infektion mit *Toxoplasma gondii*, einem eukaryotischen einzelligen Parasiten, konnte ein 2,61-fach erhöhtes Risiko identifiziert werden (95 % CI = 1,0 – 6,82) (Brown et al. 2005). Multi-systemische bakterielle Infektionen zeigten sogar ein um den Faktor 2,9 erhöhtes Risiko für das Auftreten von psychotischen Episoden bei den Nachkommen (95 % CI = 1,3 – 5,9) (Lee et al. 2020).

Nicht nur epidemiologische Studien legen die Vermutung nahe, dass Störungen der ZNS-Entwicklung, welche die Vulnerabilität für schizophrene Erkrankungen erhöhen, aus einem immunologischen Prozess resultieren. Die Theorie, dass es sich bei dieser neuropsychiatrischen Erkrankung um einen auto-immunologischen Prozess handeln könnte, wird durch verschiedene Beobachtungen gestützt. Eine schizophrene Erkrankung geht interessanterweise mit einem um 45 % höheren Risiko für Menschen einher, welche selbst oder deren biologische Eltern an einer oder mehreren spezifischen Auto-Immunerkrankungen wie Thyreoiditis, Psoriasis und Typ-1-Diabetes leiden (Eaton et al. 2006).

Auch auf molekularer Ebene sind die Hinweise auf eine immunologische Ätiologie unverkennbar. So konnten Ripke et al. (2014) im Rahmen der *Genome-Wide-Association-Study* (GWAS) den stärksten Zusammenhang zwischen Schizophrenie und Risiko-Gen-Loci in exprimierten Genen von B-Lymphozyten finden, den Antikörper-produzierenden Zellen des erworbenen Immunsystems.

1.1.3.2 Maternale auto-reaktive Antikörper und das fötale Gehirn

Doch wie kann das Immunsystem Einfluss auf die neuronale Entwicklung eines Fötus nehmen? Im Verdacht steht der maternale Nest-Schutz, eine immunologische Schutz-Vorrichtung des maternalen Immunsystems, bei dem Immunglobuline vom Sub-Typ IgG über spezielle Antikörper-Transporter der Plazenta in das Blut des Fötus transferiert werden. Der maternale Nest-Schutz ist ein wichtiger Vorgang, so schützen die gespendeten IgG-Antikörper Föten vor infektiösen Erregern, da diese noch nicht in der Lage sind selbst ausreichend hohe Antikörper-Titer zu erzeugen.

Wie kann bei diesem physiologischen Vorgang eine Gefahr für die fötale Entwicklung entstehen? Zum einen gibt es keine bekannte Selektion, welche IgG-Antikörper die Blut-Plazenta-Schranke überwinden und in das Blut des Fötus übergehen, auch auto-reaktive Antikörper können transferiert werden (Palmeira et al. 2012). Gleichzeitig handelt es sich beim Fötus um einen für das maternale Immunsystem körperfremden Organismus, der auch als fremd erkannt wird und angegriffen werden kann, solange nicht eine ausreichend hohe Toleranz vom maternalen Immunsystem aufrechterhalten wird (Wang et al. 2010).

Die pathologische Wirkung von auto-reaktiven maternalen Antikörpern konnte bereits bei anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen experimentell reproduziert werden. So konnten Brimberg et al. (2016) Hirn-reaktive Antikörper gegen das Protein Caspr2 aus dem Serum von Müttern isolieren, deren Nachwuchs an Erkrankungen aus dem Bereich des Autismus-Spektrums litten. Diese isolierten Antikörper führten nach einer Injektion in trächtige Mäuse dazu, dass der Nachwuchs ebenfalls vergleichbare Auffälligkeiten im Verhalten entwickelte, einhergehend mit neuronalen Anomalien wie einer abnormalen kortikalen Einwicklung des Hirns und einer beeinflussten Entwicklung von Dendriten exzitatorischer Neuronen. Für die Theorie, dass Antikörper an der Genese der Schizophrenie beteiligt sind, spricht auch, dass bei vielen der epidemiologischen Studien zur maternalen Erreger-Exposition, zum Infektions-Nachweis kein direkter Erreger-Nachweis erfolgte, sondern eine Bestimmung der Erreger-spezifischen Antikörper-Titer, insbesondere vom Sub-Typ IgG und IgM.

Warum stellt das fötale ZNS einen Angriffs-Ort für Bestandteile des maternalen Immunsystems dar? Das ZNS stellt im adulten wie auch im fötalen Entwicklungs-Zustand einen immunologisch privilegierten Bereich des Körpers dar. Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) schützt vor dem Eindringen von schädigenden Erregern und Molekülen, aber auch vor potenziell schädigenden Wirkungen des Immunsystems. Sollte diese physiologische Barriere für das Immunsystem überwindbar werden, kann dies teils katastrophale Folgen haben. Ein bedeutender Unterschied zwischen dem maternalen und fötalen ZNS ist, dass die Barriere-Funktion der BHS, welche das entwickelte Hirn-Gewebe im physiologischen Zustand vor dem Eindringen von Immunglobulinen und deren potenziell schädigenden Interaktionen schützt, bei Föten wesentlich fragiler zu sein scheint (Stolp et al. 2005; Stolp und Dziegielewska 2009). So könnte die Permeabilität der fötalen BHS, ähnlich wie bei der adulten BHS, während einer Entzündungs-Reaktion, vermittelt durch Zytokine insgesamt erhöht werden und damit den

Eintritt maternalen Auto-Antikörper in das fötale Gehirn ermöglichen (Platt et al. 2017). Diese könnten dann mit neuronalen Proteinen interagieren und so zu einer Beeinflussung der Entwicklung und Funktion des fötalen ZNS führen.

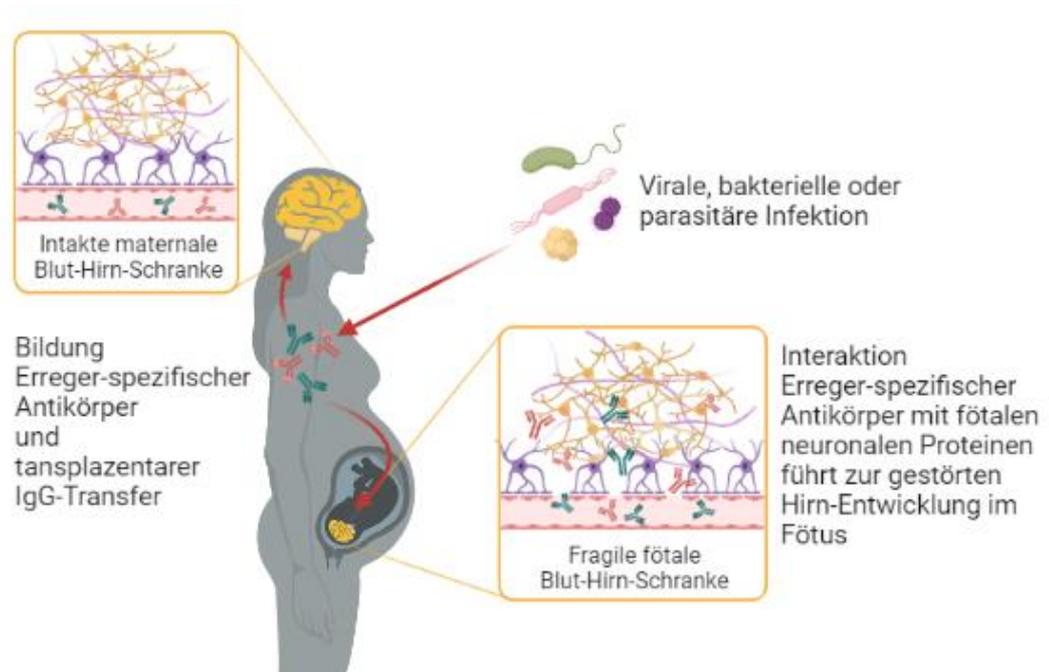


Abbildung 1: Schema zur theoretischen Grundlage der Immun-Theorie; Maternale Erreger-spezifische IgG-Antikörper werden transplazentär in das Blut des Fötus übertragen. Aufgrund einer fragilen fötalen Blut-Hirn-Schranke können auto-reaktive Antikörper mit fötalen Proteinen interagieren und neuronale Funktionen und Entwicklung stören. Das Schema wurde mit BioRender.com erstellt.

Auch im adulten ZNS sind solche Vorgänge zu beobachten. Bei der Auto-Immunerkrankung Neuromyelitis Optica (NMO) kommt es zu einer humoralen und zellulären Auto-Reaktion gegen Astrozyten des Sehnervs, des Gehirns und des Rückenmarks. Grundlage dafür ist die Bildung von Antikörpern vom Sub-Typ IgG gegen astrozytäre Proteine, am häufigsten gegen das Oberflächen-Protein Aquaporin-4 (AQP4). Während AQP4 exprimierende Gewebe außerhalb des ZNS nicht von einer Auto-Immunreaktion betroffen sind, kommt es aufgrund einer fehlenden Komplement-Inhibierung des Immunsystems im ZNS zu einer ausgeprägten Reaktion von Antikörpern, Komplement-Faktoren und Immun-Zellen gegen AQP4-tragende Astrozyten und damit zu einer ausgeprägten Destruktion von neuronalem Gewebe. Betroffene erblinden, zeigen Zeichen einer Querschnittlähmung und versterben nicht selten an dieser Erkrankung (Saadoun und Papadopoulos 2015; Huda et al. 2019).

1.1.4 Molekulare Mimikry

Wie kommt es dazu, dass Antikörper körpereigenes Gewebe als fremd erkennen und in der Folge spezifisch interagieren? Erklären lässt sich dieser Vorgang durch den ko-evolutionären Prozess der molekularen Mimikry. Es handelt sich bei der molekularen Mimikry um eine

Imitation von Strukturen auf molekularer Ebene. Erreger können das Immunsystem unterlaufen, indem sie Oberflächen-Proteine exprimieren, welche den Sequenzen oder Strukturen von Proteinen ihres Wirtes ähneln. Es ist ein Versuch, vom angreifenden Immunsystem möglichst unentdeckt zu bleiben, um sich so möglichst ungestört zu vermehren. Doch das Immunsystem ist in der Lage in einem gewissen Umfang auch Epitope zu erkennen und als körperfremd zu identifizieren, welche Teil dieser Erreger-Proteine sind. Dies ruft wiederum den Umstand hervor, dass vom Immunsystem gebildete reaktive Bestandteile, wie die Immunglobuline, zum Teil auch eine Affinität für jene körpereigenen Proteine besitzen, welche der Erreger versucht zu imitieren. Dies führt in der Folge zu einer auto-immunologischen Kreuz-Reaktion von Immun-Zellen und Antikörpern gegen körpereigenes Gewebe, gebildet aus Zellen, welche die Ziel-Antigene der fehlgeleiteten Immunreaktion exprimieren (Damian 1964; Elde und Malik 2009; Rojas et al. 2018).

Die Existenz eines solchen Mechanismus konnte belegt werden, als Zabriskie und Freimer (1966) den Zusammenhang zwischen rheumatischem Fieber und Gruppe-A-Streptokokken (GAS) untersuchten und dabei auf Antikörper stießen, welche sowohl mit GAS-Antigenen, als auch struktur-ähnlichen humanen Antigenen auf Herz- und Skelett-Muskel-Zellen interagieren konnten. Mittlerweile wird der Mechanismus als Grundlage vieler verschiedener Auto-Immunerkrankungen angesehen, darunter das mit einer *Campylobacter jejuni*-Infektion assoziierte Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und dem mit einer *Streptococcus pyogenes*-Infektion assoziierten rheumatischem Fieber (Cunningham 2014; Shahrizaila et al. 2021). Auch bei der zuvor beschriebenen Erkrankung Neuromyelitis Optica konnte beobachtet werden, dass bei einem Teil der Patienten die Erkrankung postinfektiös entsteht (Sellner et al. 2010). Eine experimentelle Studie konnte das Protein ABC-Transporter-Permease (ABC-TP) exprimiert vom Bakterium *Clostridium perfringens* identifizieren, welches sequenzielle Ähnlichkeiten zum humanen Protein AQP4 aufwies. Immun-Zellen von an NMO-Erkrankten wiesen eine ausgedehnte Proliferation als Reaktion auf das Antigen ABC-TP auf und kreuz-reagierten mit dem humanen Protein AQP4 (Varrin-Doyer et al. 2012).

1.2 Spezifische Infektions-Erreger

Diese Beobachtungen und Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei der Entstehung schizophrener Erkrankungen grundsätzlich um einen Erreger-spezifischen auto-immunologischen Prozess im fötalen ZNS handeln könnte. Ausgehend von einer solchen Hypothese wurden die Interaktion von Erreger-spezifischen Antikörpern mit spezifischen Proteinen in fötalem neuronalem Gewebe untersucht. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über jene infektiösen Erreger vermitteln, gegen welche die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren gerichtet waren.

1.2.1 *Borrelia burgdorferi*

Bei dem Erreger *Borrelia burgdorferi* handelt es sich um ein gram-negatives Bakterium aus der Gruppe der Spirochäten. Die Erreger werden über temporäre Ektoparasiten der Ordnung *Ixodida*, auch als Schildzecken bekannt, auf den Menschen übertragen. Übertragen auf den Menschen kann es dann zur symptomatischen Infektion kommen, der sogenannten Lyme-Borreliose. Diese Erkrankung kann sich klinisch unterschiedlich manifestieren. Zum einen kann sich ausgehend von der Eintritts-Pforte des Erregers in den Wirt eine Haut-Reaktion ausbreiten, welche als *Erythema migrans* bezeichnet wird. Auch kann eine Neuro-Borreliose auftreten, die mit Hirnnerven-Läsionen, Meningitis, Radikulo-Neuritis, oder auch einer Enzephalomyelitis einhergehen kann (Pachner und Steere 1985). Die regionale sowie jährliche Inzidenz dieser Erkrankung unterliegt zum Teil erheblichen Schwankungen, jedoch konnte gezeigt werden, dass in Deutschland bei 9,4 % der erwachsenen Bevölkerung Antikörper von Typ IgG gegen *Borrelia burgdorferi* nachweisen lassen (Wilking et al. 2015). Selbst Jahrzehnte nach der Erkrankung und trotz vollständiger Therapie und Erreger-Eradikation können IgG-Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* bei ehemals Infizierten nachgewiesen werden (Kalish et al. 2001). Die Erreger können teilweise der Immunantwort des Wirtes entgehen, indem sie bestimmte Oberflächen-Proteine wie das Protein VlsE rekombinieren und damit die Affinität der bindenden Bestandteile des Immunsystems reduzieren (Rogovskyy und Bankhead 2013). Eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* führt darüber hinaus zu einem erhöhten Level von neuronal interagierenden Auto-Antikörpern, welche unter anderem mit neuronalen Gangliosiden, aber auch mit Dopamin-D1-Rezeptoren interagieren können (Moncó et al. 1993; Fallon et al. 2020). Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer maternalen Lyme-Borreliose und dem Auftreten einer Schizophrenie bei betroffenen Nachkommen kann dabei aufgrund der Tatsache postuliert werden, dass das Risiko für das Auftreten einer Schizophrenie dann am höchsten ist, wenn die Geburt während der Winter-Monate erfolgt ist und damit neun Monate nach der beginnenden Lyme-Borreliose-Saison im März auftritt (Fritzsche 2002).



Abbildung 2: *Borrelia burgdorferi*; Digital gefärbte Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme von drei Bakterien der Art *Borrelia burgdorferi* (CDC/Claudia Molins 2011). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des CDC/PHIL.

1.2.2 *Campylobacter jejuni*

Das begeißelte gram-negative Bakterium *Campylobacter jejuni* aus der Abteilung der Proteobacteria ist vor allem als Lebensmittel-Keim und Auslöser von Enteritiden und Diarrhoen bekannt. Infektionen mit dem Erreger sind sehr häufig, die Inzidenz liegt in Deutschland bei 80 neuen Infektionen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr (Schielke et al. 2014). Die bekannteste post-infektiöse Komplikation ist das Guillain-Barré-Syndrom (GBS), einer akuten paralytischen Neuropathie, mutmaßlich auf Grundlage kreuz-reagierender Auto-Antikörper. In einem Abstand von wenigen Tagen bis Wochen folgen auf eine *Campylobacter jejuni*-Infektion Sensibilitäts-Störungen und Lähmungen der Extremitäten, auch die Atemmuskulatur und Kreislaufregulation können betroffen sein. Während dem akuten Auftreten der Erkrankung kann ein Anstieg von kreuz-reagierenden Auto-Antikörper gegen die neuronalen Ganglioside GM1, GM1b und GalNAc-GD1a beobachtet werden, es kommt je nach Verlaufsform zu Demyelinisierung und/oder Axon-Schädigung, wobei eine Behandlung der Erkrankung im Austausch des Blut-Plasmas der Betroffenen besteht (Yuki et al. 1999; Willison et al. 2016). Erklären lässt sich diese Beobachtung anhand eines molekularen Mimikry-Effektes, da besonders jene *Campylobacter jejuni*-Stämme mit dem Auftreten des Syndroms vergemeinschaftet sind, welche GM- und GD-Gangliosid-ähnliche Lipooligosaccharide auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Nachamkin et al. 2002).

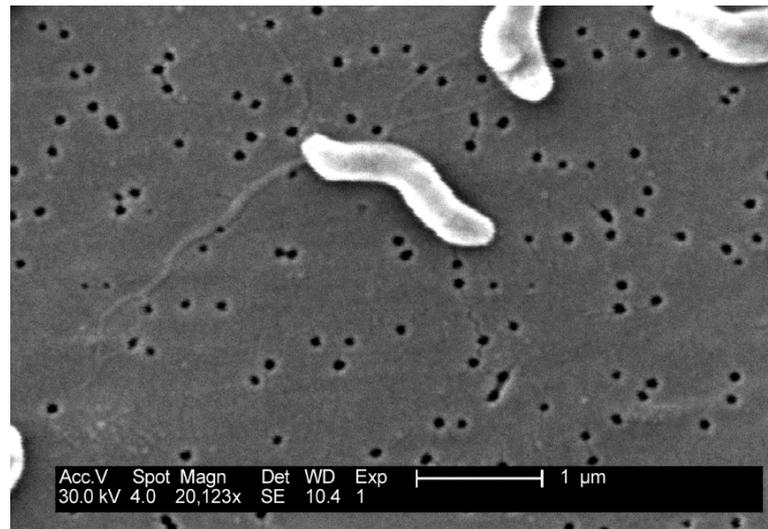


Abbildung 3: *Campylobacter jejuni*; Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme eines Bakteriums der Art *Campylobacter jejuni* (CDC/Dr. Patricia Fields, Dr. Collette Fitzgerald 2004). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des CDC/PHIL.

1.2.3 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori ist ein gram-negatives Helix-förmiges Bakterium der Abteilung Proteobacteria. Als humanpathogener Erreger führt *Helicobacter pylori* zu einer Typ-B-Gastritis und ist darüber hinaus einer der häufigsten Auslöser gastroduodener Ulzera (Reshetnyak und Reshetnyak 2017). Trotz starken regionalen und sozioökonomischen Unterschieden wird angenommen, dass in Europa und Nordamerika ca. 30 % der Bevölkerung infiziert sind (Eusebi et al. 2014). Die Hypothese, dass *Helicobacter pylori* als Umwelt-Faktor zur Entstehung einer Schizophrenie beitragen könnte, wurde bereits 2008 formuliert. Dabei wurde die Wirkung von *Helicobacter pylori* auf den Dopamin-, den Homocystein-Stoffwechsel, den Stoffwechsel ungesättigter Fettsäuren sowie das Auslösen einer chronischen Entzündungs-Reaktion als mögliche Ursache für das Auftreten von Schizophrenie bestimmt (Yilmaz et al. 2008). Insbesondere konnte eine Studie aus Griechenland zeigen, dass Kinder von Müttern, welche während der Schwangerschaft sero-positiv auf *Helicobacter pylori* IgG-Immunglobuline getestet wurden, eine global eingeschränkte kognitive Leistung aufweisen, bedingt durch eine gestörte neuronale Entwicklung (Karachaliou et al. 2017). Auch konnte ein geminderter Intelligenz Quotienten bei Schulkindern mit einer akuten *Helicobacter pylori*-Infektion in einer Studie beobachtet werden (Muhsen et al. 2011). Auch neuropsychiatrische Erkrankungen von Erwachsenen und des höheren Lebensalters sind mit *Helicobacter pylori*-Infektionen assoziiert, so konnte ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer Demenz, so wie für das idiopathischen Parkinson Syndrom verbunden mit einer stärkeren Symptomatik beobachtet werden (Shindler-Itskovitch et al. 2016; Dardiotis et al. 2018).

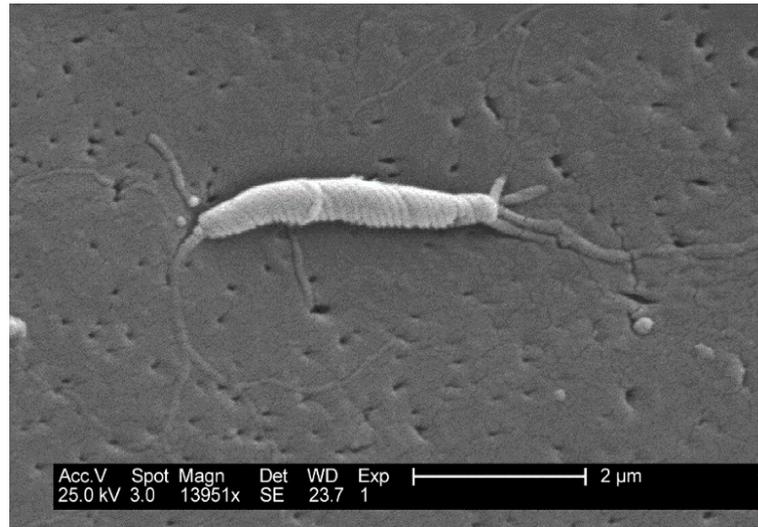


Abbildung 4: *Helicobacter pylori*; Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme eines Bakteriums der Art *Helicobacter pylori* (CDC/Dr. Patricia Fields, Dr. Collette Fitzgerald 2004). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des CDC/PHIL.

1.2.4 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulär lebendes parasitäres Protozoon aus der Familie der Apicomplexa. Insbesondere Katzen (*Felidae*) können den einzelligen Parasiten auf Menschen übertragen, indem *Toxoplasma gondii* im Entwicklungs-Stadium der Oozyste oral aufgenommen werden. Eine Infektion kann häufig asymptomatisch verlaufen oder sich symptomatisch als Toxoplasmose manifestieren. Föten können während der Schwangerschaft konnatal mit *Toxoplasma gondii* infiziert werden. Klassischerweise präsentiert sich eine konnatale Infektion beim Fötus mit den Befunden Hydrozephalus, intrakranielle Kalzifikationen und Chorioretinitis, es können aber auch andere systemische Manifestationen oder ein Spontan-Abort auftreten (Halonen und Weiss 2013). *Toxoplasma gondii* kann im Menschen zum Teil lebenslang in Neuronen des ZNS persistieren (Blanchard et al. 2015). In Deutschland weisen ca. 50 % der Bevölkerung einen positiven IgG-Titer gegen *Toxoplasma gondii* auf, wobei die Häufigkeit mit dem Lebensalter korreliert, da 18- bis 29-Jährige eine Sero-Prevalenz von ca. 20 %, 70- bis 79- Jährige eine Sero-Prevalenz von bis zu 77 % aufweisen (Pleyer et al. 2019). Die Vermutung, dass der Erreger der Toxoplasmose und die dabei auftretenden Antikörper einen Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Erkrankungen haben könnte, wurde aufgrund der Beobachtung formuliert, dass Menschen mit einer erstmalig aufgetretenen schizophrenen Episode einen erhöhten IgG- und IgM-Titer gegen *Toxoplasma gondii* aufwiesen (Yolken et al. 2001). Doch nicht nur eine direkte Infektion als Risikofaktor wurde in diesem Zusammenhang beobachtet, sondern auch die indirekte Wirkung des Erregers auf das Immunsystem werdender Mütter stellte sich als Risikofaktor für betroffene Föten heraus. Ein erhöhter IgG-Immunglobulin-Level in Müttern als auch in Föten konnte dabei das Risiko des Fötus im Verlauf des Lebens an Schizophrenie zu erkranken signifikant erhöhen. Brown et al. (2005) konnten mithilfe einer großen Kohorten-Studie einen stark erhöhten IgG-Titer gegen *Toxoplasma gondii* schwangerer Frauen als Risiko-Faktor für das Auftreten

einer Schizophrenie-Erkrankung der Föten im Erwachsenen-Alter identifizieren (OR = 2,61; 95 % CI = 1,0 – 6,82). Interessanter Weise war dieser Zusammenhang nur bei stark erhöhten Titern zu beobachten, ein nur moderat erhöhter IgG-Titer konnte nicht als Risiko-Faktor erkannt werden (OR = 1,37; 95 % CI = 0,4 – 4,73; $p = 0,62$). Auch die Untersuchung des Blutes von Neugeborenen fünf bis sieben Tage nach der Entbindung offenbarte ein signifikant erhöhtes Risiko für jene Neugeborenen an einer Early-Onset-Schizophrenie zu erkranken, welche einen erhöhten IgG-Titer gegen *Toxoplasma gondii* aufwiesen (OR = 1,79; CI = 1,01 – 3,15; $p = 0,045$); die IgG-Immunglobuline stammten zu diesem Zeitpunkt zum aller größten Teil noch von der Mutter, eine aktive Infektion des Fötus konnte nicht nachgewiesen werden (Mortensen et al. 2007). Studien zu einem späteren Zeitpunkt konnten dieses Ergebnis auch für eine schizophrene Erkrankung nach dem 18. Lebensjahr (Non-Early-Onset-Schizophrenie) des Nachwuchses bestätigen, wobei das Risiko des Nachwuchses mit der Höhe des IgG-Titers korrelierte. Es konnte für IgG-Titer oberhalb der 75. Perzentile ein mehr als zwei-fach erhöhtes Risiko festgestellt werden (OR = 2,1; 95 % CI = 1,0 – 4,5). Oberhalb der 90. Perzentile konnte ein mehr als drei-fach erhöhtes Risiko festgestellt werden (OR = 3,2; 95 % CI = 1,0 – 9,8) (Blomström et al. 2012).

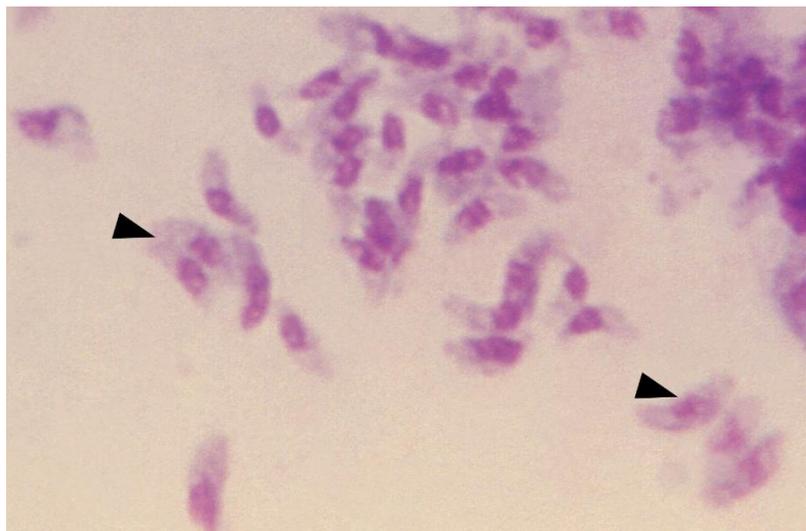


Abbildung 5: *Toxoplasma gondii*; Mikroskopische Aufnahme von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten (Pfeile) in einer Aszites-Flüssigkeits-Probe bei 1125-facher Vergrößerung (CDC 1970). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des CDC/PHIL.

1.3 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Die Fragestellung, der hypothetische Grundsatz und die methodische Zielsetzung dieser Arbeit werden folgendermaßen formuliert:

Es wird der Frage nachgegangen, ob Antikörper des Typs-IgG gegen die Infektions-Erreger *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* und *Toxoplasma gondii* in der Lage sind, spezifische Interaktionen mit fötalen neuronalen Proteinen einzugehen und ob diese Interaktionen zu einer Beeinflussung von Funktionen auf zellulärer Ebene führen.

Hintergrund dieser Arbeit ist die Hypothese, dass spezifische maternale IgG-Antikörper gegen die infektiösen Erreger *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* und *Toxoplasma gondii* in der Lage sein können auf einen Fötus übertragen zu werden. Im sich entwickelnden fötalen ZNS könnten diese Antikörper mit neuronalem Gewebe interagieren. Ähneln fötale neuronale Proteine auf Grundlage der molekularen Mimikry strukturell oder sequenziell Erreger-spezifischen Epitopen, kann es zu einer auto-reaktiven Interaktionen kommen. Aus diesen Interaktionen kann eine Beeinflussung der Funktion dieser Proteine resultieren und führt in der Folge zu einer gestörten Entwicklung von neuronalen Strukturen und Funktionen. Im Sinne des Vulnerabilitäts-Stress-Modells und der neuronalen-Entwicklungs-Theorie ist die Konsequenz daraus eine erhöhte Vulnerabilität für neuropsychiatrische Erkrankungen wie die Schizophrenie.

Methodisches Ziel dieser Arbeit ist es, fötale Proteine als spezifische Interaktions-Partner von Erreger-spezifischen IgG-Antikörpern zu identifizieren (*bEXselect*-Multiprotein-Array) und ausgewählte Interaktionen anhand proteomischer Methoden (Western-Blot und Zweidimensionale Gelelektrophorese) darzustellen.

Eine Beeinflussung der Funktionalität dieser Proteine wird auf zellulärer Ebene durch funktionelle Experimente an neuronalen SiMa- und SH-SY5Y- und nicht-neuronalen RBL-2H3- und T47-D-Zell-Kulturen untersucht. Experimentell werden dafür fluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen sowie Tests zur Bestimmung von Vesikel-Umsätzen (FM1-43-Vesikel-Umsatz-Test, Fluo-3-AM-Calcium-Imaging, β -Hexosaminidase-Degranulations-Test und Bestimmung von Kern-Zytoplasma-Verhältnissen) durchgeführt. Auch werden die Zell-Vitalität (MTT-Zell-Vitalitäts-Test) und Zell-Wachstum (Messung des Neuriten-Längen-Wachstums) sowie Zell-Proliferationen (Ki-67-Zell-Proliferations-Test, Mitose-Figuren-Zählung und ERBB3-Phosphorylierungs-Assay) untersucht. Zur Identifizierung von Epitop-Homologen auf menschlichen und pathogenen Proteinen werden die *in silico*-Verfahren *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0* der *Immune Epitope Database* (IEDB.org: *Free epitope database and prediction resource*) zur Epitop-Kartierung angewendet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Primär-Antikörper

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primär-Antikörper. Angabe von Produkt-Name, der Spezies sowie Hersteller und Katalog-Nummer.

Produkt-Bezeichnung und Spezies	Hersteller und Kat. Nr.
Anti-Astroctactin-2; Kaninchen; polyklonal	Antikoerper-online.de; ABIN5697108
Anti- <i>Borrelia burgdorferi</i> ; Kaninchen; polyklonal	Abcam; ab69219
Anti- <i>Campylobacter jejuni</i> ; Kaninchen; polyklonal	Antikoerper-online.de; ABIN285438
Anti-Complexin-2; Kaninchen; polyklonal	Synaptic Systems; 122002
Anti-ERBB3; Kaninchen; monoklonal	Cell Signaling Technology; mAb#12708
Anti- <i>Helicobacter pylori</i> ; Kaninchen; polyklonal	Antikoerper-online.de; ABIN4316874
Anti-pERBB3; Kaninchen; monoklonal	Cell Signaling Technology; mAb#4791
Anti-Synaptotagmin-5; Kaninchen; polyklonal	Antikoerper-online.de; ABIN2422201
Anti- <i>Toxoplasma gondii</i> ; Kaninchen; polyklonal	Abcam; ab138698
Anti-Tyrosin-Hydroxylase; Maus, monoklonal	Chemicon; MAB318

2.1.2 Sekundär-Antikörper

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Sekundär-Antikörper. Angabe von Produkt-Name, der Spezies sowie Hersteller und Katalog-Nummer.

Produkt-Bezeichnung und Spezies	Hersteller und Kat. Nr.
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Atto488-gekoppelt	Sigma-Aldrich; 18772
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-gekoppelt	Sigma-Aldrich; A9169

2.1.3 HEK293-Überexpressions-Lysate

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten HEK293-Überexpressions-Lysate. Angabe von Produkt-Name, Name der transfizierten Zell-Linie sowie Hersteller und Katalog-Nummer.

Produkt-Bezeichnung und Spezies	Hersteller und Kat. Nr.
ASTN2-transfiziertes HEK293-Überexpressions-Lysat; human	Abnova; H00023245-T01
CPLX2-transfiziertes HEK293-Überexpressions-Lysat; human	Origene; LC423397
HEK493; nicht-transfiziertes Kontroll-Lysat; human	Origene; LY500001
SYT5-transfiziertes HEK293-Überexpressions-Lysat; human	Origene; LY418847

2.1.4 Reagenzien

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Reagenzien. Angabe von Produkt-Name sowie Hersteller und Katalog-Nummer

Produkt-Bezeichnung	Hersteller und Kat. Nr.
4-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-Glucosaminid	Sigma-Aldrich; N9376
Acetylcholin	Sigma-Aldrich; A2661
Fluo-3-AM	Sigma-Aldrich;

Produkt-Bezeichnung	Hersteller und Kat. Nr.
FM1-43	73881 Sigma-Aldrich;
Histamine releasing agent <i>Compound 48/80</i>	S6814 Sigma-Aldrich; C2313
<i>Mounting Medium</i> -DAPI-haltig	Abcam; Ab104139
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid)	Merck; 111714
Neuregulin-1 (NRG1); rekombinant; human; Variante: GGF2	Origene; TP723155

2.2 Methoden

2.2.1 Identifizierung immunreaktiver Interaktions-Partner Erreger-spezifischer Antikörper mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mit Hilfe des *hexSelect*-Multiprotein-Arrays

Ziel dieser Studie ist die Identifizierung von Interaktionen im Sinne einer auto-immunen Bindung zwischen fötalen Proteinen des ZNS und anti-mikrobiellen Antikörpern. Um eine möglichst große Zahl verschiedener Proteine auf Interaktionen mit Erreger-spezifischen Antikörpern zu untersuchen, bietet sich die Nutzung von Multiprotein-Arrays (MPA) an. Bei dem von uns genutzten kommerziell erhältlichen MPA, handelt es sich um den *bEXselect*-Multiprotein-Array (engine the biomarker company, Berlin-Hennigsdorf), welcher 23.806 exprimierte cDNA-Klone des humanen ZNS präsentiert. Diese wurden aus der mRNA zweier fötaler Gehirne gewonnen, welche von legalen Schwangerschafts-Abbrüchen am Ende des ersten Trimenons stammen. Die gewonnenen cDNAs kodieren teils für vollständige Proteine, teils aber auch nur für Proteinfragmente bzw. Peptide, welche in ihrer Gesamtheit ein Spektrum von ca. 10.000 verschiedenen Proteinen abdecken. Die cDNA-Klone dieses Arrays, welche in der hEx1-Datenbank des Herstellers erfasst sind, werden an definierten Punkten einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) aufgedruckt und durch ein *E.coli* Translationssystem *in situ* exprimiert (Büssow et al. 1998). Die Folgende Tabelle stellt den genauen Ablauf der Inkubationsschritte eines solchen Experiments dar.

Tabelle 5: Protokoll Immundetektion mittels *hEXselect*-Multiprotein-Array. Protokoll-Schritte in chronologischer Reihenfolge, unter Angabe verwendeter Substrate, Puffer und Reagenzien sowie von Dauer und Anzahl der Wiederholungen des jeweiligen Schritts.

Protokoll-Schritt	Substrat/Puffer	Dauer und Wiederholung
1. Fixation	Ethanol; 70 %	15 min 1-mal
2. Waschen	ddH ₂ O	10 min 2-mal
	TBS-TT (TBS+Tween 20 (0,05 %) +Triton X-100 (0,5 %))	10 min 3-mal
	TBS	10 min 3-mal
3. Blocken	Magermilch-Pulver (3 %) in TBS	2 h
4. Inkubation	<i>α-Campylobacter jejuni</i>	12 h bei 4 °C
Primär-Antikörper	<i>α-Helicobacter pylori</i>	
	<i>α-Borrelia burgdorferi</i>	
	<i>α-Toxoplasma gondii</i>	
	<i>α</i> -ASTN2	
	<i>α</i> -CPLX2	
	<i>α</i> -ERBB3	
	<i>α</i> -SYT5	
	(Verdünnung: 1:2000)	
5. Waschen	TBS-T (TBS+Tween 20 (0,05 %))	10 min 3-mal
6. Inkubation	Peroxidase-Gekoppelt	2 h bei RT
Sekundär-Antikörper	(Verdünnung: 1:10000)	
7. Detektion	<i>Enhanced Chemiluminescence:</i>	2 min
	Tris-HCl (0,1 mol/l; pH = 8,6)	
	Luminol (0,25 mg/ml)	
	p-Hydroxycoumarin-Säure (0,2 mg/ml)	
	H ₂ O ₂ (0,1 %)	
	Exposition und Entwicklung eines Röntgenfilms	3 min

Protokoll-Schritt	Substrat/Puffer	Dauer und Wiederholung
	(<i>SuperRX medical X-ray film</i> ; Fuji, Düsseldorf, Deutschland)	
8. Stripping	NaOH (0,1 mol/l)	40 min
Ggf. zweite Inkubation (ab Protokoll-Schritt 2.)		

Die *Stripped*-MPAs wurden jeweils ein weiteres Mal mit einem anderen antimikrobiellen Antikörper verwendet, um unspezifische Signale ausschließen zu können. Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem Scanner digitalisiert. Anhand eines auf den Arrays implementierten Rasters und einer vom Hersteller bereitgestellten Identifikations-Tabelle konnten die Immunsots manuell ausgewertet und spezifischen fötalen Proteinen zugewiesen werden. Als Kontrolle wurden nur mit sekundärem Antikörper inkubierte *bEXselect*-Multiprotein-Arrays verwendet. Jedes Experiment wurde insgesamt drei-mal durchgeführt.

2.2.2 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist eine effektive Methode, um Proteine anhand ihrer spezifischen Molekulargewichte elektrophoretisch aufzutrennen und Protein-Antikörper-Interaktionen darzustellen (Laemmli 1970). Es wurden jeweils 5 µg Protein-Probe von spezifisch-transfizierten HEK293-Überexpressions-Lysaten sowie von Zell-Lysaten der Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D verwendet. Die Protein-Konzentration der Proben wurde zuvor mittels Tüpfeltest für mit SDS-Puffer lysierte Zell-Fractionen überprüft (Henkel und Bieger 1994). Zur elektrophoretischen Auftrennung durch eine SDS-PAGE wurden die Proben auf ein 7,5 % SDS-PAGE-Gel (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel) geladen. Als Negativ-Kontrolle wurden nicht-transfizierte-HEK293-Zell-Lysate verwendet, um nicht-spezifische Bindungen an zelluläre Bestandteile auszuschließen. Die Auftrennung wurde mit einem *Mini Protean Gel System* (Bio-Rad, München) bei 120 V für 60 min durchgeführt. Als Molekulargewicht-Marker wurde der *Precision Plus Protein All Blue Standard* (Bio-Rad, München) verwendet. Die in dem SDS-PAGE-Gel befindlichen Proteine wurden zur Weiterverwendung auf Methanol-fixierte Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF-Membranen) transferiert. Für den Protein-Transfer wurde das Mini Trans-Blot System (Bio-Rad, München) benutzt. Der Transfer wurde bei 100 V für 60 min durchgeführt. Anschließend wurden die weiteren Schritte wie in Tabelle 1; Protokoll-Schritt 3. – 7. Durchgeführt. Die Röntgenfilm-Aufnahmen wurden per Scanner digitalisiert. Zur Weiterverwendung wurden die PVDF-Membranen mit NaOH (0,1 mol/l) für 20 min gestripped. Als Kontrolle wurden

nicht-behandelte, ohne Primär-Antikörper behandelte und *Stripped*-PVDF-Membranen mit Sekundär-Antikörper inkubiert, um nicht-spezifische Signale von spezifischen Signalen unterscheiden zu können. Alle Versuche wurden mindestens drei-mal durchgeführt.

2.2.3 Zwei-Dimensionale Gel-Elektrophorese (2D-Gel-Elektrophorese)

Eine 2D-Gel-Elektrophorese kombiniert zur spezifischeren Auftrennung von Protein-Gemischen die Verfahren der isoelektrischen Fokussierung (IEF) mit der SDS-PAGE. Die isoelektrische Fokussierung dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres spezifischen isoelektrischen Punkts. Die so aufgetrennten Protein-Fractionen können anschließend mittels SDS-PAGE anhand ihrer Molekulargewichte weiter aufgetrennt und im Rahmen einer Western-Blot-Analyse Protein-Antikörper-Interaktionen detektiert werden. Dafür wurden jeweils 30 µg Zell-Lysat-Probe der Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D verwendet. Die Protein-Konzentrationen wurden zuvor per Tüpfeltest bestimmt (Henkel und Bieger 1994). Die Zell-Lysat-Proben wurden auf IEF-Gele (5 % Polyacrylamid; 50 % Harnstoff; 2,4 % Ampholyte) geladen, welche einen pH-Werte-Bereich von pH = 3 – 10 abdecken können. Die IEF wurde mit einem modifizierten *Mini Protean Gel System* (Bio-Rad, München) bei 150 V für 30 min und anschließend bei 200 V für 150 min durchgeführt. Die IEF-Gele wurden für die anstehende SDS-PAGE für 30 min in Laemmli-Puffer äquilibriert. Die 1,5 cm breiten IEF-Gele wurden zur Durchführung der elektrophoretischen Auftrennung nach Molekulargewicht auf 7,5 % -SDS-PAGE-Gelen platziert. Die SDS-PAGE wurde im weiteren Verlauf wie in Kapitel 2.2.2 „Western-Blot-Analyse“ durchgeführt. Auch diese Experimente wurden mindestens drei-mal durchgeführt.

2.2.4 Zell-Kultur

Für Experimente im Bereich der Proteomik und für funktionelle Tests wurden in dieser Studie die vier unterschiedlichen Zell-Linien RBL-2H3 (DSMZ no: ACC 312), SiMa (DSMZ no: ACC 164), SH-SY5Y (DSMZ no: ACC 209) und T-47D (DSMZ no: ACC 739) (*DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH*, Braunschweig) verwendet. Die Zell-Linie RBL-2H3 ist eine aus Ratten (*Rattus norvegicus*) isolierte basophile Leukämie-Zell-Linie, welche insgesamt Eigenschaften von Mast-Zellen aufweist und auch bereits für funktionelle Experimente zur CPLX2-abhängigen Mast-Zell-Degranulation verwendet wurde (Tadokoro et al. 2010, S. 3). Diese Zell-Linie wurde in einem Medium bestehend aus einer Mischung von 70 % DMEM, 20 % RPMI 1640 und 10 % FCS sowie Penicillin/Streptomycin kultiviert. Bei den Zell-Linien SiMa und SH-SY5Y handelt es sich um humane Neuroblastom-Zell-Linien, welche sich aufgrund ihrer neuronalen Differenzierung dazu nutzen lassen, Funktionalität und Wachstums-Eigenschaften neuronaler Gewebe *in vitro* zu testen (Biedler et al. 1978; Marini et al. 1999). Diese Zell-Linien wurden in RPMI 1640 mit 10 % FCS sowie Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zell-Linie T-47D entstammt einem Brust-Tumor und zeichnet sich durch eine hohe Konzentration an funktionellem Protein ERBB3 (HER3) aus

(Sollome et al. 2014). Diese Zell-Linie wurde in RPMI 1640 mit 15 % FCS und 10 µg/ml Insulin sowie Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle Zell-Linien wurden unter gleichen Bedingungen in einem Inkubations-Schrank bei 37 °C unter einer Atmosphäre mit einem erhöhten Gehalt von 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Das zur Kultivierung verwendete Medium wurde drei-mal pro Woche gewechselt. Zur Aussaat in sterile 6-/24-Well-Platten (Sarstedt, Nürnberg) wurden die Zellen mit auf 37 °C erwärmtem PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) gewaschen und mit Trypsin (0,05 %) und EDTA (0,02 %) mobilisiert und überführt. Für mikroskopisch gestützte Untersuchungen wurden die Zellen in 6-Well-Platten auf zuvor durch Abflammen mit Ethanol (96 %) sterilisierten Deckgläschen ausgesät. Für die Vorbehandlung mit anti-mikrobiellen Antiseren, wurden die Zellen für vier Stunden in Serum- und Insulin-freiem Kulturmedium unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert. Für die Experimente mit einer Antiserum-Vorbehandlung wurden die Zellen für zwölf Stunden zusammen mit dem jeweiligen Serum im Inkubations-Schrank inkubiert. Anti-mikrobielle Antiseren wurden vor der Verwendung in Zell-Kulturen von zell-toxischem Natrium-Azid durch eine Mikrodialyse mittels kommerziell erhältlicher Dialyse-Einheiten (Amicon Ultra, Merck-Millipore, Darmstadt) gereinigt.

2.2.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie stellt ein wertvolles Instrument zur Antikörper-vermittelten Identifizierung einer Antigen-Expression und der Darstellung von Protein-Antikörper-Interaktionen an Zellen dar. Zellen werden hierfür nach Entfernung des Kultur-Mediums mit Paraformaldehyd fixiert und wahlweise zur Darstellung intrazellulär gelegener Antigene mit einem Methanol/Aceton-Gemisch für Antikörper permeabilisiert. Zur Antigen-Detektion wird ein spezifischer Primär-Antikörper verwendet. In einem weiteren Inkubations-Schritt werden Primär-Antikörper durch einen Sekundär-Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen, Alexa Fluor 488 green, Sigma-Aldrich/Merk, Darmstadt) gekoppelt, welcher angeregt durch UV-Licht im Mikroskop detektiert werden kann. Der genaue Ablauf wird in Tabelle 2 dargestellt. Es wurden pro 6er-Well 2 ml und pro 24er-Well 0,5 ml Volumen verwendet.

Tabelle 6: Protokoll Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Protokoll-Schritte in chronologischer Reihenfolge, unter Angabe verwendeter Substrate, Puffer und Reagenzien sowie von Dauer und Anzahl der Wiederholungen des jeweiligen Schritts.

Protokoll-Schritt	Substrat/Puffer	Dauer und Wiederholung
1. Fixation	Paraformaldehyd (4 % in PBS)	10 min 1-mal

Protokoll-Schritt	Substrat/Puffer	Dauer und Wiederholung
2. Waschen	PBS	10 min 3-mal
3. Permeabilisierung (optional)	Methanol/Aceton (1:1; -20 °C)	10 min 1-mal
4. Waschen	PBS	10 min 3-mal
5. Umsetzen	Transfer der Deckgläser auf 24-Well Inkubations-Platten	
5. Blocken	Goat-Serum (2 % in PBS, 50 µl)	2 h 1-mal
6. Inkubation Primär-Antikörper	<p>α-<i>Campylobacter jejuni</i></p> <p>α-<i>Helicobacter pylori</i></p> <p>α-<i>Borrelia burgdorferi</i></p> <p>α-<i>Toxoplasma gondii</i></p> <p>α-ASTN2</p> <p>α-CPLX2</p> <p>α-ERBB3</p> <p>α-SYT5</p> <p>α-Tyrosin-Hydroxylase</p> <p>(Verdünnung: 1:50 in PBS mit 2 % Ziegen-Serum)</p>	12 h bei 4 °C
7. Waschen	PBS	10 [min] 3-mal
8. Inkubation Sekundär-Antikörper	<p>Ziege-Anti-Kaninchen, Alexa Fluor 488-grün</p> <p>(Verdünnung: 1:400 in PBS mit 2 % Ziegen-Serum)</p>	2 h, RT
9. Waschen	PBS	10 min 3-mal

Anschließend an den letzten Waschgang wurden die Deckgläser unter Verwendung eines DAPI-haltigen Eindeck-Mediums (*Fluoroshield Aqueous Mounting Medium with DAPI*; Abcam) montiert. Aufnahmen wurden von sowohl dem grün-fluoreszierenden Sekundär-Antikörper als auch der blau-fluoreszierenden DAPI-Färbung gemacht. Zur Aufnahme wurde ein Axio-phot-Mikroskop mit Auflicht-Fluoreszenz und einem darauf installierten digitalen Axio-cam-Kamera-System (alle Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Als Kontrolle wurden nur mit Sekundär-Antikörper inkubierte Zellen verwendet, um nicht-spezifische Signale auszuschließen.

2.2.6 Messung des Neuriten-Längen-Wachstums

Für die Neuriten-Längen-Wachstums-Messung wurden SiMa-Zellen für zwölf Stunden jeweils mit Antiserum gegen *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* oder ASTN2 behandelt. Aufnahmen wurden nach 12, 24 und 48 Stunden mit einem inversen Mikroskop mit Phasenkontrast-Einrichtung (Eclipse, Nikon-Europe, Amsterdam, Niederlande) und einem darauf installierten Kamera-System (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Länge von 100 Neuriten wurde mit dem Fiji-Klon der freien Bildverarbeitungs-Software ImageJ (Fiji) vermessen und statistisch mit dem Tabellenkalkulationsprogramm OpenOffice Calc (Apache OpenOffice Calc) ausgewertet. Dabei wurde ein Verhältnis zwischen den Neuriten-Längen von behandelten und nicht-behandelten SiMa-Zellen als Kontrolle dargestellt. Das Experiment wurde insgesamt drei-mal durchgeführt.

2.2.7 FM1-43-Vesikel-Umsatz-Test

Um einen Effekt der Interaktion des Antiserums gegen *Toxoplasma gondii* mit dem SNARE-Komplex-Protein CPLX2 sowie der Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* mit SYT5 auf die Exozytose-Aktivität neuronaler Zell-Linien zu messen, wurde ein FM1-43-Vesikel-Umsatz-Test durchgeführt. Dafür wurde die Acetylcholin-abhängige Aufnahme des fluoreszierenden Farbstoffes FM1-43 ((N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino) Styryl) Pyridinium-Dibromid) in die Zellen mittels Echtzeit-Mikroskopie untersucht. FM1-43 ist ein wasserlöslicher nicht-zelltoxischer Farbstoff, welcher im Zuge des Membran-Recyclings durch endozytische Vesikel in das Zell-Innere von zuvor exozytierten Zellen aufgenommen wird. Die Intensität fluoreszierenden Farbstoffes kann nach Anregung quantifiziert werden (Gaffield und Betz 2006). Der Test wurde mit CPLX2-reichen, mit *Toxoplasma gondii*-Antiserum behandelten SH-SY5Y-Zellen und mit SYT5-reichen, mit *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori*-Antiserum behandelten SiMa-Zellen durchgeführt. Dafür wurden SH-SY5Y-Zellen für zwölf Stunden mit Antiserum gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* behandelt. SiMa-Zellen wurden für zwölf Stunden mit Antiserum gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* behandelt. Im Anschluss an diese Behandlung wurden die vorbehandelten Zellen dann in eine Aufnahme-Kammer überführt und für die Aufnahmen permanent mit einer Standard-Perfusions-Lösung (NaCl 150 mmol/l, KCl 5,4 mmol/l, CaCl₂ 2 mmol/l, MgCl₂ 1 mmol/l, Hepes 10 mmol/l, Glukose 10 mmol/l) bei

Raumtemperatur mit einer Rate von 5 ml/min überspült. Durch Wechsel des Perfusats wurden die Zellen dann für jeweils 50 Sekunden einer Lösung mit FM1-34 (10 $\mu\text{mol/l}$) ausgesetzt. Diese Exposition erfolgte dabei entweder ohne eine zusätzliche Behandlung oder in Gegenwart von Acetylcholin (1 nmol/l). Die Aufnahmen wurden mit einem CCD-Kamera-System (Princeton Instruments, Trenton, NJ) durchgeführt, das auf einem inversen Mikroskop mit Epi-Fluoreszenz (Axiovert, Zeiss, Jena) montiert war. Diese Messungen wurden auch mit SiMa-Zellen durchgeführt, die mit einem Anti-SYT5-Antiserum vor-inkubiert worden waren. Als Kontrollen wurden SH-SY5Y- und SiMa-Zellen ohne Vorbehandlung untersucht. Es wurden je 96 densitometrische Werte erhoben. Das Experiment wurde drei-mal durchgeführt.

2.2.8 Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assay

Der Einfluss antibakterieller Antiseren auf die Acetylcholin-abhängige synaptische Aktivität von SiMa-Zellen, wurde durch ein Imaging-Verfahren mit dem Calcium-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3-AM (Fluo-3-Acetoxymethylester) untersucht. Fluo-3-AM diente dabei als Indikator für die intrazelluläre Kalzium-Konzentration, deren Transmitter-abhängige Änderungen Anhand der Änderung der Fluoreszenz-Intensität des Farbstoffs densitometrisch ermittelt werden konnten (Kao et al. 1989). Für diese Untersuchungen wurden SiMa-Zellen für zwölf Stunden mit Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* oder *Helicobacter pylori* vor-inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit Fluo-3-AM (5 mmol/l bei pH = 7,3) beladen. Zur Stimulation des Kalzium-Einstroms wurde Acetylcholin verwendet (1 nmol/l). Die Zellen wurden für die Aufnahmen in einer Aufnahme-Kammer permanent mit einer Standard-Perfusions-Lösung (NaCl 150 mmol/l, KCl 5,4 mmol/l, CaCl₂ 2 mmol/l, MgCl₂ 1 mmol/l, Hepes 10 mmol/l, Glukose 10 mmol/l) bei Raumtemperatur mit einer Rate von 5 ml/min perfundiert. Die Aufnahmen wurden mit einem CCD-Kamera-System (Princeton Instruments, Trenton, NJ), montiert auf einem inversen Mikroskop mit Epi-Fluoreszenz (Axiovert, Zeiss, Jena), erstellt. Die durch Licht mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregte Fluo-3-AM-Fluoreszenz wurde bei 540 nm gemessen. Aufnahmen wurden jeweils im 5 Sekunden Abstand durchgeführt und mit dem Programm MetaFluor und MetaMorph (Universal Imaging, West Chester, PA) analysiert. Zur quantitativen Analyse des intrazellulären Kalziums wurden Aufnahmen vor Acetylcholin-Stimulation (F_0) und Post-Acetylcholin-Stimulation (F) in ein Verhältnis (F/F_0) gesetzt. Auch in diesem Fall wurden die Messungen mit Anti-SYT5-Antiserum inkubierten SiMa-Zellen wiederholt. Als Kontrolle wurden nicht-behandelte SiMa-Neuroblastom-Zellen verwendet. Das Experiment wurde insgesamt drei-mal wiederholt.

2.2.9 MTT-Zell-Vitalitäts-Test

Mit dem MTT-Zell-Vitalitäts-Test kann die mitochondriale Glykolyse-Leistung von Zellen untersucht werden. Der Farbstoff MTT ((3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-Bromid) wird von vitalen Zellen aufgenommen und mitochondrial zu bläulichem

Formazan reduziert. Die Menge an Formazan kann densitometrisch gemessen werden. Die gemessene Intensität des Formazans lässt eine Aussage über den Energie-Stoffwechsel von mit Antiseren behandelten Zellen zu. Die auf Deckgläschen ausgesäten Zell-Linien RBL-2H3, SH-SY5Y und T47-D wurden für zwölf Stunden mit Antiserum gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* behandelt. Die Zell-Linie SiMa wurde für zwölf Stunden mit den Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* behandelt. Anschließend wurden die Zellen zwei-mal für je 10 min mit PBS-Puffer gespült und mit frischem DMEM-F12 weiterverwendet. MTT-PBS-Lösung (50 µg/ml) wurde hinzugegeben und die Zellen für weitere zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Aufnahmen wurden mit einem Axiophot-Mikroskop und einem darauf montierten digitalen Axiocam-Kamera-Systems (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt und desitometrisch mit dem Programm ImageJ (Fiji) ausgewertet. Pro Testreihe wurden jeweils 120 densitometrische Werte erhoben. Als Kontrolle wurden nicht-behandelte Zell-Linien benutzt. Das Experiment wurde drei-mal durchgeführt.

2.2.10 β-Hexosaminidase-Degranulations-Test

Die basophile Ratten-Zell-Linie RBL-2H3 repräsentiert viele morphologische und funktionelle Eigenschaften von Mast-Zellen (Passante und Frankish 2009). Eine Stimulation dieser Zellen führt zur Exozytose der Mast-Zell-Granula, und damit zur sogenannten Mast-Zell-Degranulation. Zur der Änderung der Degranulations-Aktivität von nicht-behandelten und mit Anti-mikrobiellen Antiseren behandelten RBL-2H3-Zellen wurde der β-Hexosaminidase-Degranulations-Test genutzt (Soto und Pecht 1988). Folgend auf eine Stimulation mit dem Mast-Zell-Stimulanz *Compound 48/80* (Sigma-Aldrich/Merk, Darmstadt), degranulieren Mast- und RBL-2H3-Zellen unter anderem das Enzym β-Hexosaminidase proportional zur Degranulations-Leistung. Die Aktivität des Enzyms β-Hexosaminidase kann photometrisch gemessen werden und es kann daraus ein Rückschluss auf die Menge an degranuliertem Enzym und damit auf die Degranulations-Leistung der Zellen gezogen werden. Dafür wird der Zell-Überstand mit 4-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid (Sigma-Aldrich/Merk, Darmstadt), einem Substrat des Enzyms, inkubiert. Das aus der enzymatischen Reaktion entstehende p-Nitrophenol wird photometrisch gemessen. Um den Anteil des degranulierten Enzyms β-Hexosaminidase zu ermitteln, wurden die RBL-2H3-Zellen mit Triton-X100 lysiert und das Lysat ebenfalls mit 4-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid inkubiert. Aus den gemessenen Werten der Enzym-Aktivität im Überstand und der Aktivität an intrazellulär verbleibendem Enzym wurde mit der folgenden Formel (Formel 1) ein Verhältnis berechnet:

$$\text{Degranulation \%} = \frac{[\beta - \text{Hexosaminidase} - \text{Überstand}]}{[\beta - \text{Hexosaminidase} - \text{Zelllysat}]} * 100$$

Der erhaltene Wert entspricht jeweils der prozentualen Exozytose-Leistung von mit Antikörpern behandelten RBL-2H3-Zellen und unbehandelter Kontroll-Zellen, die dann wiederum ebenfalls ins Verhältnis gesetzt werden können. Der Test wurde dahingehend modifiziert, dass keine IgE-Sensibilisierung durchgeführt wurde. Die dadurch verminderte Degranulations-Aktivität wurde toleriert, um einen unspezifischen Effekt zwischen IgE- und Antimikrobiellen IgG-Antikörpern auszuschließen. Pro Testreihe wurden jeweils 32 photometrische Werte erhoben. Die Zellen wurden vor Test-Beginn für zwölf Stunden mit Antimikrobiellen Antiseren behandelt. Die Absorption wurde bei 405 nm in Halbküvetten mit einem UV/VIS Spektro-Photometer (Shimadzu, Duisburg) gemessen. Als Kontrolle wurden nicht-behandelte mit *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Zellen gemessen. Ebenfalls wurden nicht-behandelte nicht stimulierte RBL-2H3-Zellen auf spontane Release-Aktivität hin getestet. Das Experiment wurde mindestens drei-mal durchgeführt. Im Folgenden ist der genaue Ablauf Protokollarisch dargestellt.

Tabelle 7: Protokoll β -Hexosaminidase-Degranulations-Test. Protokoll-Schritte in chronologischer Reihenfolge, unter Angabe verwendeter Substrate, Puffer und Reagenzien sowie von Dauer und Anzahl der Wiederholungen des jeweiligen Schritts.

Protokoll-Schritt	Substrat/Puffer	Dauer und Wiederholung
1. Waschen der Zellen	Mit Standard-Zell-Puffer (NaCl 150 mmol/l, KCl 5,4 mmol/l, CaCl ₂ 2 mmol/l, MgCl ₂ 1 mmol/l, HEPES, 10 mmol/l, Glucose 10 mmol/l, pH = 7,3)	10 min 3-mal
2. Stimulation der Zellen	Mit <i>Compound 48/80</i> (60 µg/ml; 37 °C, 5 % CO ₂)	1 h 1-mal
3. Stoppen der Reaktion	Durch Inkubation in einem Eisbad	10 min 1-mal
4. Entnahme des Überstandes	Überführung in 1 ml Eppendorf-Gefäße	
5. Lyse der Zellen	Mit Triton-X100 (1 % in Standard-Zell-Puffer)	30 min 1-mal
6. Überführung	Überführung von 50 µl des Lysats in 1 ml Eppendorf-Gefäße	
7. Zentrifugation der Proben	Bei 300 ref, 4 °C	10 min

Protokoll-Schritt	Substrat/Puffer	Dauer und Wiederholung
		1-mal
8. Substrat-Inkubation	Zugabe von 4-Nitrophenyl-N-Acetyl-β-D-Glucosaminid (50 μl 1 mol/l; Inkubation bei 37 °C, 5 % CO ₂)	45 min 1-mal
9. Stoppen der Reaktion	Zugabe von Glycin-Stopp-Puffer (0,4 mol/l, pH = 10,7)	
10. Bestimmung der optischen Dichte	Messung in Halbküvetten bei 405 nm	

2.2.11 Kern-Zytoplasma-Verhältnis Toluidin Blau gefärbter und mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3-Zellen

Der Farbstoff Toluidin-Blau findet seit längerer Zeit Verwendung in der Licht-mikroskopischen Mast-Zell-Färbung (Ribatti 2018). Bei dieser Färbung lassen sich sowohl der blau-gräuliche Zell-Leib gefärbter Zellen als auch die metachromatisch gefärbten Mast-Zell-Granula sicher von ihrer Umgebung abgrenzen. Geben die Mast-Zellen nach Stimulierung ihre Granula in den extrazellulären Raum ab, führt dies zu einer Abnahme des zytoplasmatischen Kompartiments der Zellen, während die Größe des Zellkerns unverändert bleibt. Dieses Phänomen kann dazu benutzt werden, einen Effekt der verwendeten anti-mikrobiellen Antiseren auf die Degranulations-Leistung von RBL-2H3-Zellen zu messen. Dazu wurden mit Antiseren vorbehandelte RBL-2H3-Zellen, die entweder nicht-stimuliert, oder mit *Compound 48/80* stimuliert waren, mit Toluidin Blau gefärbt. Lichtmikroskopische Aufnahmen dieser Zellen wurden anschließend mit dem Programm ZEN 3.2 (ZEN, Zeiss, Jena) vermessen. Gemessen wurde dabei die Fläche des Zell-Kerns und des Zytoplasmas, aus welchen Werten im Anschluss mit der folgenden Formel (Formel 2) ein entsprechender Quotient berechnet wurde:

$$\text{Zytoplasma – Fläche \%} = \frac{(\text{Gesamt – Zell – Fläche}) - (\text{Zellkern – Fläche})}{(\text{Gesamt – Zell – Fläche})}$$

Dieser Quotient entspricht der Degranulations-Leistung der Zellen insofern, dass Zellen mit einer reduzierten Degranulations-Leistung ein im Verhältnis zum Zellkern größeres Zytoplasma-Volumen aufweisen. Die Aufnahmen wurden bei 40-facher Vergrößerung mit einem Axiophot-Mikroskop und einem darauf montierten digitalen Axiocam-Kamera-System (Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Als Kontrolle dienten RBL-2H3-Zellen, welche nicht mit Antikörper vorbehandelt, und auch nicht mit *Compound 48/80* stimuliert worden waren. Das Experiment wurde drei-mal mit je 32 vermessenen Zellen durchgeführt

Tabelle 8: Protokoll Toluidin Blau-Färbung Protokoll-Schritte in chronologischer Reihenfolge, unter Angabe verwendeter Substrate, Puffer und Reagenzien sowie von Dauer und Anzahl der Wiederholungen des jeweiligen Schritts.

Protokoll-Schritt	Substrat/Puffer	Dauer und Wiederholung
1. Fixierung	Paraformaldehyd (4 % in PBS)	10 min 1-mal
2. Spülen	PBS	10 min 3-mal
3. Färbung	0,1 % wässrige Lösung Toluidin Blau	1 h 1-mal
4. Spülen	ddH ₂ O	10 min 3-mal
5. Umsetzen	Umsetzen auf Objektträger; Eindecken mit Glycerin	

2.2.12 Untersuchung des Einflusses der Mast-Zell-Degranulation auf die subzelluläre Lokalisation von CPLX2 durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Um einen Einfluss der verwendeten Antiseren auf die subzelluläre Lokalisation des an der Mast-Zell-Degranulation beteiligten Proteins CPLX2 zu untersuchen, wurden immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von stimulierten RBL-2H3-Zellen durchgeführt. Dafür wurden RBL-2H3-Zellen für zwölf Stunden mit Antiseren behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen wie in Protokoll-Tabelle 3 (Protokoll-Schritt 2.) mit dem Stimulanz *Compound 48/80* zur Degranulation gebracht. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde wie in Protokoll-Tabelle 2 durchgeführt. Die Zellen wurden für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Primär-Antikörper gegen CPLX2 behandelt. Die Aufnahmen wurden mit einem Axiophot-Mikroskop und einem darauf montierten digitalen Kamera-System (Axiocam, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Zur densitometrischen Intensitäts-Bestimmung wurde das Programm ImageJ (Fiji) verwendet. Das Experiment wurde drei-mal mit pro Testreihe je 96 erhobenen Werten durchgeführt. Als Kontrolle dienten RBL-2H3-Zellen, die nicht mit Antiserum vorbehandelt waren.

2.2.13 Ki-67-Zell-Proliferations-Test

Ki-67 ist ein nukleär-exprimiertes Protein, welches nur in aktiv proliferierenden Zellen exprimiert wird. Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie kann das Protein nachgewiesen werden und darüber die Zell-Proliferations-Rate bestimmt werden. Es wurden die Zell-Linien SH-SY5Y und T-47D jeweils bei voller Konfluenz für zwölf Stunden mit Antiserum gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* vorbehandelt. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde wie in Protokoll-Tabelle 2 durchgeführt. Als Primär-Antikörper wurde ein Anti-Ki-67-Antikörper verwendet. Als Gegenfärbung wurde eine DAPI-Färbung verwendet. Aufnahmen wurden mit einem Axiophot-Mikroskop und einem darauf montierten digitalen Kamera-System (Axiocam, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Zur Auswertung wurden jeweils zehn Aufnahmen pro Well bei 40-facher Vergrößerung angefertigt. Die Aufnahmen wurden später digital in 10 Sektoren eingeteilt, um die manuelle Auszählung der Zellkerne zu erleichtern. Pro Aufnahme wurden 40 DAPI-positive Zellkerne ausgezählt und der Anteil an Ki-67-positiven Zellkernen ermittelt. Pro Versuch wurden insgesamt 400 DAPI-positive Zellkerne ausgezählt. Bei drei-maliger Versuchs-Wiederholung konnten daher insgesamt 1200 DAPI-positive Zellkerne sowie der Anteil der Ki-67-positiven Zellkerne ausgezählt werden, woraus sich die prozentuale Ki-67-Proliferationsrate ermitteln lässt. Die Proliferationsraten wurden dabei im Vergleich zur Proliferationsrate unbehandelter Kontroll-Zellen als Prozentuales Verhältnis dargestellt. Als Kontrolle wurden nicht-behandelte und mit *Toxoplasma gondii*-Antiserum behandelte SH-SY5Y- und T-47D-Zellen verwendet, um einen unspezifischen Effekt von nicht mit ERBB3 interagierenden Antiseren auszuschließen.

2.2.14 Mitose-Figuren-Zählung

Als ergänzende Methode um die Proliferationsrate von Zellen zu ermitteln, wurde die Mitoserate durch die Zählung histologisch sichtbarer Mitosefiguren in einem definierten Areal, hier des Hauptgesichtsfeldes (HPF) eines konfluenten Zell-Rasens bestimmt. Dazu wurden DAPI-gefärbte Zellkerne in einem HPF bei 40-facher Vergrößerung auf Mitose-Figuren hin untersucht und diese ausgezählt. Insgesamt wurden pro Testreihe 50 HPF aus repräsentativen Bereichen der Zell-Kulturen erfasst. Zur Ergebnis-Angabe wurden die Anzahl Mitose-Figuren pro 50 HPF umgerechnet in Mitose-Figuren pro mm^2 . Die Sehfeldzahl des verwendeten Mikroskops beträgt 25 mm, der Faktor beträgt 3,07. Als Mitose-Figuren wurden Pro-meta-Phase-, Meta-Phase- und Ana-Phase-Stadien erfasst. Es wurden die auf Deck-Gläschen ausgesäten Zell-Linien SH-SY5Y und T-47D jeweils bei voller Konfluenz für zwölf Stunden mit Antiserum gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* vorbehandelt. Die Deckgläschen wurden anschließend mit DAPI-haltigem Eindeck-Medium auf Objektträger montiert und mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Als Kontrolle wurden nicht-behandelte und mit *Toxoplasma gondii*-Antiserum vorbehandelte SH-SY5Y- und T-47D-Zellen verwendet, um einen unspezifischen Effekt auf die Proliferationsrate von nicht mit ERBB3 interagierenden Antiseren auszuschließen. Das Experiment wurde drei-mal durchgeführt.

2.2.15 ERBB3-Phosphorylierungs-Assay

Zu Überprüfung der Aktivität des Proteins ERBB3 wurde ein Phosphorylierungs-Assay durchgeführt. Mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen an Aminosäure-Position Y1289 phosphoryliertes ERBB3, kann eine Änderung des Rezeptor-abhängigen Aktivitäts-Zustandes des Proteins gemessen werden. Dazu wurden in 6-Well-Platten ausgesäte SH-SY5Y- und T-47D-Zellen für zwölf Stunden mit Antiserum gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 min mit dem ERBB3-Rezeptor-Liganden NRG-1 (human-rekombinant, Variante GGF2; 0,1 µg/ml) behandelt. Die Reaktion wurde durch ein zehnmütiges Eisbad gestoppt. Die Zellen wurden mit Laemml-Puffer lysiert. Anschließend wurde ein Western-Blot beschrieben in Abschnitt 2.2.2 (Western-Blot) mit Verweis auf Protokoll-Tabelle 1 durchgeführt. Als Primär-Antikörper wurde ein Anti-pERBB3-(Y1289)-Antikörper benutzt (*Cell Signaling Technology*, Frankfurt am Main). Nach erstmaligem Durchlauf wurden die PVDF-Membranen mit NaOH gestripped und zur Kontrolle eine erneute Immundetektion mit einem Anti-ERBB3-Antikörper als Primär-Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle wurden nicht Antiserum behandelte, mit NRG-1 stimulierte und nicht-stimulierte SH-SY5Y- und T-47D-Zellen verwendet. Als Kontroll-Antikörper wurde das Antiserum gegen *Toxoplasma gondii* verwendet, da hierfür keine Interaktion mit Proteinen der ERBB-Klasse bekannt ist. Zur Ladekontrolle wurde der Gesamt-Protein-Gehalt der Zell-Lysate durch einen Tüpfeltest bestimmt (Henkel und Bieger 1994).

2.2.16 Epitop-Kartierung mittels *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0* der *Immune Epitope Database*

Die *in silico*-Epitop-Kartierungen wurden mit den Programmen *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* (Jespersen et al. 2017) und *DiscoTope 2.0* (Kringelum et al. 2012) der *Immune Epitope Database* (*IEDB.org: Free epitope database and prediction resource*) (Vita et al. (2019) durchgeführt. Das Programm *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* ist in der Lage, auf Basis eines auf Antigen-Antikörper-Kristall-Struktur-Daten trainierten *Random Forest Algorithmus*, lineare (kontinuierliche) Epitope auf Aminosäure-Sequenzen als mögliche Antikörper-Bindungsstellen vorauszusagen (Jespersen et al. 2017). Die zur Untersuchung genutzten Aminosäure-Sequenzen wurden im *FASTA*-Format für die Proteine ASTN2 (Human; Identifier: O75129-1), CPLX2 (Human; Identifier: Q6PUV4-1), ERBB3 (Human; Identifier: P21860-1) und SYT5 (Human; Identifier: O00445-1) in das Programm *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* eingegeben. Die Schwelle zur Antigen-Vorhersage (*Threshold*) wurde standardmäßig auf 0,55 gesetzt, was einer Spezifität von 81,65 % entspricht. Das Programm *DiscoTope 2.0* bestimmt räumliche Epitope von gefalteten drei-dimensionalen Proteinen anhand der entschlüsselten räumlichen Struktur und der Aminosäure-Sequenz (Kringelum et al. 2012). Die Information für diese Strukturen wurden im PDB-Code-Format in das Programm *DiscoTope 2.0* eingegeben. Der vierzeilige PDB-Code der *Protein Data Bank* (Protein Data Bank) beinhaltet die

kristallographisch entschlüsselte räumliche Struktur und die Aminosäure-Sequenzen der Proteine. Verwendet wurden folgende PDB-Code-Strukturen: ASTN2 (ID: 5J68; Chain A), ERBB3 (ID: 1M6B; Chain A), SYT5 (ID: 5H4Y; Chain A). Die Schwelle zur Antigen-Vorhersage (*Threshold*) wurde standardmäßig auf - 3,7 gesetzt, was einer Spezifität von 75 % entspricht. Die Untersuchung wurde begonnen mit einer Epitop-Kartierung mittels *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0*. Die Nutzung der Abbildungen über die linearen Epitope der Proteine ERBB3 und *Erp family outer surface*-Lipoprotein erfolgt mit freundlicher Genehmigung der IEDB und der Autoren des Programms *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* (Haste Andersen et al. 2006; Larsen et al. 2006; Ponomarenko und Bourne 2007; Jespersen et al. 2017).

Zur Bestätigung wurden die identifizierten Epitope anschließend mittels *DiscoTope 2.0* auf ihre Lokalisation im räumlich gefalteten Protein hin untersucht, denn nicht alle linearen Epitope in gefalteten Proteinen sind auch tatsächlich für Antikörper zugänglich. Die Verwendung der Abbildung über die räumliche Struktur von ERBB3 erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Jmol (*Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D*). Die Sequenzen der derart bestätigten Epitope wurden nun auf Sequenz-Übereinstimmungen im Proteom der Erreger *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* und *Toxoplasma gondii* hin untersucht. Zur Sequenz-Übereinstimmung wurde das Programm *BLAST* der Plattform *National Center for Biotechnology Information (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool)* verwendet. Zur Kontrolle wurde der Versuch mit den Sequenzen von Proteinen wiederholt, welche keine Interaktion mit den verwendeten Antiseren im *bEXselect*-Multiprotein-Array zeigten, jedoch der Klasse der zu untersuchenden Proteine angehören und daher eine hohe Struktur-Ähnlichkeit mit diesen Proteinen aufweisen. Damit sollte kontrolliert werden, ob die Sequenz-Übereinstimmungen von humanen und Erreger-Proteinen spezifisch und für die Interaktion mit den Antiseren ausschlaggebend sind.

2.2.17 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit den Tabellen-Kalkulations-Programmen Microsoft Excel und Apache OpenOffice Calc durchgeführt. Der T-Test wurde standardmäßig als Einseiten-Test durchgeführt, wobei Unterschiede mit einem P-Wert kleiner als 0,05 als signifikant gewertet wurden (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung immunreaktiver Interaktionen der Antiseren gegen *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels *hEXselect*-Multiprotein-Array

Als Grundlage dieser Arbeit wurde die Reaktivität der anti-mikrobiellen Antiseren gegen *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns getestet. Verwendet wurden hierfür Multiprotein-Arrays (*hEXselect*, engine the biomarker company, Berlin Hennigsdorf, Deutschland). Die Proteine dieses Arrays leiten sich von 23.806 Klonen einer cDNA Bank aus zwei humanen pränatalen fötalen Gehirnen vom Ende des ersten Trimenons ab. Sie setzen sich aus vollständigen Proteinen, Protein-Teilfragmenten und Peptiden zusammen, die insgesamt ein Spektrum von ca. 10.000 unterschiedlichen Proteinen repräsentieren. Diese Proteine wurden hier genutzt, um Interaktions-Partner Erreger-spezifischer Antiseren mit Proteinen des fötalen pränatalen humanen Gehirns zu identifizieren. Dafür wurden die Arrays jeweils für zwölf Stunden mit den anti-mikrobiellen Antiseren inkubiert. Anschließend wurden die Immunsots der Proteinbindenden Antikörper mittels Sekundär-Antikörper und anschließender ECL-Reaktion (*Enhanced Chemiluminescence*) sichtbar gemacht, auf Röntgenfilm (Fuji, Düsseldorf) festgehalten und schließlich digitalisiert. Anhand eines auf den Arrays implementierten Rasters und einer vom Hersteller vorgesehenen Tabelle zur Protein-Identifikation konnten die Immunsots manuell ausgewertet und spezifischen fötalen Proteinen zugewiesen werden. Als Kontrolle wurden nur mit sekundärem Antikörper inkubierte *hEXselect*-Multiprotein-Arrays verwendet. Die Ergebnisse dieser einleitenden Untersuchungen für die einzelnen Erreger-spezifischen Antiseren werden in Form von Abbildungen und Tabellen wie folgt dargestellt.

3.1.1 Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Borrelia burgdorferi*

(Abbildung 6, Tabelle 9),

3.1.2 Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Campylobacter jejuni*

(Abbildung 7, Tabelle 10),

Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Helicobacter pylori*

(Abbildung 8, Tabelle 11),

3.1.4 Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Toxoplasma gondii*

(Abbildung 9, Tabelle 12)

3.1.1 Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Borrelia burgdorferi*

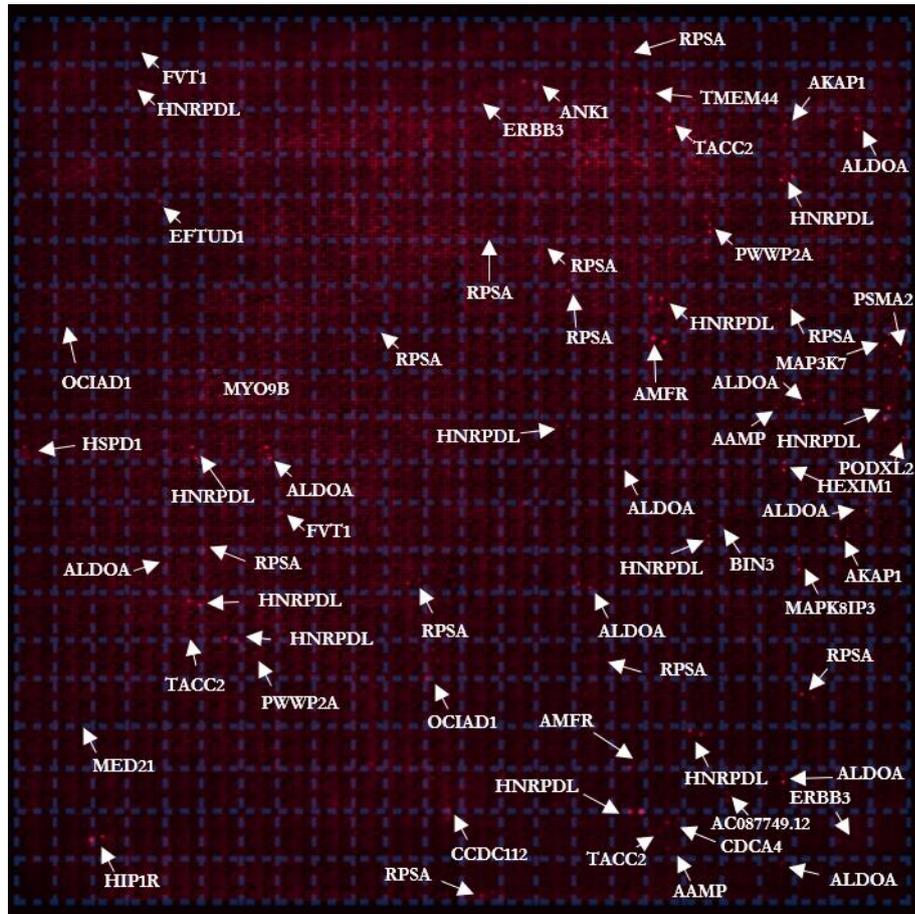


Abbildung 6: Darstellung der Interaktionen des Antikörpers gegen *Borrelia burgdorferi* mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels MPA. Identifizierte Immun-Spots sind mit Gen-Symbolen bezeichnet und mit Pfeilen markiert.

Tabelle 9: Identifizierte Protein-Interaktions-Partner des Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörpers. Alphabetisch-sortierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Borrelia burgdorferi*. Angabe von Gen-Symbol, Protein-Bezeichnung und Protein-Funktion.

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
AC004410.1 (Nicht charakterisiert)	Unbekannt
AC021534.1 (Nicht charakterisiert)	Unbekannt
ALDOA (Aldolase A)	Glukose Stoffwechsel
ALKBH5 (AlkB homolog 5)	RNA-Modifikation
ANK1 (Ankyrin 1)	Regulation Organellen-Organisation
AXIN1 (Axin 1)	Signaltransduktion
C10orf28 (R3H domain and coiled-coil containing 1 like)	mRNA-Splicing

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
CDCA4 (Cell division cycle associated 4)	Regulation der Transkription
CLTA (Clathrin light chain A)	Endozytose
CWC15 (CWC15 spliceosome associated protein homolog)	mRNA-Splicing
EAPP (E2F associated phosphoprotein)	Regulation der Transkription
EFTUD1 (E74 like ETS transcription factor 1)	Regulation der Transkription
ERBB3 (Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3)	Neuronale Zell-Proliferation
FDX1L (Ferredoxin 2)	Elektronentransport
FVT1 (3-Ketodihydroshingosine reductase)	Membranlipid Stoffwechsel
GUCA1A (Guanylate cyclase activator 1A)	Phototransduktion
HEXIM1 (HEXIM P-TEFb complex subunit 1)	Regulation der Transkription
HIP1R (Huntingtin interacting protein 1 related)	Regulation der Endozytose
HNRPDL (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D like)	Regulation der Transkription
KCTD17 (Potassium channel tetramerization domain containing 17)	Kalzium Homeostase
LARP1 (La ribonucleoprotein domain family member 1)	Regulation der Translation
MAP3K7 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7)	Wachstumsfaktor-Signaltransduktion
MAPK8IP3 (Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3)	Signaltransduktion, Golgi-Apparat
MED21 (Mediator complex subunit 21)	Regulation der Transkription
PALM (Paralemmin)	Regulation der Zellform
PSMB5 (Proteasome subunit beta 5)	Intrazellulärer Protein Abbau
PUNC (Immunoglobulin superfamily DCC subclass member 3)	Wachstumsfaktor-Signaltransduktion
RBM15B (A binding motif protein 15B)	mRNA-Splicing
RPSA (40S ribosomal protein SA)	Translation
STUB1 (STIP1 homology and U-box containing protein 1)	Protein-Ubiquitylierung
XPO4 (Exportin 4)	Proteintransport Kernmembran

3.1.2 Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Campylobacter jejuni*

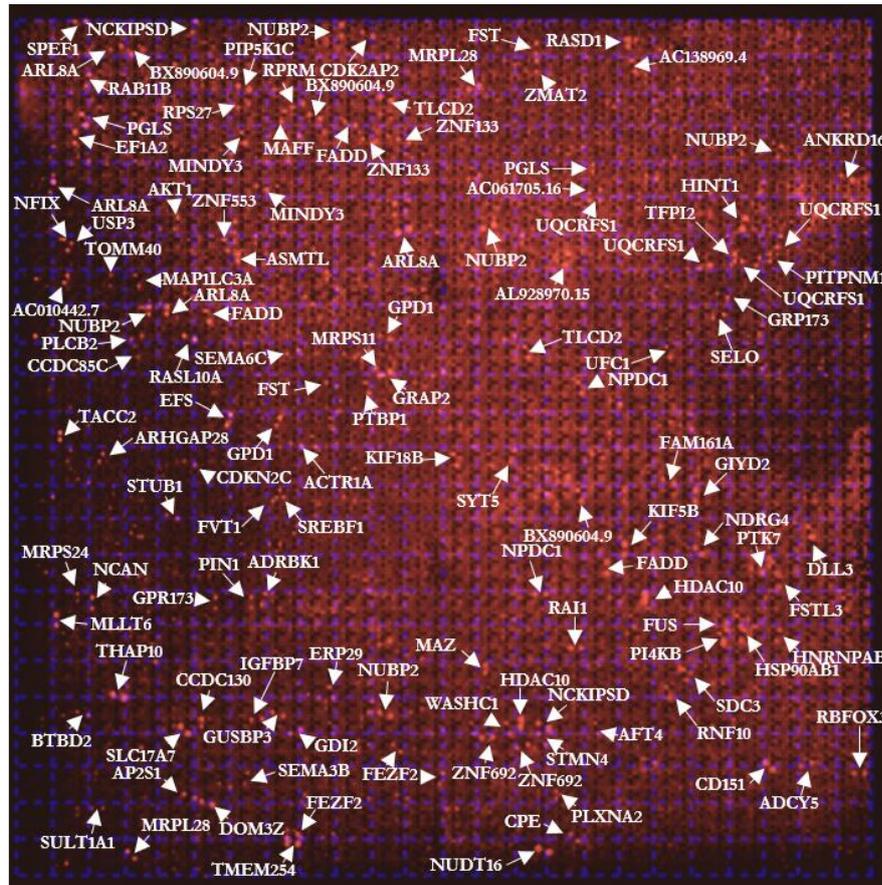


Abbildung 7: Darstellung der Interaktionen des Antikörpers gegen *Campylobacter jejuni* mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels MPA. Identifizierte Immun-Spots sind mit Gen-Symbolen bezeichnet und mit Pfeilen markiert.

Tabelle 10: Identifizierte Protein-Interaktions-Partner des Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörpers. Alphabetisch-sortierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Campylobacter jejuni*. Angabe von Gen-Symbol, Protein-Bezeichnung und Protein-Funktion.

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
AC010442.7 (Putative uncharacterized protein LOC116349 Precursor)	Unbekannt
AC061705.16 (Uncharacterized protein ENSP00000380804)	Unbekannt
AC138969.4 (NPIP-like protein 1)	Kern-Poren-Komplex-Interaktion
ACTR1A (Alpha-centractin)	Mikrotubuli-assoziiierter Vesikel Transport
ADCY5 (Adenylate cyclase type 5)	cAMP-Signalkaskade
ADRBK1 (Beta-adrenergic receptor kinase 1)	Adreno-Rezeptor-Phosphorylierung
AKT1 (Protein kinase B)	PI3K-Signalkaskade

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
AL928970.15 (N.N.)	Unbekannt
ANKRD16 (Ankyrin repeat domain-containing protein 16)	Translation
AP2S1 (AP-2 complex subunit sigma-1)	Clathrin abhängige Endozytose
ARHGAP28 (Rho GTPase-activating protein 28)	Organisation des Zytoskeletts
ARL8A (ADP-ribosylation factor-like protein 8A)	Axonaler Transport
ASMTL (N-acetylserotonin O-methyltransferase-like protein)	Nucleotid-Metabolismus
ATF4 (Activating transcription factor 4)	spezifischen Transkriptions-Faktor
BTBD2 (BTB/POZ domain-containing protein 2)	Neurogenese
BX890604.9 (Uncharacterized protein ENSP00000370496 fragment)	Unbekannt
CCDC130 (Coiled-coil domain-containing protein 130)	Teil des Spliceosoms
CCDC85C (Coiled-coil domain-containing protein 85C)	Entwicklung des cerebralen Kortex
CD151 (Tspan24)	Endozytose
CDK2AP2 (Cyclin-dependent kinase 2-associated protein 2)	Stamm-Zell-Proliferation
CDKN2C (Cyclin-dependent kinase 4)	Inhibitor C-Zell-Proliferation
CPE (Carboxypeptidase E precursor)	Neuropeptid-Synthese
DLL3 (Delta-like protein 3)	Neurogenese
DOM3Z (Dom-3 homolog Z)	RNA-Modifikation
EF1A2 (Elongation factor 1-alpha 2)	Regulation der Translation
EFS (Embryonal Fyn-associated substrate)	Zell-Migration
ERP29 (Endoplasmic reticulum protein Erp29)	Unbekannt
FADD (FAS-associated death domain protein)	Apoptose-Signalweg
FAM161A (Protein FAM161A)	Mikrotubuli-Organisation
FEZF2 (Fez family zinc finger protein 2)	Regulation dendritischer Verzweigung
FST (Follistatin)	Proteoglycan-Bindung
FSTL3 (Follistatin-related protein 3)	Fibronectin-Bindung
FUS (RNA-binding protein)	RNA-Stabilisierung
FVT1 (Follicular lymphoma variant translocation 1)	Sphingolipid-Synthese
GDI2 (Rab GDP dissociation inhibitor beta)	Signaltransduktion
GIYD2 (Structure-specific endonuclease subunit SLX1)	Endonuklease
GPD1 (Glycerol-3-phosphate dehydrogenase)	Gluconeogenese
GPR173 (G protein coupled receptor 173)	Gonadotropin-Stoffwechsel
GRAP2 (GRB2-related adapter protein 2)	T-Zell-Rezeptor-Signalweg

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
GUSBP3 (Putative Inactive Beta-Glucuronidase-Like Protein SMA3)	Mucopolysaccharid-Stoffwechsel
HDAC10 (Polyamine deacetylase HDAC10)	Histone-Acetylierung
HINT1 (Histidine triad nucleotide-binding protein 1)	Purin-Nukleotid-Modifikation
HNRNPAB (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B)	Transkription-Regulation
HSP90AB1 (Heat shock protein HSP 90-beta)	Heat-Shock-Protein, Protein-Faltung
IGFBP7 (Insulin-like growth factor-binding protein 7)	Modulation IGF-Growth-Factor-Signalweg
KIF18B (Kinesin-like protein KIF18B)	Mikrotubuli-Polymerisation
KIF5B (Kinesin-like protein KIF5B)	Microtubuli-Motorprotein
MAFF (Transcription factor MafF)	Transkriptions-Faktor
MAP1LC3A (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A)	Microtubuli-Bindung, Autophagosom-Bildung
MAZ (Myc-associated zinc finger protein)	Transkriptions-Faktor
MINDY3 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-3)	Apoptose-Signalweg
MLLT6 (Protein AF-17)	Transkriptionsfaktor
MRPL28 (39S ribosomal protein L28)	Mitochondriale Translation
MRPS11 (28S ribosomal protein S11)	Mitochondriale Translation
MRPS24 (28S ribosomal protein S24)	Mitochondriale Translation
NCAN (Neurocan)	Zell-Adhäsion/-Migration
NCKIPSD (NCK-interacting protein with SH3 domain)	Aktin-Bindung
NDRG4 (N-myc downstream-regulated gene 4)	Hydrolase
NFIX (Nuclear factor 1 X-type)	Transkriptions-Faktor
NPDC1 (Neural proliferation differentiation and control protein 1)	Regulation Immunantwort
NUBP2 (Nucleotide-binding protein 2)	Protein-Stoffwechsel; Neuriten-Bildung
NUDT16 (U8 snoRNA-decapping enzyme)	RNA-Decapping-Enzym
PGLS (6-phosphogluconolactonase)	Pentosephosphat-Stoffwechsel
PI4KB (Phosphatidylinositol 4-kinase beta)	Intrazelluläre Signalkaskade
PIN1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1)	Protein-Isomerisierung
PIP5K1C (Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 gamma)	Intrazelluläre Signalkaskade
PITPNM1 (Membrane-assoc. phosphatidylinositol transfer protein 1)	Zytoskelett
PLCB2 (Phospholipase C-beta-2)	Intrazelluläre Signalkaskade

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
PLXNA2 (Plexin-A2)	Semaphorin-Receptor, Axon-Reifung
PTBP1 (Polypyrimidine tract-binding protein 1)	Prä-mRNA-Splicing
PTK7 (Inactive tyrosine-protein kinase 7)	Wnt-Signalkaskade
RAB11B (Ras-related protein Rab-11B Intracellular)	Vesikel-Transport
RAI1 (Retinoic acid-induced protein 1)	Transkriptions-Faktor
RASD1 (Dexamethasone-induced Ras-related protein 1)	Transkriptions-Faktor
RASL10A (Ras-like protein family member 10A)	G-Protein, Intrazelluläre Signalkaskade
RBFOX3 (RNA binding protein fox-1 homolog 3)	Regulation Splicing
RNF10 (RING finger protein 10)	Transkriptions-Faktor
RP11-706O15.1 (HCG1981372, isoform CRA_c)	Regulation synaptischer Stoffwech- selvorgänge
RPRM (Protein reprimo)	Zell-Zyklus-Arrest
RPS27 (40S ribosomal protein S27)	Translation
SDC3 (Syndecan-3)	Zytoskelettale Organisation der Zellform
SELO (Selenoprotein O)	Protein-Adenylation
SEMA3B (Semaphorin-3B)	Axon-Reifung
SEMA6C (Semaphorin-6C)	Axon-Reifung
SLC17A7 (Vesicular glutamate transporter 1)	Glutamat-Aufnahme Präsynapse
SPEF1 (Sperm flagellar protein 1)	Zell-Migration
SREBF1 (Sterol regulatory element-binding protein 1)	Lipid-Metabolismus
STMN4 (Stathmin-4)	Mikrotubuli-Stabilität
STUB1 (E3 ubiquitin-protein ligase CHIP)	Protein-Ubiquitinylierung
SULT1A1 (Sulfotransferase 1A1)	Katecholamin-Metabolismus
SYT5 (Synaptotagmin 5)	Synaptisches Vesikel-Recycling
TACC2 (Transforming acidic coiled-coil-containing protein 2)	Mikrotubuli-interagierendes Protein
TFPI2 (Tissue factor pathway inhibitor 2)	Extrazellulär-Matrix-Organisation
THAP10 (THAP domain-containing protein 10)	Transkriptionsfaktor
TLCD2 TLC (domain-containing protein 2)	Regulation Membran-Fluidität
TMEM254 (Transmembrane protein 254)	Unbekannt
TOMM40 (Mitochondrial import receptor subunit TOM40 homolog)	Mitochondrium Protein-Transport
TUBB4 (Tubulin beta-4A chain)	Mikrotubuli-Polymerisation
UBC (Polyubiquitin-C)	Protein-Ubiquitinylierung
UFC1 (Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1)	Protein-Ubiquitinylierung

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
UQCERS1 (Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske)	Mitochondriale Atmungskette
USP3 (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3)	Histon-Stabilität
WASHC1 (WASH complex subunit 1)	Vesikel-Transport
ZMAT2 (Zinc finger matrin-type protein 2)	mRNA-Splicing
ZNF133 (Zinc finger protein 133)	Transkriptions-Faktor
ZNF553 (Zinc finger protein 553)	Transkriptions-Faktor
ZNF692 (Zinc finger protein 692)	Transkriptions-Faktor

3.1.3 Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Helicobacter pylori*

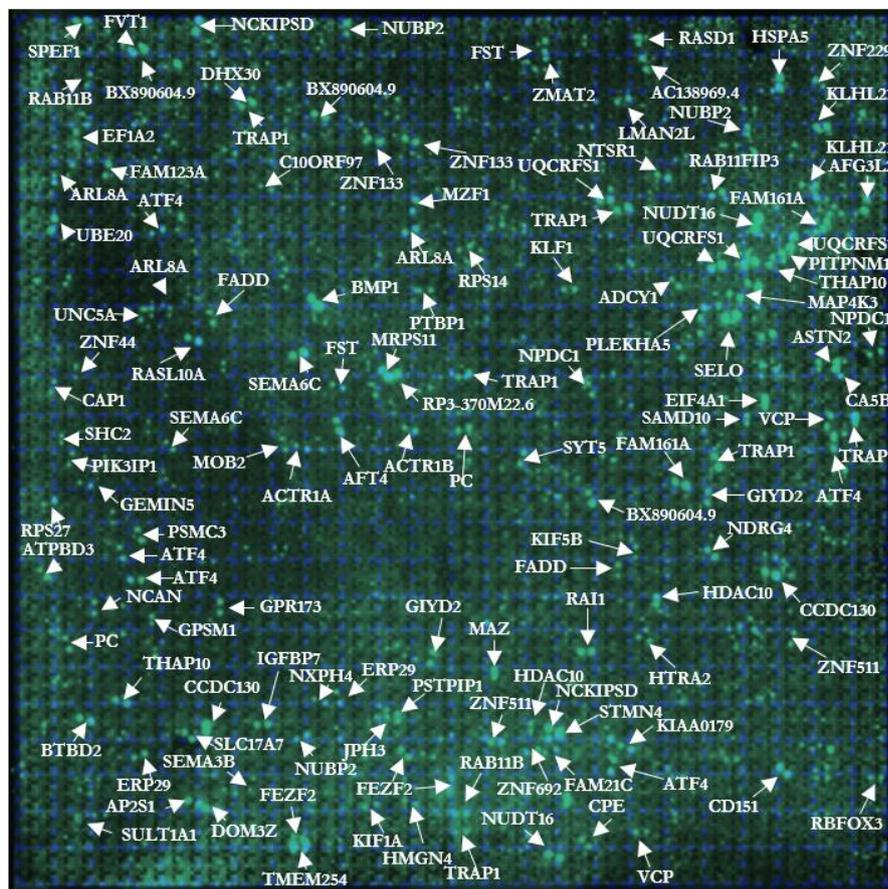


Abbildung 8: Darstellung der Interaktionen des Antikörpers gegen *Helicobacter pylori* mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels MPA. Identifizierte Immun-Spots sind mit Gen-Symbolen bezeichnet und mit Pfeilen markiert.

Tabelle 11: Identifizierte Protein-Interaktions-Partner des Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörpers. Alphabetisch-sortierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Helicobacter pylori*. Angabe von Gen-Symbol, Protein-Bezeichnung und Protein-Funktion.

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
AC138969.4 (NPIP-like protein 1)	Kern-Poren-Komplex-Interaktion
ACTR1A (Alpha-centractin)	Intrazellulärer Vesikel-Transport
ACTR1B (Beta-centractin)	Intrazellulärer Vesikel-Transport
ADCY1 (Adenylate cyclase type 1)	cAMP-Signalkaskade
AFG3L2 (Paraplegin-like protein)	Mitochondriale Protease
AP2S1 (AP-2 complex subunit sigma-1)	Clathrin-abhängige Endozytose
ARL8A (ADP-ribosylation factor-like protein 8A)	Axonaler Transport
ASTN2 (Astrotactin-2)	Neuronale Migration und axonales Wachstum
ATF4 (Activating transcription factor 4)	Transkriptions-Faktor
ATPBD3 (ATP-binding domain-containing protein 3)	t-RNA-Modifikation
BMP1 (Bone morphogenetic protein 1)	Endopeptidase
BTBD2 (BTB/POZ domain-containing protein 2)	Neurogenese
BX890604.9 (Uncharacterized protein ENSP00000370496 Fragment)	Unbekannt
CA5B (Carbonic anhydrase 5B)	Bikarbonat-Transport
CAP1 (Adenylyl cyclase-associated protein 1)	Organisaton des Zytoskeletts
CCDC130 (Coiled-coil domain-containing protein 130)	Teil des Spliceosomes
CD151 (Tspan24)	Endozytose
CPE (Carboxypeptidase E Precursor)	Neuropeptid-Synthese
DHX30 (Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30)	Neurogenese
DOM3Z (Dom-3 homolog Z)	RNA-Modifikation
EF1A2 (Elongation factor 1-alpha 2)	Translations-Faktor
EIF4A1 (Eukaryotic initiation factor 4A-I)	Translations-Faktor
ERP29 (Endoplasmic reticulum protein Erp29)	Unbekannt
FADD (FAS-associated death domain protein)	Apoptose-Signalweg
FAM123A (APC membrane recruitment protein 2)	Wnt-Signalweg
FAM161A (Protein FAM161A)	Mikrotubuli-Organisation
FAM21C (WASH complex subunit 2C)	Vesikel-Transport
FEZF2 (Fez family zinc finger protein 2)	Regulation der dendritischen Verzweigung
FKBP8 (FK506-binding protein 8)	Ausbildung des Neuralrohrs

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
FST (Follistatin)	Proteoglycan-Bindung
FVT1 (Follicular lymphoma variant translocation 1)	Sphingolipid-Synthese
GEMIN5 (Gem-associated protein 5)	Translation
GIYD2 (Structure-specific endonuclease subunit SLX1)	Endonuklease
GPR173 (G protein coupled receptor 173)	Gonadotropin-Stoffwechsel
GPSM1 (G protein-signaling modulator 1)	G-Protein, intrazelluläre Signalkaskade
HDAC10 (Polyamine deacetylase HDAC10)	Histone-Acetylierung
HMGN4 (High mobility group nucleosome protein 4)	Chromatin-Organisation
HSPA5 (Heat shock protein family A member 5)	Heat-Shock-Protein, Protein-Faltung
HTRA2 (Serine protease HTRA2)	Endopeptidase
IGFBP7 (Insulin-like growth factor-binding protein 7)	Modulation Growth-Factor-Signalweg
JPH3 (Junctophilin-3)	Synaptische Plastizität
KIAA0179 (Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B)	Apoptose-Regulation
KIF1A (Kinesin-like protein KIF1A)	Microtubuli-Motorprotein
KIF5B (Kinesin-like protein KIF5B)	Microtubuli-Motorprotein
KLF1 (Krueppel-like factor 1)	Transkriptions-Faktor
KLHL21 (Kelch-like protein 21)	Protein-Ubiquitylierung
LMAN2L (VIP36-like protein)	Vesikel-Transport
MAP4K3 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3)	MAP-Kinase-Signalkaskade
MAZ (Myc-associated zinc finger protein)	Transkriptions-Faktor-Bindung
MOB2 (MOB kinase activator 2 Actin)	Promotor Autophosphorylierung
MRPS11 (28S ribosomal protein S11)	Mitochondriale Translation
MZF1 (Myeloid zinc finger 1)	Transkriptions-Faktor
NCAN (Neurocan)	Zell-Adhäsion und Migration
NCKIPSD (NCK-interacting protein with SH3 domain)	Aktin-Bindung
NDRG4 (N-myc downstream-regulated gene 4)	Hydrolase
NPDC1 (Neural proliferation differentiation and control protein 1)	Regulation der Immunantwort
NTSR1 (Neurotensin receptor type 1)	Neuropeptid-Signalkaskade
NUBP2 (Nucleotide-binding protein 2)	Protein-Stoffwechsel; Neuriten-Bildung
NUDT16 (U8 snoRNA-decapping enzyme)	RNA-Decapping-Enzym
NXPH4 (Neurexophilin-4)	Neuropeptid-Signalkaskade
PC (Pyruvate carboxylase)	Gluconeogenese

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
PIK3IP1 (Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1)	Intrazelluläre Signalkaskade
PITPNM1 (Membrane-assoc. phosphatidylinositol transfer protein 1)	Zytoskellet
PLEKHA5 (Pleckstrin homology domain-cont. Family A member 5)	Intrazelluläre Signalkaskade
PSMC3 (26S proteasome regulatory subunit 6A)	MAP-Kinase-Kaskade
PSTPIP1 (Prol-ser-threo phosphatase-interacting protein 1)	Aktion-Zytoskelett-Organisation
PTBP1 (Polypyrimidine tract-binding protein 1)	Prä-mRNA-Splicing
RAB11B (Ras-related protein Rab-11B)	Vesikel-Transport
RAB11FIP3 (Rab11 family-interacting protein 3)	Intrazellulärer Vesikel-Transport
RAI1 (Retinoic acid-induced protein 1)	Transkription
RASD1 (Dexamethasone-induced Ras-related protein 1)	Transkriptions-Faktor
RASL10A (Ras-like protein family member 10A)	G-Protein, Intrazelluläre Signalkaskade
RBFOX3 (RNA binding protein fox-1 homolog 3)	Regulation Splicing
RP3-370 (M22.6 N.N.)	Unbekannt
RPS14 (40S ribosomal protein S14)	Translation
RPS27 (40S ribosomal protein S27)	Translation
SAMD10 (Sterile alpha motif domain-containing protein 10)	Unbekannt
SELO (Selenoprotein O)	Protein-Adenylierung
SEMA3B (Semaphorin-3B)	Axon-Reifung
SEMA6C (Semaphorin-6C)	Axon-Reifung
SHC2 (SH2 domain-containing-transforming protein C2)	MAP-Kinase-Kaskade
SLC17A7 (Vesicular glutamate transporter 1)	Glutamat-Aufnahme Präsynapse
SPEF1 (Sperm flagellar protein 1)	Zell-Migration
STMN4 (Stathmin-4 Microtubular)	Mikrotubuli-Stabilität
SULT1A1 (Sulfotransferase 1A1)	Katecholamin-Metabolismus
SYT5 (Synaptotagmin 5)	Synaptisches Vesikel-Recycling
THAP10 (THAP domain-containing protein 10)	Transkriptions-Faktor
TMEM254 (Transmembrane protein 254)	Unbekannt
TRAP1 (Heat shock protein 75 kDa)	Heat-Schock-Protein, Mitochondrium
UBE20 (E3-independent) (E2 ubiquitin-conjugating enzyme)	Protein-Ubiquitylierung
UNC5A (Netrin receptor UNC5A)	Neuriten-Wachstum
UQCRC1 (Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske)	Teil der Atmungskette
VCP (Valosin-containing protein)	Hydrolase

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
ZMAT2 (Zinc finger matrinxin-type protein 2)	mRNA-Splicing
ZNF133 (Zinc finger protein 133)	Transkriptions-Faktor
ZNF229 (Zinc finger protein 229)	Transkriptions-Faktor
ZNF44 (Zinc finger protein 44)	Transkriptions-Faktor
ZNF511 (Zinc finger protein 511)	Transkriptions-Faktor
ZNF692 (Zinc finger protein 692)	Transkriptions-Faktor

3.1.4 Identifizierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Toxoplasma gondii*



Abbildung 9: Darstellung der Interaktionen des Antikörpers gegen *Toxoplasma gondii* mit Proteinen des pränatalen fötalen Gehirns mittels MPA. Identifizierte Immun-Spots sind mit Gen-Symbolen bezeichnet und mit Pfeilen markiert.

Tabelle 12: Identifizierte Protein-Interaktions-Partner des Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörpers. Alphabetisch-sortierte Interaktions-Partner des Antiserums gegen *Toxoplasma gondii*. Angabe von Gen-Symbol, Protein-Bezeichnung und Protein-Funktion.

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
AFP (Alpha Fetoprotein)	Post-translationale Protein-Modifikation
AL110504.6 (Nicht charakterisiert)	Unbekannt
BRF2 (BRF2 RNA polymerase III transcription initiation factor subunit)	Regulation der Transkription
CPLX2 (Complexin 2)	Regulation der Exozytose
CYLN2 (CAP-Gly domain containing linker protein 2)	Mikrotubuli Organisation
EDF1 (Endothelial differentiation related factor 1)	Regulation der Transkription
FAM21C (WASH complex subunit 2C)	Protein Transport
H2AFY (MacroH2A.1 Histone)	Chromatin Bindung, Histonkomplex
MEIS3 (Meis homeobox 3)	Regulation der Transkription
MLXIP (MLX interacting Protein)	Regulation der Transkription
NCOR2 (Nuclear receptor corepressor 2)	Regulation der Transkription
NPDC1 (Neural proliferation, differentiation and control 1)	Regulation der Immunantwort
NUMA1 (Nuclear mitotic apparatus protein 1)	Mitosespindel Organisation
OSBPL7 (Oxysterol binding Protein like 7)	Katecholamin Signalweg
PALM (Paralemmin)	Regulation der Zellform
PDHA1 (Pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1)	Glukose-Stoffwechsel
PDPK1 (3-Phosphoinositide dependent Protein Kinase 1)	Intrazelluläre Signaltransduktion
RBM10 (RNA binding motif protein 10)	Regulation der Transkription
RPLP0 (Ribosomal protein lateral stalk subunit P0)	Translation
RPS27A (Ribosomal Protein S27a)	Translation
SDC3 (Syndecan 3)	Zytoskelettale Organisation der Zellform
SELO (Selenoprotein O)	Post-translationale Proteinmodifikation
SFXN2 (Sideroflexin 2)	Mitochondrialer Transmembran-Transport
SNAP23 (Synaptosome associated protein 23)	Teil des SNARE-Exozytose-Komplexes
SSPO (SCO-Spondin)	Zentralnervöse Entwicklung
STIP1 (Stress induced phosphoprotein 1)	Interleukin-7 Signalweg
SULT1A1 (Sulfotransferase family 1A member 1)	Amin-Stoffwechsel
TSC2 (TSC complex subunit 2)	Regulation der Endozytose

Gen-Symbol und Protein-Bezeichnung	Protein-Funktion
UBC (Ubiquitin C)	Protein-Ubiquitinylierung
UFC1 (Ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1)	Protein-Ubiquitinylierung
VPS16 (VPS16 core subunit of CORVET and HOPS complexes)	Regulation der Exozytose
ZC3H10 (Zinc finger CCCH-type containing 10)	Regulation mRNA-Splicing

3.2 Bestätigung ausgewählter immunreaktiver Interaktions-Partner der Antiseren gegen *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* und *Toxoplasma gondii* anhand von Überexpressions-Lysaten spezifisch transfizierter-HEK293-Zellen

Zur Bestätigung der Interaktionen der Erreger-spezifischen Antikörper mit einigen der Proteine des *bEXselect*-Multiprotein-Arrays, wurden Western Blot Analysen mit kommerziell erhältlichen hochkonzentrierten Proben dieser Moleküle durchgeführt. Dabei handelte es sich um Zell-Lysate von HEK293-Zellen, welche mit Expressions-Vektoren des jeweiligen Proteins transient transfiziert worden waren. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde anschließend durch Western Blot-Analyse die Interaktion des jeweiligen Erreger-spezifischen Antiserums mit dem entsprechenden Protein in folgenden Paarungen getestet: ASTN2 mit Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörper, CPLX2 mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper, ERBB3 mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper, SYT5 mit Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörper sowie SYT5 mit Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörper. Um die Spezifität der Bindung der verwendeten Antiseren mit den überexprimierten Proteinen nachzuweisen, wurde zur Kontrolle auch ein Zell-Lysat von nicht-transfizierten HEK293-Zellen untersucht.

3.2.1 Western-Blot-Analyse mit transfizierten HEK293-Überexpressions-Zell-Lysaten

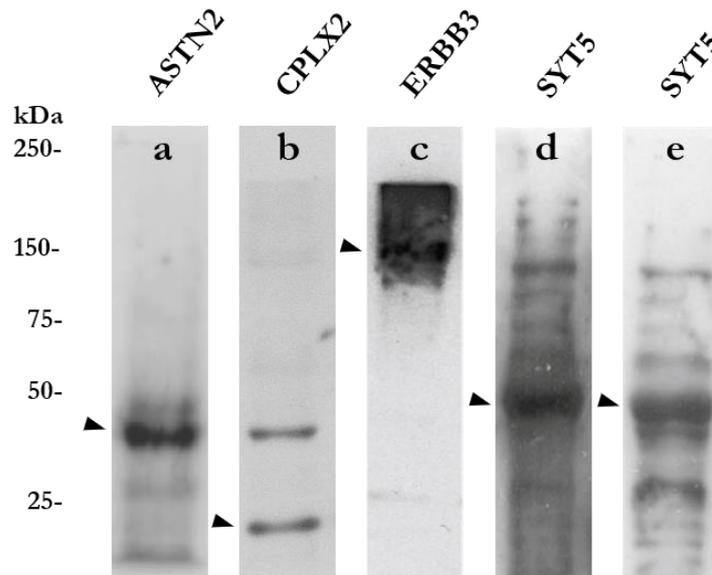


Abbildung 10: Western Blot mit ASTN2-transfizierten, CPLX2-transfizierten-, ERBB3-transfizierten- und SYT5-transfizierten HEK-293-Zell-Lysaten. (a) Immunbande des Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörpers mit ASTN2-transfiziertem HEK293-Überexpressions-Zell-Lysat. (b) Immunbande des Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörpers mit CPLX2-transfiziertem HEK293-Überexpressions-Zell-Lysat. (c) Immunbande des Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörpers mit ERBB3-transfiziertem HEK293-Überexpressions-Zell-Lysat. (d) Immunbande des Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörpers mit SYT5-transfiziertem HEK293-Überexpressions-Zell-Lysat. (e) Immunbande des Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörpers mit SYT5-transfiziertem HEK293-Überexpressions-Zell-Lysat.

Wie in Abbildung 10 gezeigt, zeigt sich für ASTN2 eine deutliche Immunbande des Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörpers bei unter 50 kDa was dem zu erwarteten Molekulargewicht dieses Proteins von 49,6 kDa entspricht. Ebenfalls zeigt sich für CPLX2 eine Immunbande des Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörpers bei unter 25 kDa. Dies entspricht ebenfalls dem erwarteten Molekulargewicht von 15,4 kDa. Zu erkennen ist für ERBB3 eine deutliche Bande des Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörpers bei 150 kDa, was ebenfalls dem zu erwartenden Molekulargewicht von 148 kDa entspricht. Sowohl mit dem Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörper als auch dem Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörper kann für SYT5 bei unter 50 kDa eine starke Bande erkannt werden, was dem erwarteten Wert für dieses Protein von 42,9 kDa entspricht.

3.2.2 Nachweis der Expression ausgewählter Proteine in verschiedenen Zell-Linien

Um funktionelle Effekte der immunologischen Interaktionen Erreger-spezifischer Antiseren auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, wurde zunächst die Expression ausgewählter Interaktions-Partner (ASTN2, CPLX2, ERBB3 und SYT5) in den Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D durch ein- und zwei-dimensionale Western Blot Analyse sowie

durch Immunfluoreszenz-Färbung untersucht. Bei der Western Blot-Analyse handelt es sich um eine Auftrennung eines Protein-Gemisches nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine durch eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Bei der 2D-Gelelektrophorese geht der SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese noch eine isoelektrische Fokussierung voraus. Dies erlaubt eine differenziertere Auftrennung komplexer Proteingemische anhand mehrerer proteinspezifischer Eigenschaften wie des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punkts. Im vorliegenden Fall wurden bei beiden Verfahren die Proteine im Anschluss an die Auftrennung auf PVDF-Membranen übertragen, die dann mit spezifischen anti-mikrobiellen-Antikörpern inkubiert wurden. Darauf folgte die Inkubation der Membranen mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundärem Antikörper, dessen Verteilung dann mit einer ECL-Reaktion mit Röntgenfilmexposition detektierbar gemacht wurde. Anschließend wurden die Membranen mit einer 0,1 molaren NaOH-Lösung behandelt, um gebundene Antikörper wieder von den Proteinen und den Membranen zu lösen (*Stripping*). Derart behandelte Membranen wurden dann in einer zweiten Inkubationsrunde mit Protein-spezifischen Antikörpern inkubiert, um die untersuchten Proteine ASTN2, CPLX2, ERBB3 und SYT5 darzustellen. Durch Überlagerung der Ergebnisse mit den Erreger-spezifischen Antikörpern, mit denen der proteinspezifischen Antikörper kann anhand der Ko-Lokalisation der Signale die Interaktion der ersteren mit den letzteren aufgezeigt werden. Zur Kontrolle der Sekundär-Antikörper wurden PVDF-Membranen nur mit Sekundär-Antikörper behandelt und mittels ECL-Reaktion überprüft, ob unspezifische Bindungen mit den Proteinen der verwendeten Zell-Lysate vorliegen. Dies war nicht der Fall. Als Molekulargewichts-Marker wurde der *Precision Plus Protein All Blue Standard* (Bio-Rad, München) verwendet und mit der vom Hersteller angegebenen Größenaufteilung dargestellt.

3.2.3 Untersuchung der Expression identifizierter Interaktions-Partner Erreger-spezifischer Antiseren in den Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D durch ein- und zwei-dimensionale Western-Blot-Analyse

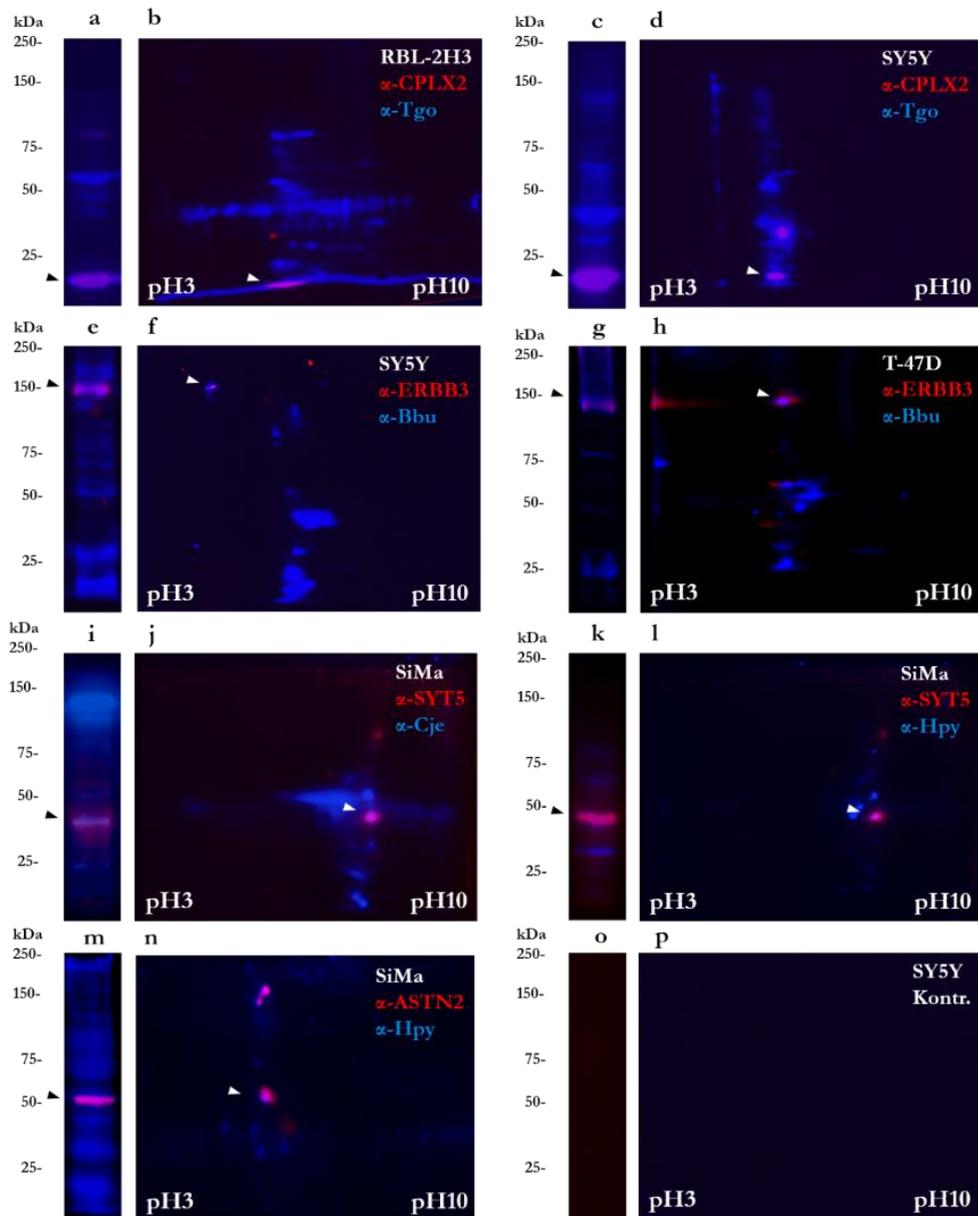


Abbildung 11: Interaktion der anti-mikrobiellen-Antikörper mit den Zell-Lysaten der Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D, dargestellt durch Western Blot-Analyse und 2D-Gelelektrophorese. (a-b) Falschfarben-Überlagerung von ein- bzw. zwei-dimensionalen Western Blot Analysen mit Proteinen der Zell-Linie RBL-2H3, die nacheinander zuerst mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörpern (blau) und dann mit Anti-CPLX2-Antikörpern (rot) inkubiert worden sind. (c-d) Falschfarben-Überlagerung von ein- bzw. zwei-dimensionalen Western Blot Analysen mit Proteinen der Zell-Linie SH-SY5Y, die nacheinander zuerst mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörpern (blau) und dann mit Anti-CPLX2-Antikörpern (rot) inkubiert worden sind. (e-f) Falschfarben-Überlagerung von ein-, bzw. zwei-dimensionalen Western Blot Analysen mit Proteinen der Zell-Linie SH-SY5Y, die nacheinander zuerst mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörpern (blau) und dann mit Anti-ERBB3-Antikörpern (rot) inkubiert worden sind. (g-h) Falschfarben Überlagerung von ein-, bzw. zwei-dimensionalen Western Blot Analysen mit Proteinen der Zell-Linie T-47D, die nacheinander zunächst mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörpern (blau) und dann Anti-ERBB3-Antikörpern (rot) inkubiert worden sind. (i-j)

Falschfarben-Überlagerung von ein-, bzw. zwei-dimensionalen Western Blot Analysen mit Proteinen der Zell-Linie SiMa, die nacheinander zunächst mit Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörpern (blau) und dann mit Anti-SYT5-Antikörpern (rot) inkubiert worden sind. (k-l) Falschfarben-Überlagerung von ein-, bzw. zwei-dimensionalen Western Blot Analysen mit Proteinen der Zell-Linie SiMa, die nacheinander zunächst mit Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörpern (blau) und dann mit Anti-SYT5-Antikörpern (rot) inkubiert worden sind. (m-n) Falschfarben-Überlagerung von ein-, bzw. zwei-dimensionalen Western Blot Analysen mit Proteinen der Zell-Linie SiMa, die nacheinander zunächst mit Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörpern (blau) und dann mit Anti-ASTN2-Antikörpern (rot) inkubiert worden sind. (o-p) Falschfarben-Überlagerung von ein-, bzw. zwei-dimensionalen Western Blot Analysen mit Proteinen der Zell-Linie SH-SY5Y die jeweils nur mit den Sekundär-Antikörpern inkubiert worden sind. Im Überlagerungsbild zeigt sich eine Ko-Lokalisation anhand der Pink-Färbung einzelner Banden bzw. Protein-Spots.

Wie in Abbildung 11 zu sehen, zeigte sich für den Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper (blau) sowohl in RBL-2H3- (Abbildung 11; a, b) als auch in SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 11; c, d) eine Ko-Lokalisation mit einer/m von einem spezifisch gegen das Protein CPLX2 gerichteten Antikörper markierten Bande bzw. Spot (rot) anhand der Violett-Färbung im Überlagerungsbild. Das Molekulargewicht lag dabei bei etwas unter 25 kDa und der isoelektrische Punkt etwa bei pH 5. Diese Werte decken sich in etwa mit den für CPLX2 in der Literatur berichteten Werten des Molekulargewichts von 15,4 kDa und einem isoelektrischen pH-Wert von 4,99. Der Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper zeigte sowohl mit SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 11; e, f) als auch mit T-47D-Zellen (Abbildung 11; g, h) eine/n mit dem gegen das Protein ERBB3 spezifisch gerichteten Antikörper überlagernde/n violett erscheinende/n Bande bzw. Spot bei einem Molekulargewicht von 150 kDa und einem isoelektrischen pH-Wert von 6, was den aus der Literatur für ERBB3 bekannten Werten eines Molekulargewichts von 148 kDa und einem isoelektrischen pH-Wertes von 5,8 entspricht. Auch die gegen die Bakterien *Helicobacter pylori* (Abbildung 11; i, j) und *Campylobacter jejuni* (Abbildung 11; k, l) gerichteten Antikörper weisen mit einem Zell-Lysat der SiMa-Zell-Linie jeweils eine/n überlagernde/n Immunbande bzw. Spot mit dem spezifischen Antikörper gegen das Protein SYT5 mit einem Molekulargewicht von etwas unter 50 kDa und einem isoelektrischen pH-Wert von 9 auf. Dies entspricht den aus der Literatur bekannten Werten eines Molekulargewichts von 43 kDa und einem isoelektrischen pH-Wert von 9,3. Eine Überlagerung der/s Immunbande bzw. Spots eines Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörpers und einem spezifisch gegen das Protein ASTN2 gerichteten Antikörper (Abbildung 11; m, n) konnte bei 50 kDa dargestellt werden und liegt dabei nahe des isoelektrischen pH-Wertes von ASTN2 von 5,6. Negativ-Kontrollen mit dem Sekundär-Antikörper allein, wurden mit dem Lysat der Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D mit gleichem negativem Ergebnis durchgeführt. Stellvertretend für alle Kontrolle-Ergebnisse wird hier das Ergebnis für SH-SY5Y-Zellen als Negativ-Kontrolle gezeigt (Abbildung 11; o, p).

3.2.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit RBL-2H3-, SiMa-, SH-SY5Y- und T-47D-Zellen

Als weiterer Expressionsnachweis und zur Bestimmung der subzellulären Lokalisierung der Proteine wurden Immunfluoreszenz-Aufnahmen von RBL-2H3-, SiMa-, SH-SY5Y- und T-47D-Zellen erstellt, bei denen das jeweilige Antigen (ASTN2, CPLX2, ERBB3 oder SYT5) mit entsprechenden Antikörpern markiert worden ist. Die Zellen wurden dafür nach erfolgreicher Fixierung mittels 4 % -Paraformaldehyd und Permeabilisierung mit einem Aceton/Methanol-Gemisch mit den Protein-spezifischen Antikörpern primär inkubiert. Folgend auf eine Inkubation mit einem Sekundär-Antikörper und Eindecken mit einem DAPI-haltigem *Mounting-Medium* wurden Aufnahmen mit einem auf einem Aufricht-Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, Zeiss Jena, Deutschland) montierten digitalen Kamera-System (Axiocam Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt. Als Kontrollen wurden Aufnahmen von nur mit Sekundär-Antikörper behandelten Zellen erstellt.

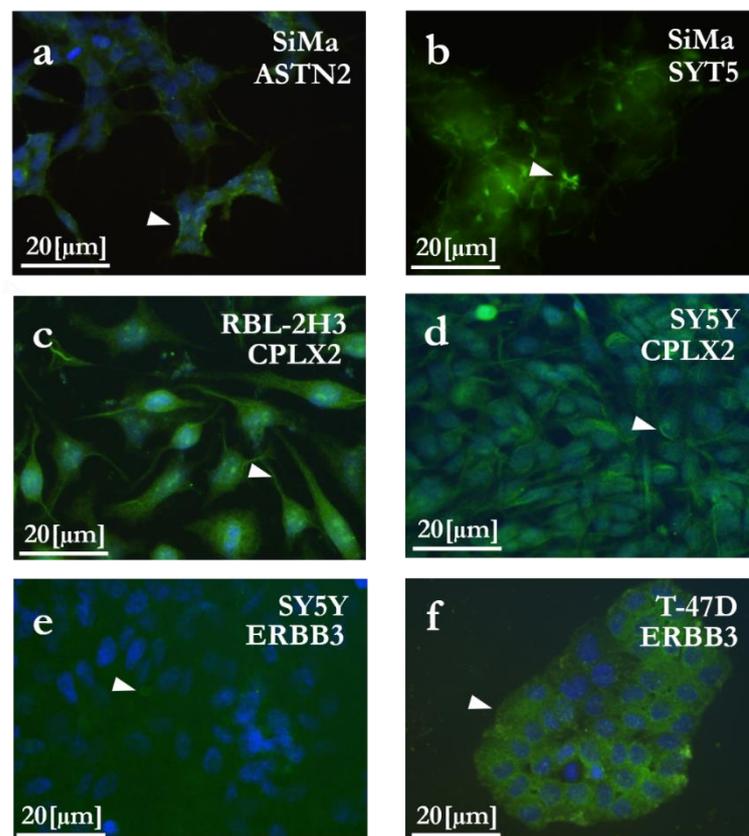


Abbildung 12: Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit RBL-2H3-, SiMa-, SH-SY5Y- und T-47D-Zellen. (a) ASTN2-Signal in SiMa-Zellen (grün). (b) SH-SYT5-Signal in SiMa-Zellen (grün). (c) CPLX2-Signal in RBL-2H3-Zellen (grün). (d) CPLX2-Signal in SH-SY5Y-Zellen (grün). (e) ERBB3-Signal in SH-SY5Y-Zellen (grün). (f) ERBB3-Signal in T-47D-Zellen (grün). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau).

Wie auf Abbildung 12 zu sehen ist, konnten starke Signale für ASTN2 (Abbildung 12; a) und SYT5 (Abbildung 12; b) in SiMa-Zellen nachgewiesen werden. ASTN2 zeigt das stärkste Signal an der Oberfläche der SiMa-Zellen. SYT5 zeigt ein für das Protein typisches Verteilungsmuster, da es in der Zell-Peripherie in der Nähe von Zell-Zell-Kontakten akkumuliert.

CPLX2 zeigt sowohl in RBL-2H3- (Abbildung 12; c) als auch bei SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 12; d) ein gesprenkelt-zytoplasmatisches Verteilungsmuster mit filamentös-fibrillären Akkumulationen. ERBB3 konnte in SH-SY5Y-Zellen (Abbildung 12; e) nur schwach positiv dargestellt werden, eine subzelluläre Lokalisation ist nur eingeschränkt beurteilbar. T-47D-Zellen (Abbildung 12; f) zeigen hingegen ein starkes ERBB3-Signal, welches sich feingranulär in Zytoplasma und an der Zell-Oberfläche darstellt. Es wurden keine unspezifischen Signale in der Sekundär-Antikörper-Kontrolle nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

3.3 Messung des Neuriten-Längen-Wachstums von mit Antiseren gegen ASTN2 und *Helicobacter pylori* behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen

Die Ausbildung neuronaler Netzwerke durch das Auswachsen von Nerven-Zell-Fortsätzen, sogenannten Neuriten, stellt eine wesentliche Grundlage für den synaptischen Informationsaustausch des Nerven-Systems dar. Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass die zuvor gezeigte Interaktion des Antiserums gegen *Helicobacter pylori* mit ASTN2 diesen Prozess beeinflussen könnte. Um einen derartigen Effekt der Interaktion des Antiserums gegen *Helicobacter pylori* mit ASTN2 auf das Neuriten-Wachstum zu untersuchen, wurden daher SiMa-Neuroblastom-Zellen mit dem Antiserum gegen *Helicobacter pylori* vorbehandelt. Nach 12, 24 und 48 Stunden wurden dann mikroskopische Aufnahmen erstellt, auf denen anschließend die Länge von jeweils 100 Neuriten mit einem Bild-Verarbeitungsprogramm (ImageJ) vermessen und mit einem Tabellenkalkulations-Programm (OpenOffice-Calc) statistisch ausgewertet wurden. Verglichen wurden die Neuriten-Längen mit einer nicht vorbehandelten SiMa-Neuroblastom-Zell-Kontrolle. Um den Effekt einer spezifischen Interaktion mit dem Protein ASTN2 zur Kontrolle darzustellen, wurden SiMa-Neuroblastom-Zellen auch mit einem spezifischen Antiserum gegen dieses Protein vorbehandelt und die Neuriten-Längen in gleicher Weise vermessen und ausgewertet. Da eine Interaktion eines Antiserums gegen *Campylobacter jejuni* mit dem Protein ASTN2 nicht nachgewiesen worden war, wurde als Spezifitäts-Kontrolle das Neuriten-Wachstum auch in SiMa-Neuroblastom-Zellen untersucht, die mit einem Antikörper gegen *Campylobacter jejuni* vorbehandelt worden waren.

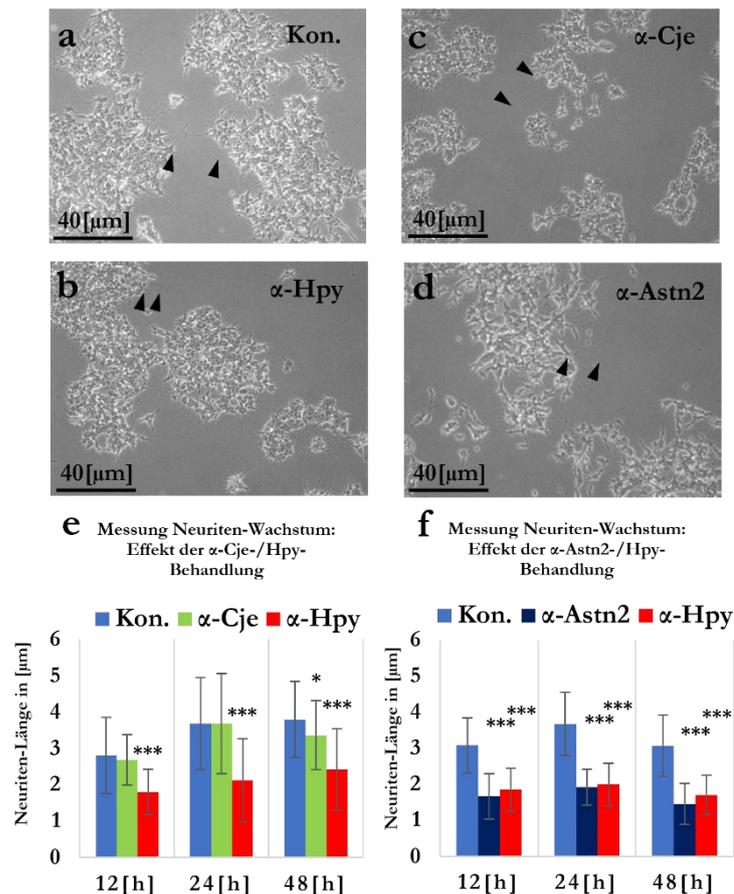


Abbildung 13: Messung des Neuriten-Wachstums von nicht-behandelten und mit Anti-*Campylobacter jejuni*-/ Anti-*Helicobacter pylori*- und Anti-ASTN2-Antikörper behandelten SiMa-Zellen. Neuriten-Länge nach 48 Stunden, aufgenommen bei 20-facher Vergrößerung. (a) Unbehandelte SiMa-Zell-Kontrolle. (b) Mit Antiserum gegen *Helicobacter pylori* behandelte SiMa-Zellen. (c) Mit Antiserum gegen *Campylobacter jejuni* behandelte SiMa-Zellen. (d) Mit Antikörper gegen das Protein ASTN2 behandelte SiMa-Zellen. (e-f) Statistische Auswertung des Neuriten-Längen-Wachstums von nicht-behandelten und mit Antiseren behandelten SiMa-Zellen, Messungen jeweils nach 12, 24 und 48 Stunden.

Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, konnte eine Signifikante Reduktion des Neuriten-Wachstums von mit Antiserum gegen *Helicobacter pylori* behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen festgestellt werden (Abbildung 13; a, b, e). Dies zeigte sich in einer signifikant kürzeren Neuriten-Länge um $1,21 \mu\text{m}$ (40 %) nach zwölf Stunden bzw. um $1,67 \mu\text{m}$ (46 %) und $1,36 \mu\text{m}$ (45 %) jeweils nach 24 oder 48 Stunden ($***p < 0,001$). Für die mit Antiserum gegen *Campylobacter jejuni* behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen (Abbildung 13; a, c, e) konnte nach 12 bzw. 24 Stunden keine signifikante Änderung des Neuriten-Wachstums gemessen werden, bei der Messung nach 48 Stunden konnte eine signifikante Änderung der Neuriten-Länge im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle um $0,4 \mu\text{m}$ (12 %) ermittelt werden ($*p < 0,05$). Bei einem vergleichbaren Versuch mit ASTN2-Antiserum behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen (Abbildung 13; a, d, f), konnte im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle ebenfalls eine signifikante Reduktion des Neuriten-Wachstums beobachtet werden ($***p < 0,001$). Auch in diesem Fall zeigte sich eine kürzere Neuriten-Länge von

1,4 μm (55 %) nach zwölf Stunden bzw. von 1,75 μm (48 %) und 1,6 μm (53 %) nach 24 und 48 Stunden (***) ($p < 0,001$) (siehe auch Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 13: Statistische Auswertung des Neuriten-Wachstums-Tests mit behandelten SiMa-Zellen.

Die Test-Ansätze (Testansätze 1/2) mit nicht-behandelter Kontrolle und ASTN2-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der Neuriten-Länge in μm , Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	SiMa-Kontrolle			SiMa- α -ASTN2		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
	Mittelwert der Neuriten-Länge in μm (Ansatz 1/2)	3,062/ 2,823	3,66/ 3,674	3,06/ 3,786	1,657	1,91
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	100 %	100 %	54 %	52 %	47 %
P-Wert	-	-	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Standardabweichung (Ansatz 1/2)	0,761/ 1,05	0,88/ 1,26	0,84/ 1,04	0,629	0,497	0,564

Tabelle 14: Statistische Auswertung des Neuriten-Wachstums-Tests mit behandelten SiMa-Zellen.

Die Test-Ansätze mit *Campylobacter jejuni*-Antikörper-behandelt und *Helicobacter pylori*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der Neuriten-Länge in μm , Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	SiMa- α -Cje			SiMa- α -Hpy		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
Mittelwert der Neuriten-Länge in μm (Ansatz 1/2)	2,701	3,706	3,386	1,844/ 1,814	1,984/ 2,14	1,697/ 2,413
Verhältnis zur Kontrolle	96 %	99 %	88 %	60 % / 64 %	54 % / 58 %	55 % / 64 %
P-Wert	0,121	0,49	0,003	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Standardabweichung (Ansatz 1/2)	0,693	1,387	0,944	0,592/ 0,62	0,593/ 1,15	0,564/ 1,115

3.4 FM1-43-Vesikel-Umsatz-Test mit SiMa- und SH-SY5Y-Zellen

Die Exozytose neurosynaptischer Vesikel in den synaptischen Spalt zwischen Prä- und Postsynapse hinein sowie die Wiederaufnahme der Vesikel-Membran des entleerten Exosoms, stellt die wesentliche Grundlage der Erregungsleitung zwischen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems dar. Ein komplexer Mechanismus aus Protein-Protein-Molekül-Interaktionen macht diesen Prozess möglich. Eine entscheidende funktionelle Rolle kommt dabei dem SNARE-Komplex zu, einem Protein-Komplex, an dem unter anderem auch die im vorangegangenen Kapitel identifizierten Interaktions-Partner Erreger-spezifischer Antiseren CPLX2 und SYT5 beteiligt sind. Um einen Effekt der Interaktion des Antiserums gegen *Toxoplasma gondii* mit dem SNARE-Komplex-Protein CPLX2 und der Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* mit dem SNARE-Komplex-Protein SYT5 auf die Exo- und Endozytose-Leistung neuronaler Zell-Linien zu messen, wurde der FM1-43-Vesikel-Umsatz-Test durchgeführt. Der fluoreszierende Farbstoff FM1-43 ((N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(4-(Dibutylamino)Styryl) Pyridinium-Dibromid) wird dabei von Exozytose betreibenden Zellen infolge des anschließenden Vesikel-Recyclings aufgenommen und kann dann mit dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden. Die Intensität des Farbstoffes kann densitometrisch gemessen werden und erlaubt so eine Aussage über die Exo- und Endozytose-Leistung der untersuchten Zellen. Für diese Untersuchungen wurden SH-SY5Y- und SiMa-Zellen jeweils für zwölf Stunden mit entsprechenden Antiseren vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen in eine Aufnahme-Kammer transferiert und permanent mit einer Standard-Perfusions-Lösung bei Raumtemperatur mit 5 ml/min perfundiert. FM1-43 wurde für je 50 Sekunden zur Perfusions-Lösung gegeben. Messungen wurden dabei sowohl mit nicht-stimulierten als auch mit Acetylcholin stimulierten SH-SY5Y- und SiMa-Zellen durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit einem CCD-Kamera-System (Princeton Instruments, Trenton, NJ) montiert auf einem Inversen Mikroskop mit Epi-Fluoreszenz (Axiovert, Zeiss, Jena) durchgeführt. Ein vergleichbares Experiment wurde auch mit SiMa-Zellen durchgeführt, die mit einem spezifischen Antiserum gegen SYT5 vorinkubiert worden waren. Als Kontrolle wurden nicht-behandelte SH-SY5Y- und SiMa-Zellen verwendet.

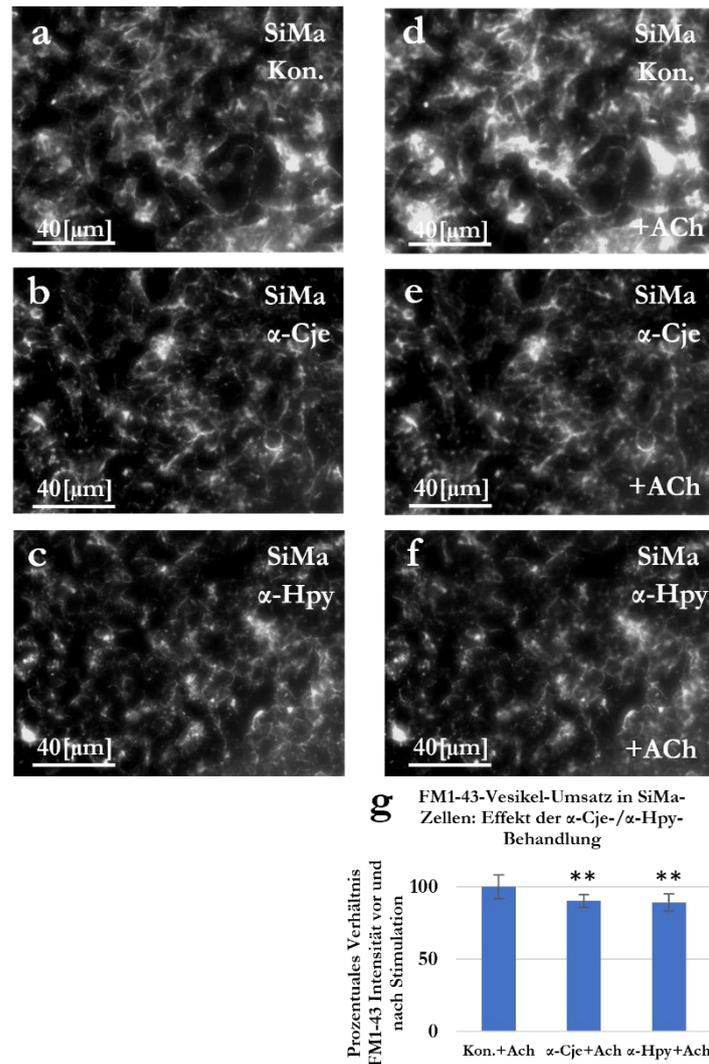


Abbildung 14: FM1-43-Exo/Endozytose-Vesikel-Umsatz-Assay mit nicht-behandelten und mit Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* vorbehandelten SiMa-Zellen. Aufnahme bei 20-facher Vergrößerung. (a-c) Nicht-Acetylcholin stimulierte SiMa-Zellen zur Bestimmung der Hintergrundintensität. (a) Nicht-behandelte SiMa-Kontrolle. (b) Mit Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörper behandelte SiMa-Zellen. (c) Mit Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörper behandelte SiMa-Zellen. (d-f) Acetylcholin stimulierte SiMa-Zellen. (d) Nicht-behandelte SiMa-Kontrolle stimuliert mit Acetylcholin. (e) Mit Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörper behandelte SiMa-Zellen stimuliert mit Acetylcholin. (f) Mit Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörper behandelte SiMa-Zellen stimuliert mit Acetylcholin. (g) Statistische Auswertung des Intensitätsverhältnisses des FM1-43 Farbstoffs in SiMa-Zellen mit oder ohne Acetylcholin-Stimulation.

Wie in Abbildung 14 zu sehen, zeigen die dargestellten Aufnahmen und deren densitometrisch-statistische Auswertung eine hoch-signifikante Abnahme der Exozytoseaktivität anhand des verminderten Vesikel-Recyclings in SiMa-Neuroblastom-Zellen, welche zuvor mit Antiserum gegen *Campylobacter jejuni* (Abbildung 14; a-d und g) und *Helicobacter pylori* (Abbildung 14; a, b, und e-g) vorbehandelt worden waren. Dabei konnte eine Abnahme um 11 % in mit *Helicobacter pylori*-Antiserum und um 9,8 % in mit *Campylobacter jejuni*-Antiserum behandelte SiMa-Zellen beobachtet werden (** $p < 0,01$) (siehe auch Tabelle 15). Im Gegensatz dazu zeigte sich in SH-SY5Y-Zellen, die mit Antiserum gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma*

gondii vorbehandelt worden waren, keine Änderung in der Acetylcholin-abhängigen FM1-43-Aufnahme im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 15: Statistische Auswertung des FM1-43-Exo/Endozytose-Vesikel-Umsatz-Assay mit behandelten SiMa-Zellen. Die Test-Ansätze mit nicht-behandelter Kontrolle, *Campylobacter jejuni*-Antikörper-behandelt und *Helicobacter pylori*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der FM1-43-Intensität, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	SiMa-Kontrolle	SiMa- α -Cje	SiMa- α -Hpy
Mittelwert FM1-43-Intensität	120,057	108,287	106,966
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	90 %	89 %
P-Wert	-	0,0029	0,0023
Standardabweichung	8,09	4,54	5,8

Um zu überprüfen, ob eine spezifische Interaktion mit dem SNARE-Komplex-Protein SYT5 zu einer Änderung der Exozytose-Leistung und des Vesikel-Recyclings führen kann, wurde ein vergleichbares Experiment mit SiMa-Zellen durchgeführt, die mit einem spezifisch gegen SYT5 gerichteten Antikörper vorbehandelt worden waren.

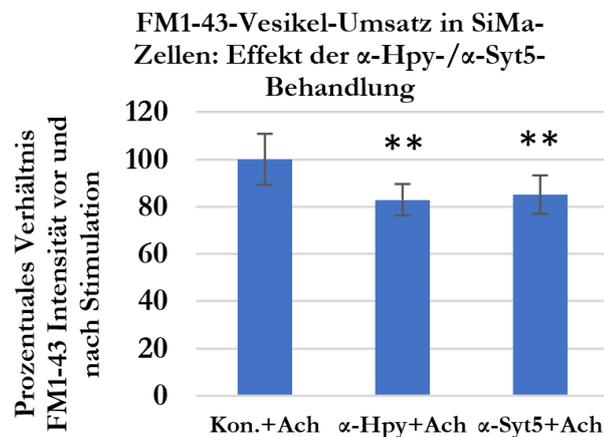


Abbildung 15: FM1-43-Exo/Endozytose-Vesikel-Umsatz-Assay mit unbehandelten und mit Antiseren gegen *Helicobacter pylori* oder SYT5 vorbehandelten SiMa-Zellen. Statistische Darstellung von mit Antiserum gegen *Helicobacter pylori* und SYT5 vorbehandelten SiMa-Zellen vor und nach Acetylcholin-Stimulation. Als Kontrolle dienten nicht-behandelte SiMa-Zellen.

Wie auf dem Diagramm in Abbildung 15 zu sehen ist, konnte in SiMa-Neuroblastom-Zellen durch eine Behandlung mit einem Antiserum gegen SYT5 eine hoch-signifikante Abnahme der Exozytose-Leistung bzw. des Vesikel-Recyclings um 15 % gemessen werden (** $p < 0,01$). Damit konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von SYT5-bindenden Antikörpern gegen *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* und SYT5 zu einer Abnahme der Exo- und Endozytose abhängigen Aufnahme von FM1-43-Farbstoff führt (siehe auch Tabelle 16).

Tabelle 16: Statistische Auswertung des FM1-43-Exo/Endozytose-Vesikel-Umsatz-Assay mit behandelten SiMa-Zellen. Die Test-Ansätze mit nicht-behandelter Kontrolle, SYT5-Antikörper-behandelt, und *Helicobacter pylori*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der FM1-43-Intensität, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	SiMa-Kontrolle	SiMa- α -SYT5	SiMa- α -Hpy
Mittelwert FM1-43-Intensität	139,057	119,851	117,056
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	85 %	82 %
P-Wert	-	0,001	< 0,0001
Standardabweichung	8,09	8,23	8,65

3.5 Untersuchung von Effekten Erreger-spezifischer Antikörper auf Acetylcholin-abhängige intrazelluläre Kalzium-Signale in SiMa-Zellen mit dem Kalzium-abhängigen Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3-AM

Eine suffiziente SNARE-Komplex-vermittelte Fusion von Vesikel und präsynaptischer Membran zur Einleitung der Exozytose wird erst dann möglich, wenn eine Membran-Depolarisierung zu einem ausreichenden Kalzium-Einstrom als Schlüssel-Signal geführt hat. Da SYT5, wie auch andere Mitglieder der Synaptotagmin-Familie, als Kalzium-Sensor einen wichtigen Bestandteil des SNARE-Komplexes darstellt, sollte eine aufgrund einer Antikörper-Interaktion beeinträchtigte Funktionalität von SYT5 letztlich zu einer verminderten Exozytose-vermittelten synaptischen Übertragung führen, was letztlich auch zu einer verminderten Kalzium-Konzentration in betroffenen Zell-Kulturen führen sollte. In diesem Abschnitt soll daher überprüft werden, ob eine Behandlung von SiMa-Neuroblastom-Zellen mit Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* einen Einfluss auf die synaptische Aktivität und den daraus resultierenden Kalzium Einstrom in diese Zellen hat. Ein solcher Kalzium-Einstrom kann in SiMa-Zellen durch eine Stimulierung mit dem Neurotransmitter Acetylcholin ausgelöst werden, und die daraus resultierende Änderung des intrazellulär verfügbaren Kalziums mit dem Fluoreszenz-Indikator Fluo-3-AM mikroskopisch sichtbar gemacht und dann densitometrisch ausgewertet werden. Dafür wurden auf Deckgläsern ausgesäte SiMa-Neuroblastom-Zellen über Nacht für zwölf Stunden mit Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* vorbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit Fluo-3-AM beladen. Die Zellen wurden für die Aufnahmen in einer Aufnahme-Kammer permanent mit einer Standard-Perfusions-Lösung mit einer Flussrate von 5 ml/min perfundiert. Die Aufnahmen wurden im Abstand von jeweils 5 Sekunden mit einem CCD-Kamera-System (Princeton Instruments, Trenton, NJ) montiert auf

einem Inversen Mikroskop mit Epi-Fluoreszenz-Einrichtung (Axiovert, Zeiss, Jena) durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde bei 540 nm gemessen und mit dem Programm MetaFluor und MetaMorph (Universal Imaging, West Chester, PA) ausgewertet. Zur quantitativen Analyse des intrazellulären Kalziums wurde die Fluoreszenz-Intensität mit Aufnahmen vor (F_0) und während einer Acetylcholin-Stimulation (F) festgehalten und dann mittels Densitometrie quantifiziert. Aus beiden gemessenen Werten wurde schließlich ein Verhältnis (F/F_0) berechnet, das den Acetylcholin-abhängigen Kalzium-Einstrom wiedergibt. Als Kontrolle wurden nicht-behandelte SiMa-Neuroblastom-Zellen verwendet. Das gesamte Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

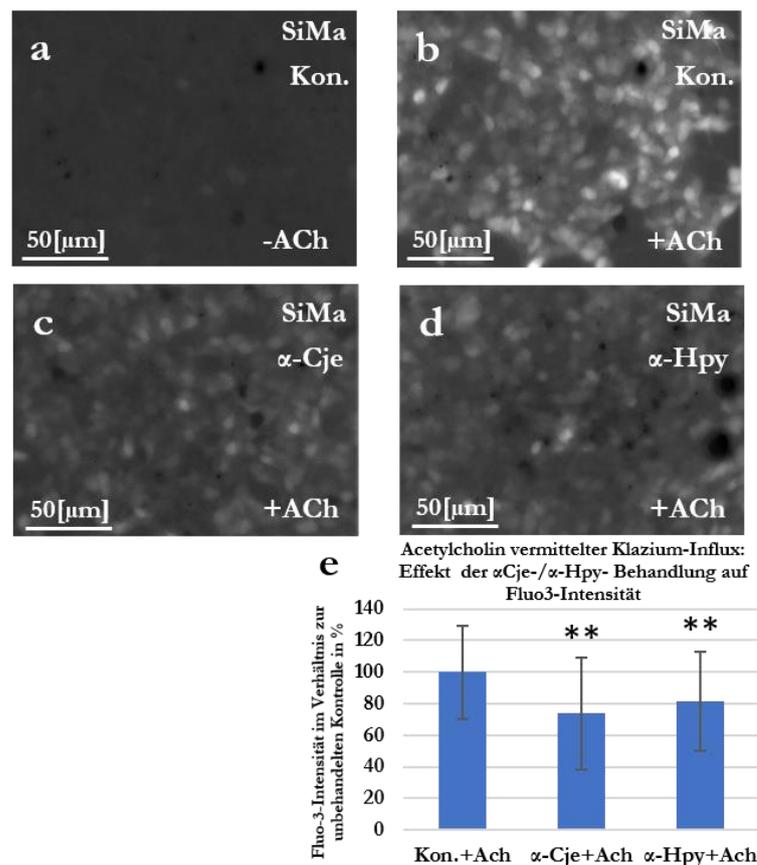


Abbildung 16: Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assay mit unbehandelten und mit Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen. (a) Unbehandelte nicht Acetylcholin stimulierte SiMa-Kontrolle. (b) Unbehandelte mit Acetylcholin stimulierte SiMa-Kontrolle. (c) Mit Antiserum gegen *Campylobacter jejuni* behandelte Acetylcholin stimulierte SiMa-Neuroblastom-Zellen. (d) Mit Antiserum gegen *Helicobacter pylori* behandelte Acetylcholin stimulierte SiMa-Neuroblastom-Zellen. (e) Diagramm der densitometrisch-statistischen Auswertung einer Versuchsserie wie in (b-d) gezeigt. Der Acetylcholin-abhängige Kalzium-Einstrom in die Zellen, wie er durch die Fluoreszenz des Kalzium-Indikators Fluo-3 sichtbar wird, war in Zellen, die mit Antikörpern gegen *Campylobacter jejuni* oder *Helicobacter pylori* vorbehandelt waren, im Vergleich zu nicht vorbehandelten und mit Acetylcholin stimulierten Zellen, signifikant vermindert.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen, konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung von SiMa Neuroblastom-Zellen mit Antikörpern gegen *Campylobacter jejuni*

und *Helicobacter pylori* in einer hoch-signifikant verminderten Acetylcholin-abhängigen Kalzium-Antwort resultiert. Im Vergleich zu einer nicht vorbehandelten aber mit Acetylcholin stimulierten Kontrolle konnte nach einer Vorbehandlung mit Anti-*Campylobacter jejuni*-Antikörper nach akuter Stimulation mit Acetylcholin ein um 26 % reduziertes intrazelluläres Kalzium-Signal beobachtet werden (**p < 0,01). Eine Vorbehandlung von SiMa-Neuroblastom-Zellen mit Anti-*Helicobacter pylori*-Antikörper führte ebenfalls zu einer Reduktion des Acetylcholin-abhängigen Kalzium-Signals um 18 % (**p < 0,01) (siehe auch Tabelle 17).

Tabelle 17: Tabelle 18: Statistische Auswertung des Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assay mit behandelten SiMa-Zellen. Die Test-Ansätze mit nicht-behandelter Kontrolle, *Campylobacter jejuni*-Antikörper-behandelt und *Helicobacter pylori*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der Fluo-3-AM Fluoreszenz-Intensität, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	SiMa-Kontrolle	SiMa- α -Cje	SiMa- α -Hpy
Mittelwert Fluo-3-AM Fluoreszenz-Intensität	98967	73070	80655
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	74 %	81 %
P-Wert	-	0,002	0,0021
Standardabweichung	29183	25879	25259

Um eine direkte Beteiligung des Proteins SYT5 an einem solchen Effekt zu untermauern, wurde das Experiment unter sonst identischen Bedingungen aber stattdessen mit einer Vorbehandlung durch Antikörper gegen SYT5 und *Helicobacter pylori* durchgeführt.

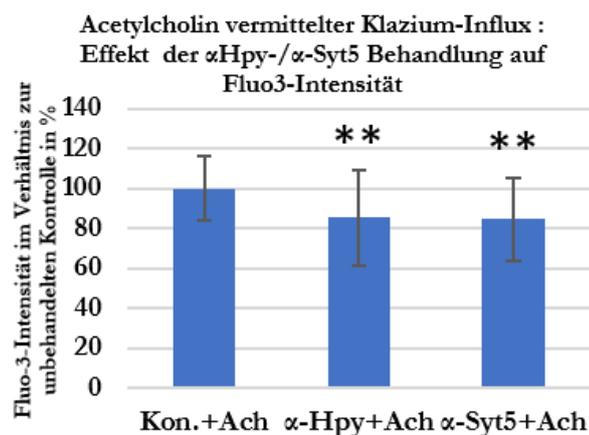


Abbildung 17: Statistische Auswertung eines Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assays mit unbehandelten und mit Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* behandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen. Diagramm der densitometrisch-statistischen Auswertung eines Fluo-3-AM Fluoreszenz-Assays zur Darstellung der Acetylcholin-abhängigen intrazellulären Kalzium-Konzentration nach einer Vorbehandlung von SiMa-Neuroblastom-Zellen mit Antikörpern gegen *Helicobacter pylori* und SYT5, im Vergleich zu nicht-behandelten, aber akut mit Acetylcholin stimulierten Zellen.

Wie auf dem Diagramm in Abbildung 17 zu sehen ist zeigte sich dabei, dass der direkt gegen SYT5 gerichtete Antikörper ähnlich wie die ebenfalls SYT5-bindenden Antikörper gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* zu einer hoch-signifikant verminderten Kalzium-Konzentration nach akuter Stimulation mit Acetylcholin führt. Durch die Vorbehandlung mit Anti-SYT5-Antikörper wurde eine Reduktion um 15,6 % im Vergleich zur nicht vorbehandelten Kontrolle gemessen (**p < 0,01) (siehe auch Tabelle 19).

Tabelle 19: Statistische Auswertung des Fluo-3-AM-Fluoreszenz-Assay mit behandelten SiMa-Zellen.

Die Test-Ansätze mit nicht-behandelter Kontrolle, SYT5-Antikörper-behandelt und *Helicobacter pylori*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der Fluo-3-AM Fluoreszenz-Intensität, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	SiMa-Kontrolle	SiMa- α -SYT5	SiMa- α -Hpy
Mittelwert Fluo-3-AM Fluoreszenz-Intensität	133970	113084	114526
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	84 %	85 %
P-Wert	-	0,0031	0,002
Standardabweichung	21138	27336	23926

3.6 Immunfluoreszenz-Intensität des Neuroblastom-Zell-Markers Tyrosin-Hydroxylase in SiMa-Zellen

Das in Neuroblastom-Zellen exprimierte Enzym Tyrosin-Hydroxylase katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt der Katecholamin-Biosynthese, welche bei diesen Zellen zur Bildung von Noradrenalin führt. Der Nachweis dieses Enzyms und seines Produkts stellt von daher einen etablierten Marker zum Nachweis eines Neuroblastoms bei Patienten dar. Die mittels Immunfluoreszenz gemessene Intensität des Enzyms erlaubt darüber hinaus einen Rückschluss auf die Synthese-Leistung der zu untersuchenden Zellen und damit auch auf deren Vitalität. Dieser Zusammenhang wurde hier genutzt, um zu untersuchen, ob sich die Vorbehandlung der Zellen mit Erreger-spezifischen Antikörpern auf die Zell-Vitalität auswirkt. Hierfür wurden SiMa-Neuroblastom-Zellen für zwölf Stunden mit Antikörpern gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* behandelt. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Als Primär-Antikörper wurde ein Anti-Tyrosin-Hydroxylase-Antikörper verwendet. Die Aufnahmen wurden mittels eines Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskops (Axiophot, Zeiss, Jena, Deutschland) und einem darauf montierten digitalen Kamera-Systems (Axiocam, Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt. Zur Überprüfung der Spezifität von Primär- und Sekundäranantikörper wurden Aufnahmen von nur mit Sekundär-

Antikörper behandelten Zellen gemacht (SAO). Als Kontrolle für die Antikörper-Vorbehandlung wurden nicht vorbehandelte SiMa-Zellen verwendet. Pro Testreihe wurden acht Aufnahmen densitometrisch mit dem Programm ImageJ untersucht bei denen dann jeweils 10 Einzelwerte pro Aufnahme erhoben wurden.

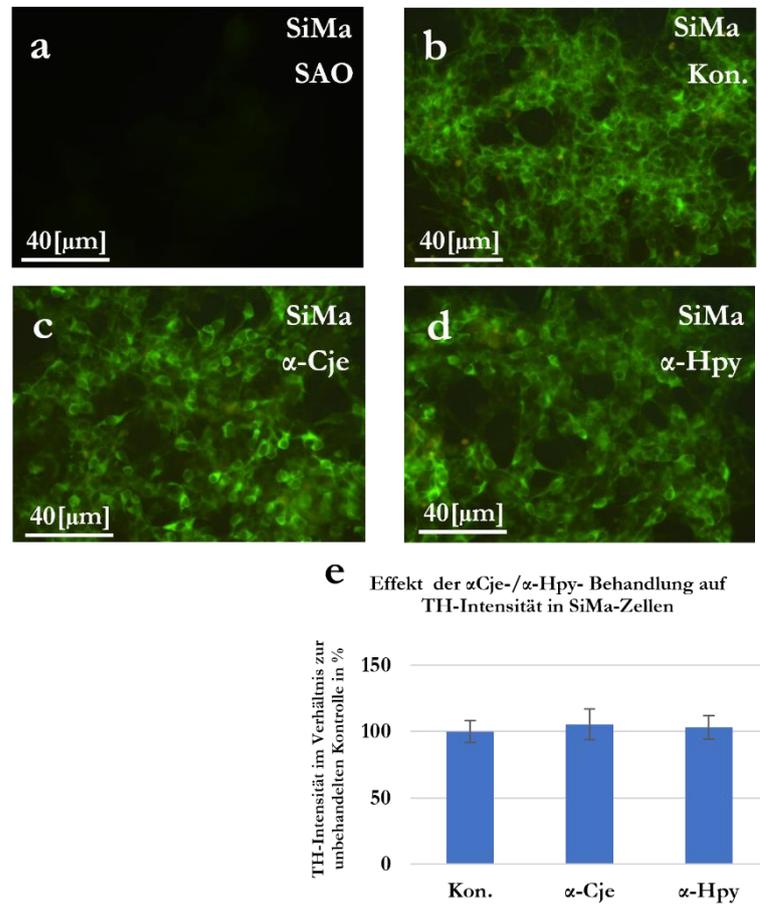


Abbildung 18: Intensitäts-Messung des Enzyms Tyrosin-Hydroxylase in SiMa-Neuroblastom-Zellen. Aufnahme bei 20-facher Vergrößerung. (a) Spezifitätskontrolle die nur mit Sekundär-Antikörper inkubiert wurde (SAO). (b) Immunfluoreszenz-Aufnahme der Enzyms Tyrosin-Hydroxylase von nicht mit Antikörper vorbehandelten SiMa-Zellen. (c) Mit Antiserum gegen *Campylobacter jejuni* behandelte SiMa-Zellen. (d) Mit Antiserum gegen *Helicobacter pylori* behandelte SiMa-Zellen. (e) Diagramm der densitometrisch-statistischen Auswertung einer Reihe von Versuchen wie in (b-d) gezeigt. Gezeigt ist das prozentuale Verhältnis vorbehandelter Zellen zu nicht-behandelten Kontrollzellen.

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, zeigt sich weder auf den Fluoreszenz-Aufnahmen noch im Diagramm der densitometrisch-statistischen Auswertung des Experiments eine Antikörper-abhängige Änderung des Fluoreszenzsignals für Tyrosin-Hydroxylase in mit Antiserum gegen *Campylobacter jejuni* oder *Helicobacter pylori* vorbehandelten SiMa-Neuroblastom-Zellen. Die Darstellung der Werte im Diagramm erfolgte dabei als prozentuales Verhältnis zu einer nicht vorbehandelten SiMa-Kontrolle. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass sich die Antikörper-Vorbehandlungen nicht auf die generelle Vitalität der Zellen auswirkt (siehe auch Tabelle 20).

Tabelle 20: Statistische Auswertung der Tyrosin-Hydroxylase-Intensität mit behandelten SiMa-Zellen. Die Test-Ansätze mit nicht-behandelter Kontrolle, *Campylobacter jejuni*-Antikörper-behandelt und *Helicobacter pylori*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der Tyrosin-Hydroxylase-Intensität, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	SiMa-Kontrolle	SiMa- α -Cje	SiMa- α -Hpy
Mittelwert Tyrosin-Hydroxylase-Intensität	29455	31055	30405
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	105 %	103 %
P-Wert	-	> 0,05	> 0,05
Standardabweichung	2448	3576	2702

3.7 MTT-Zell-Vitalitäts-Test mit RBL-2H3-, SiMa-, SH-SY5Y- und T-47D-Zellen

Die mitochondriale Glykolyse-Leistung unter dem Einfluss der Antiseren gegen *Borrelia burgdorferi*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* und *Toxoplasma gondii* wurde auch noch mittels eines MTT-Zell-Vitalitäts-Tests untersucht. Nicht-reduziertes MTT ((3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-Bromid) wird von vitalen Zellen aufgenommen und im Mitochondrium in einer von der Glykolyse-Rate abhängigen Reaktion zu dunkel-bläulich kristallinem Formazan reduziert. Die densitometrisch ermittelten Werte entsprechen dabei der Menge an aufgenommenem und reduziertem Formazan und lassen damit einen Rückschluss auf den Energiehaushalt der untersuchten Zellen und damit letztlich der Zell-Vitalität zu. Die in 6-Well-Platten auf Deck-Gläschen ausgesäten Zellen wurden über Nacht für zwölf Stunden mit den genannten Antiseren vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit MTT-PBS-Lösung für weitere 2 Stunden inkubiert. Die Aufnahmen der Zellen wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena, Deutschland) und einem darauf montierten digitalen Kamera-System (Axiocam, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt und densitometrisch mit dem Programm ImageJ ausgewertet. Pro Testreihe wurden jeweils 12 Aufnahmen erstellt, auf denen an jeweils 10 zufällig verteilten Punkten densitometrische Werte erhoben wurden. Als Kontrolle wurden nicht-behandelte Zell-Linien benutzt.

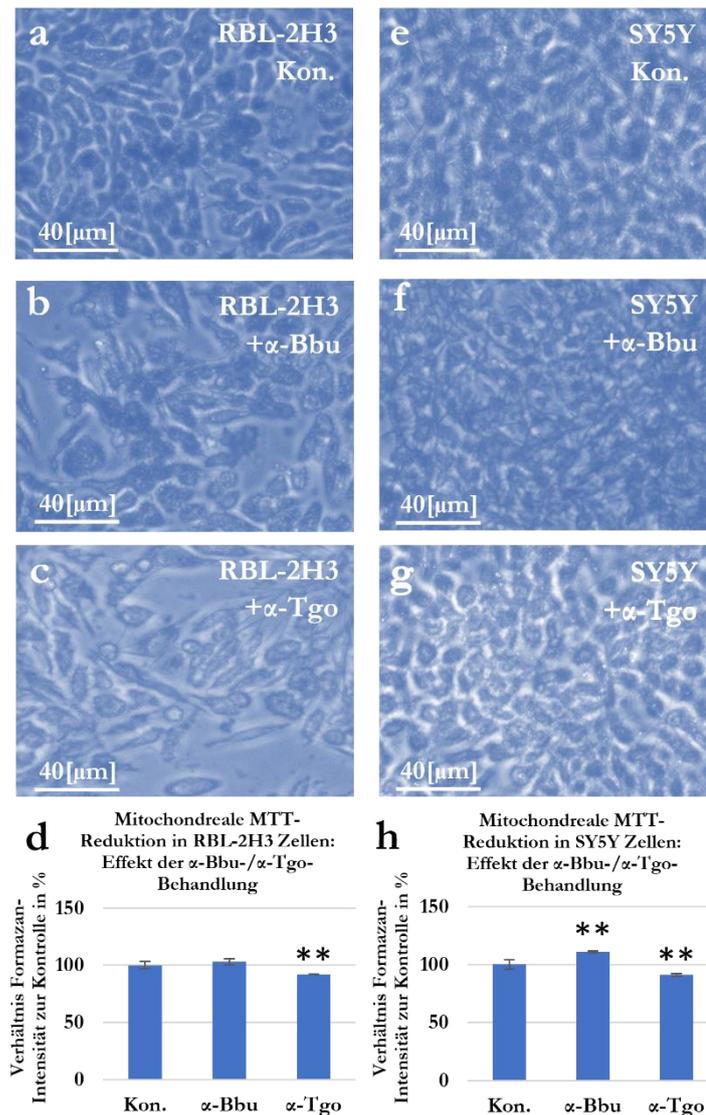


Abbildung 19: MTT-Zell-Vitalitäts-Test mit nicht-behandelten und mit jeweils mit Antisern gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* vorbehandelten RBL-2H3- und SH-SY5Y-Zellen mit anschließender densitometrisch-statistischer Auswertung der Färbeintensität des Reaktionsprodukts Formazan. Aufnahme bei 40-facher Vergrößerung. (a-c) Mit MTT behandelte RBL-2H3-Zellen. (a) Unbehandelte RBL-2H3-Kontrollzellen. (b) Mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte RBL-2H3-Zellen. (c) Mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelte RBL-2H3-Zellen. (d) Diagramm der densitometrisch-statistischen Auswertung der Formazan-Intensität bei mit Antisern vorbehandelten RBL-2H3-Zellen im prozentualen Verhältnis zu nicht vorbehandelten RBL-2H3-Kontrollzellen. (e-g) Mit MTT behandelte SH-SY5Y-Zellen. (e) Unbehandelte SH-SY5Y-Kontrollzellen. (f) Mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper vorbehandelte SH-SY5Y-Zellen. (g) Mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper vorbehandelte SH-SY5Y-Zellen. (h) Diagramm der densitometrisch-statistischen Auswertung der Formazan-Intensität bei mit Antisern vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen im prozentualen Verhältnis zu nicht vorbehandelten SH-SY5Y-Kontroll-Zellen.

Die mit dem Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelten RBL-2H3- Zellen zeigten eine im Verhältnis zur Kontrolle um 8 % geringere Formazan-Intensität (** $p < 0,01$). Die gleiche Wirkung konnte mit dem Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper bei der SH-SY5Y-Zell-Linie demonstriert werden. Die mit dem Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper inkubierten SH-SY5Y-

Zellen zeigten eine um 9 % geringere Formazan-Intensität (** $p < 0,01$). Die mit *Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte Zell-Linie SH-SY5Y wies im Gegensatz zum *Toxoplasma gondii*-Antikörper eine um 11 % erhöhte Formazan-Intensität im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle auf (** $p < 0,01$). Die die mit den Antikörpern gegen *Helicobacter pylori* und *Campylobacter jejuni* behandelten Zellen der Zell-Linien RBL-2H3, SiMa, SH-SY5Y und T-47D zeigten keine signifikante Reduktion der Formazan Menge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (siehe auch Tabelle 21).

Tabelle 21: Statistische Auswertung des MTT-Zell-Vitalitäts-Tests mit RBL-2H3- und SH-SY5Y-Zellen. Die Test-Ansätze mit nicht-behandelter Kontrolle, *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-behandelt und *Toxoplasma gondii*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der Formazan-Intensität, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	RBL-2H3- Kontrolle	RBL-2H3- α -Bbu	RBL-2H3- α -Tgo	SY5Y- Kontrolle	SY5Y- α -Bbu	SY5Y- α -Tgo
Mittelwert der Formazan-Intensität	9,25 ⁻⁶	9,52 ⁻⁶	8,5 ⁻⁶	8,97 ⁻⁶	9,96 ⁻⁶	8,18 ⁻⁶
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	102 %	92 %	100 %	111 %	91 %
P-Wert	-	0,18	0,009	-	0,013	0,015
Standardabweichung	0,293 ⁻⁶	0,245 ⁻⁶	0,034 ⁻⁶	0,36 ⁻⁶	0,092 ⁻⁶	0,087 ⁻⁶

3.8 Untersuchungen zum Effekt von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, *Toxoplasma gondii* und CPLX2 auf die Exozytose-Aktivität von RBL-2H3-Zellen, anhand eines β -Hexosaminidase-Degradations-Tests

Um zu überprüfen, ob die Interaktionen der Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* mit CPLX2, funktionelle Auswirkungen auf die Exozytose haben, wurden unbehandelte und mit Antiseren vorbehandelte Kulturen der Mastzell-Linie RBL-2H3 auf ihre Exozytose-Leistung hin untersucht. Bei einer Interaktion der beiden genannten Antikörper mit CPLX2, würde man eine Minderung der Exozytose-Leistung erwarten. Um zu klären, ob dies tatsächlich der Fall ist, wurden RBL2H3-Zellen zunächst mit antimikrobiellen Antikörpern gegen das Gram-negative Bakterium *Borrelia burgdorferi* sowie gegen den einzelligen Parasiten *Toxoplasma gondii* über Nacht für zwölf Stunden vorinkubiert und anschließend mit dem Mastzell-Stimulanz *Compound 48/80* zur Degranulation gebracht. Der Begriff Degranulation beschreibt dabei die Mast-Zell spezifische Exozytose von im Zell-Plasma gespeicherten vesikulären Granula. Unter Anderem exozytieren RBL-2H3-Zellen durch diesen zellulä-

ren Vorgang das Enzym β -Hexosaminidase, dessen Aktivität sich im Überstand unter Zugabe des Enzym-spezifischen Substrates 4-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosaminid photometrisch messen lässt. Anschließend werden die Zellen mit einer 1 % -Triton-X-100-PBS-Puffer-Lösung lysiert und in diesem Lysat die Aktivität der in den Zellen verbliebenen β -Hexosaminidase wie oben beschrieben bestimmt. Der aus beiden gemessenen Werten errechnete Quotient aus intrazellulär verbliebenem und extrazellulär durch Exozytose abgegebenem degranuliertem Enzym stellt ein Maß für die Degranulations-Leistung der Zellen dar (siehe auch Formel 1).

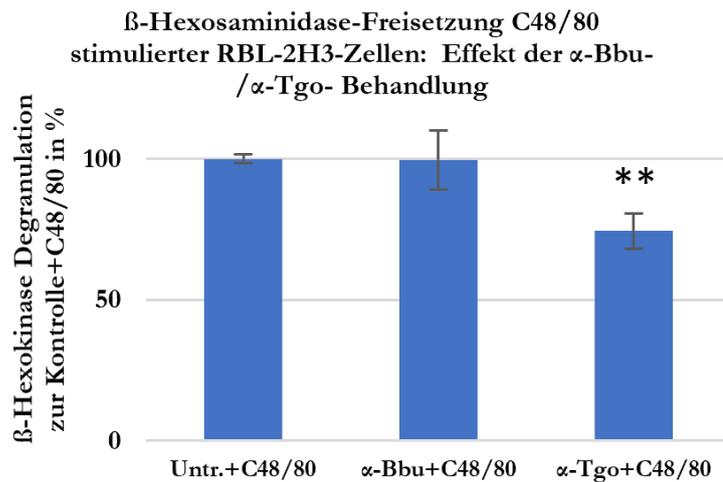


Abbildung 20: β -Hexosaminidase-Freisetzung *Compound 48/80* stimulierter RBL-2H3-Zellen. Die für jede Behandlungsreihe photometrisch gemessene Freisetzung des Enzyms β -Hexosaminidase wird als prozentuales Verhältnis zur Freisetzung aus nicht-behandelten RBL-2H3-Kontrollzellen dargestellt.

Wie auf dem Diagramm in Abbildung 20 zu sehen ist, weisen nicht-behandelte aber mit *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Kontroll-Zellen eine exozytotische Abgabe von 28 % der gesamten vesikulär gespeicherten β -Hexosaminidase auf. Im Gegensatz dazu zeigen mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper vorbehandelte und dann mit *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Zellen eine exozytotische Freisetzung von lediglich 21 % des gespeicherten Enzyms. Dies entspricht einer signifikanten Abnahme der exozytotischen β -Hexosaminidase-Freisetzung um 25 % der mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper inkubierten mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3- Zellen im Vergleich zur nicht vorbehandelten aber mit *Compound 48/80* stimulierten Kontrolle (** $p < 0,01$). Für die mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper inkubierten mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3Zellen zeigt sich hingegen keine signifikante Abnahme der β -Hexosaminidase-Freisetzung (siehe auch Tabelle 22).

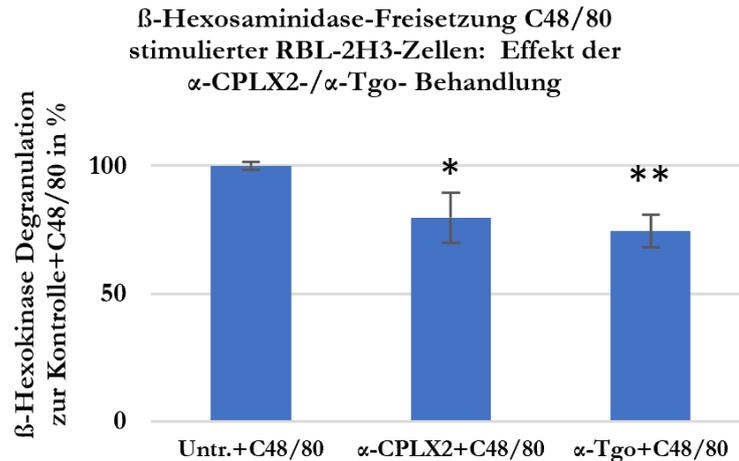


Abbildung 21: β -Hexosaminidase-Freisetzung *Compound 48/80* stimulierter RBL-2H3-Zellen. Die pro Testreihe photometrisch gemessene Freisetzung des Enzyms β -Hexosaminidase wird im Verhältnis zur nicht-behandelten RBL-2H3-Kontrolle dargestellt.

In einem parallelen Versuchs-Durchlauf unter vergleichbaren Bedingungen (siehe Abbildung 21 und Tabelle 22), wurden RBL-2H3-Zellen mit einem Antikörper vorinkubiert, der direkt gegen CPLX2 gerichtet war und anschließend mit *Compound 48/80* zur Degranulation stimuliert. Dabei zeigte sich, dass diese Zellen ebenso wie Zellen, welche mit dem Antikörper gegen *Toxoplasma gondii* inkubiert worden waren, eine im Vergleich zu stimulierten, aber nicht vorbehandelten Kontroll-Zellen um 20 % signifikant verminderte β -Hexosaminidase-Freisetzung aufwiesen (* $p < 0,05$) (siehe auch Tabelle 22).

Tabelle 22: Statistische Auswertung des β -Hexosaminidase-Degranulations-Tests mit RBL-2H3-Zellen. Die Test-Ansätze nicht-behandelte Kontrolle, *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-behandelt, CPLX2-Antikörper-behandelt und *Toxoplasma gondii*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der β -Hexosaminidase-Freisetzung, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	RBL-2H3-Kontrolle	RBL-2H3- α -Bbu	RBL-2H3- α -CPLX2	RBL-2H3- α -Tgo
Mittelwert der β -Hexosaminidase-Freisetzung	28,7 %	28,6 %	22,9 %	21,4 %
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	99,7 %	79,7 %	74,4 %
P-Wert	-	0,483	0,022	0,0025
Standardabweichung	0,467	3,007	2,83	1,8

3.9 Untersuchungen zum Effekt von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* auf die Exozytose-Aktivität durch Bestimmung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses an Toluidin Blau-gefärbten und mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3-Zellen

Mastzell-Granula ruhen bis zu ihrer Ausschüttung im Zytoplasma und machen dadurch einen erheblichen Anteil am Gesamtvolumen dieses Zellkompartiments aus. Die auf einen Stimulus mit *Compound 48/80* hin erfolgende exozytotische Degranulation führt dann zu einer deutlichen Reduktion des Plasmavolumens dieser Zellen, während sich das Volumen der Zellkerne nicht verändert. Dadurch nimmt der relative Anteil des Kernvolumens am Gesamt-Zell-Volumen zu. Entsprechend führt eine reduzierte Exozytose-Leistung zu einem höheren Zytoplasma-Volumen-Anteil am Gesamt-Zell-Volumen, da mehr Granula im Zytoplasma verbleiben und damit das Zytoplasma-Volumen einen höheren Anteil am Gesamt-Zell-Volumen behält. Die im Zytoplasma gespeicherten Granula der Mastzell-Linie RBL-2H3 lassen sich mit dem Farbstoff Toluidin Blau gezielt anfärben. Dabei entsteht eine violett-metachromatische Färbung der Mast-Zell-Granula, welche sich vom blau gefärbten Zytoplasma und dem blass-blauen gefärbten Zellkern abhebt. Dies erlaubt die morphometrische Bestimmung der jeweils vom Zytoplasma und vom Zellkern eingenommenen Fläche und daraus folgend die Berechnung des Kern-Plasma-Verhältnisses. Die auf Deckgläsern ausgesäten RBL-2H3-Zellen wurden für zwölf Stunden über Nacht mit antimikrobiellen Antikörpern gegen das Gram-negative Bakterium *Borrelia burgdorferi* oder gegen den einzelligen Parasiten *Toxoplasma gondii* vorinkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit dem Degranulations-Stimulanz *Compound 48/80* zur exozytotischen Degranulation gebracht, mit Toluidin-Blau gefärbt und mit Glycerin auf Objektträgern montiert. Für die Bestimmung des Kern-Plasma-Verhältnisses wurden für jede Zelle die Gesamtzellfläche und die Fläche des Zellkerns manuell mit dem Programm ZEN 3.2 (Blue Edition, Zeiss, Jena) näherungsweise gemessen und der Anteil des Zytoplasmas an der Gesamt-Zell-Fläche berechnet. Als Kontrolle dienten nicht mit Antikörper behandelte RBL-2H3-Zellen, die entweder mit *Compound 48/80* stimuliert wurden, oder nicht-stimuliert blieben. Das Experiment wurde drei-mal mit je 32 vermessenen Zellen durchgeführt.

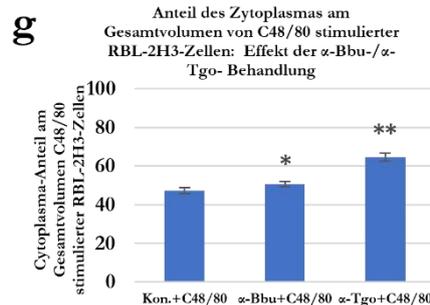
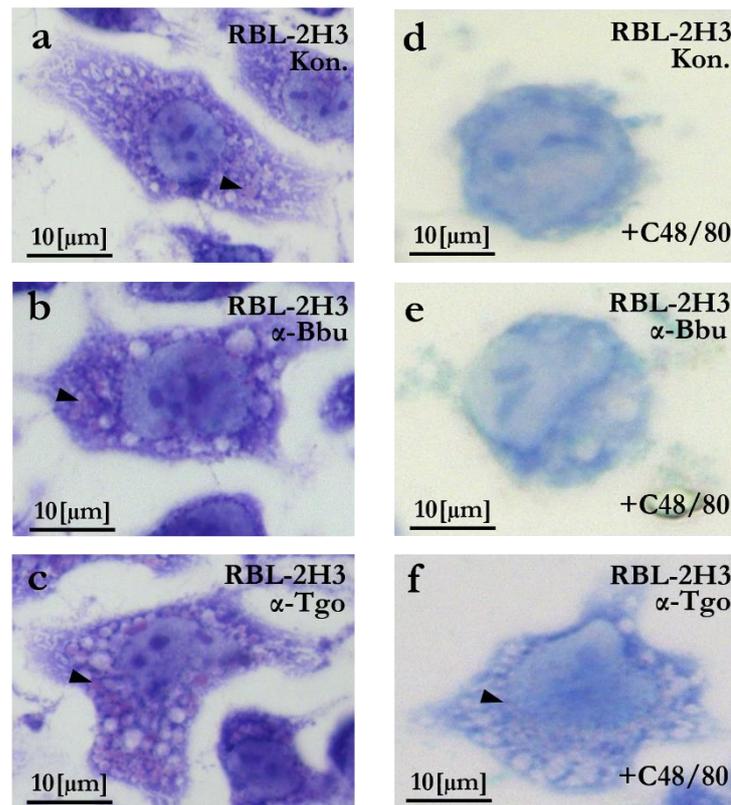


Abbildung 22: Messung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses von mit Toluidin Blau gefärbten und mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3-Zellen. Lichtmikroskopische Aufnahmen bei 63-facher Vergrößerung. (a-c) Nicht-C48/80 stimulierte RBL-2H3-Zellen. (a) Unbehandelte nicht-stimulierte RBL-2H3-Kontroll-Zellen. (b) Mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte nicht-stimulierte RBL-2H3-Zellen. (c) Mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelte nicht-stimulierte RBL-2H3-Zellen. (d-f) C48/80 stimulierte RBL-2H3-Zellen. (d) Unbehandelte C48/80-stimulierte RBL-2H3-Kontrollzellen. (e) Mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte C48/80-stimulierte RBL-2H3-Zellen. (f) Mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelte C48/80-stimulierte RBL-2H3-Zellen. (g) Diagramm der statistischen Auswertung des Anteils des Zytoplasmas am Gesamt-Volumen von C48/80-stimulierten RBL-2H3-Zellen.

Wie auf Abbildung 22 zu sehen ist, zeigen Toluidin-Blau-gefärbte nicht vorbehandelte RBL-2H3-Zellen nach einer *Compound 48/80* stimulierten exozytotischen Degranulation eine deutliche Flächen-Reduktion des Zytoplasmas, das bei diesen Zellen noch einen Anteil von 47,3 % der Gesamtfläche ausmacht. Im Gegensatz dazu lag der Anteil des Zytoplasmas an der Gesamtfläche von RBL-2H3-Zellen, die mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper vorbehandelt und dann mit *Compound 48/80* stimuliert worden waren, bei einem deutlich höheren Wert von 64,6 %. Dies entspricht einer um 17,3 % hoch-signifikant reduzierten Exozytose-

Rate bei Zellen, die mit diesem Antikörper vorbehandelt waren, im Vergleich zu nicht vorbehandelten aber mit *Compound 48/80* stimulierten Kontrollzellen (**p < 0,001). Auch mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper vorbehandelte, *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Zellen wiesen eine leicht reduzierte Exozytose-Rate auf. Diese Reduktion betrug jedoch nur 3 % im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kontrollzellen war aber nichtsdestotrotz signifikant (*p < 0,05). Demnach verbleibt bei mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper vorbehandelten und mittels *Compound 48/80* zur exozytotischen Degranulation gebrachten RBL-2H3-Zellen, eine deutlich höhere Menge an Mastzell-Granula im Zellinneren was als ein weiteres Indiz dafür gelten kann, dass die Interaktion des Antiserums gegen *Toxoplasma gondii* mit CPLX2 zu einer Beeinträchtigung der Exozytose führt (siehe auch Tabelle 23).

Tabelle 23: Statistische Auswertung des Tests zum Zytoplasma-Volumens-Anteil mit Toluidin Blau gefärbten RBL-2H3-Zellen. Die Test-Ansätze nicht-behandelte Kontrolle, *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-behandelt und *Toxoplasma gondii*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert des Zytoplasma-Volumen-Anteils, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	RBL-2H3- Kontrolle	RBL-2H3- α -Bbu	RBL-2H3- α -Tgo
Mittelwert des Zytoplasma-Volumen-Anteils	47,3 %	50,7 %	64,6 %
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	107 %	136 %
P-Wert	-	0,04	0,0003
Standardabweichung	1,54	1,31	2,1

3.10 Fluoreszenz-Mikroskopische Untersuchung des Einflusses eines Antiserums gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* auf Expression und subzelluläre Lokalisation von CPLX2 in mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3-Zellen

Der Effekt einer *Compound 48/80* vermittelten Stimulation von unbehandelten und mit dem Antiserum gegen *Toxoplasma gondii* behandelten RBL-2H3-Zellen auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins CPLX2 wurde immunfluoreszenz-mikroskopisch untersucht. Die auf Deckplatten ausgesäten RBL-2H3-Zellen wurden über Nacht mit den Antiseren gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit *Compound 48/80* zur Degranulation gebracht. Zur Fixierung wurde eine 4 % -Paraformaldehyd-Lösung verwendet und die Zellen mit einem 50 % Aceton-Methanol-Gemisch permeabilisiert. Als Primär-Antikörper wurde ein Anti-CPLX2-Antikörper verwendet. Die Aufnahmen der Zellen

wurden mittels eines Aufricht-Fluoreszenz-Mikroskops (Axiophot, Zeiss, Jena Deutschland) und eines darauf montierten digitalen Kamera-Systems (Axiocam, Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt und anschließend die Intensität des CPLX2-spezifischen Fluoreszenzsignals mit dem Programm ImageJ densitometrisch ausgewertet. Es wurden sowohl nicht-behandelte RBL-2H3-Zellen als auch mit dem Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* vorbehandelte Zellen als Kontrollen verwendet. Letzterer deswegen, weil dafür keine Interaktion mit dem Protein CPLX2 nachgewiesen werden konnte. Aufnahmen wurden von mit *Compound 48/80* stimulierten und nicht-stimulierten RBL-2H3-Zellen angefertigt. Pro Testreihe wurden jeweils 96 densitometrische Werte erhoben.

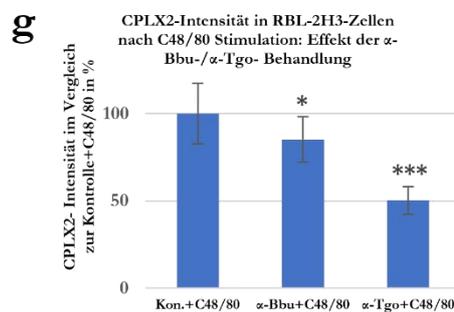
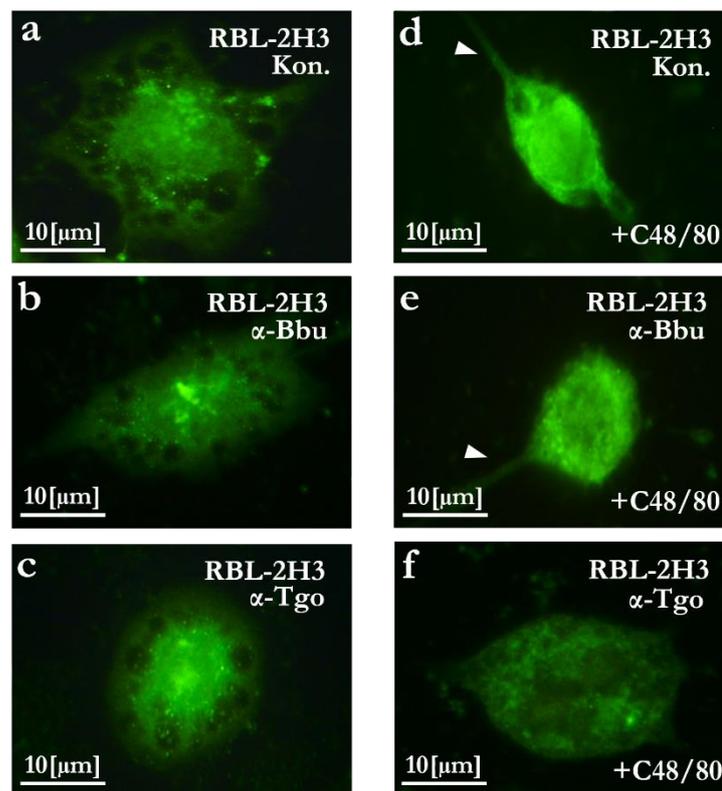


Abbildung 23: CPLX2-Intensitäts-Bestimmung Post-*Compound 48/80*-Stimulation in RBL-2H3-Zellen. Aufnahmen bei 63-facher Vergrößerung. (a-c) Nicht mit *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Zellen. (a) Unbehandelte RBL-2H3-Kontrolle. (b) Mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte RBL-2H3-Zellen. (c) Mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelte RBL-2H3-Zellen. (d-f) *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Zellen. (d) Unbehandelte *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Kontrollzellen. (e) Mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Zellen. (f) Mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelte *Compound 48/80* stimulierte RBL-2H3-Zellen. (g) Diagramm der statistischen Auswertung

der Fluoreszenz Intensitäten des Anti-CPLX2-Antikörpers an RBL-2H3-Zellen in Abhängigkeit von der jeweiligen Vorbehandlung bzw. der Stimulierung der Zellen.

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, konnte im Vergleich zu nicht-behandelten mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3-Kontroll-Zellen, bei mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper vorbehandelten und mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3-Zellen eine um 15 % signifikant verminderte CPLX2-Intensität (** $p < 0,0001$) nachgewiesen werden. Eine deutlich stärkere ebenfalls signifikante Reduktion von ca. 50 % zeigte sich bei mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper vorbehandelten RBL-2H3-Zellen (** $p < 0,0001$). zellmorphologisch fiel dabei (Abb. 18d, e) eine veränderte Fortsatzbildung der unbehandelten RBL-2H3-Kontrolle und der mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelten RBL-2H3-Zellen auf. Im Gegensatz dazu ist bei mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelten RBL-2H3-Zellen (Abb. 18f) keine Fortsatzbildung erkennbar. Es zeigt sich jedoch eine im Vergleich zu den anderen Behandlungen auffällige granuläre Verteilung der CPLX2-Immunreaktivität (siehe auch Tabelle 24).

Tabelle 24: Statistische Auswertung des CPLX2-Immunfluoreszenz-Tests von mit *Compound 48/80* stimulierten RBL-2H3-Zellen. Die Test-Ansätze nicht-behandelte Kontrolle, *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-behandelt und *Toxoplasma gondii*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach: Mittelwert der CPLX2-Intensität, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung

	RBL-2H3-Kontrolle	RBL-2H3- α -Bbu	RBL-2H3- α -Tgo
Mittelwert der CPLX2-Intensität	69663	59371	34945
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	85 %	50 %
P-Wert	-	0,014	0,0002
Standardabweichung	12096	8992	5427

3.11 Ki-67-Zell-Proliferations-Test mit SH-SY5Y- und T-47D-Zellen

Die mitotische Zellteilung und die damit einhergehende Vermehrung der Zellen, die sogenannte Zell-Proliferation ist abhängig von externen Stimuli wie den Wachstumsfaktoren. Die Protein-Familie der *Epithelial Growth Factor Receptors* umfasst auch die Gruppe der ERBB-Rezeptor-Tyrosinkinase, welche in der Lage sind, spezifische Wachstumsfaktoren als Liganden zu binden und über die resultierende Aktivierung der intrazellulär liegenden Kinase-Domäne eine wachstums- und proliferationsfördernde Signalkaskade in Gang zu setzen. Mit dem Ki-67-Zell-Proliferations-Test sollte von daher geklärt werden, ob die Interaktion des Antiserums gegen *Borrelia burgdorferi* mit ERBB3 einen Effekt auf die Tyrosin-Kinase-Aktivität dieses Rezeptors und damit auf die Proliferation von SH-SY5Y- und T-47D-Zellen hat. Ki-67 ist dabei ein Protein, das im Zellkern aktiv sich teilender Zellen gebildet wird, so dass über dessen Nachweis die Proliferationsrate einer Zellpopulation durch Immunfluoreszenz untersucht werden kann. Dafür wurden SH-SY5Y- und T-47D-Zellen auf Deckgläsern ausgesät und über Nacht mit den Antiseren gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* für zwölf Stunden vorinkubiert. Als Primär-Antikörper wurde ein Antikörper gegen das Protein Ki-67 eingesetzt. Als Gegenfärbung zur Ermittlung der Gesamt-Zell-Zahl wurde eine DAPI-Fluoreszenz-Färbung benutzt. Als Kontrolle wurden nicht vorinkubierte SH-SY5Y- und T-47D-Zellen genutzt. Als Kontroll-Antikörper bei der Vorbehandlung der Zellen wurde der Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper verwendet, da dieser nachweislich keine Interaktion mit dem Protein ERBB3 aufweist. Die Aufnahmen der Zellen wurden mit einem Aufricht-Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena, Deutschland) und einem darauf montierten digitalen Kamera-System (Axiocam, Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt, und die Ki-67-positiven Zellen sowie die Gesamtzellzahl durch manuelle Auszählung ermittelt.

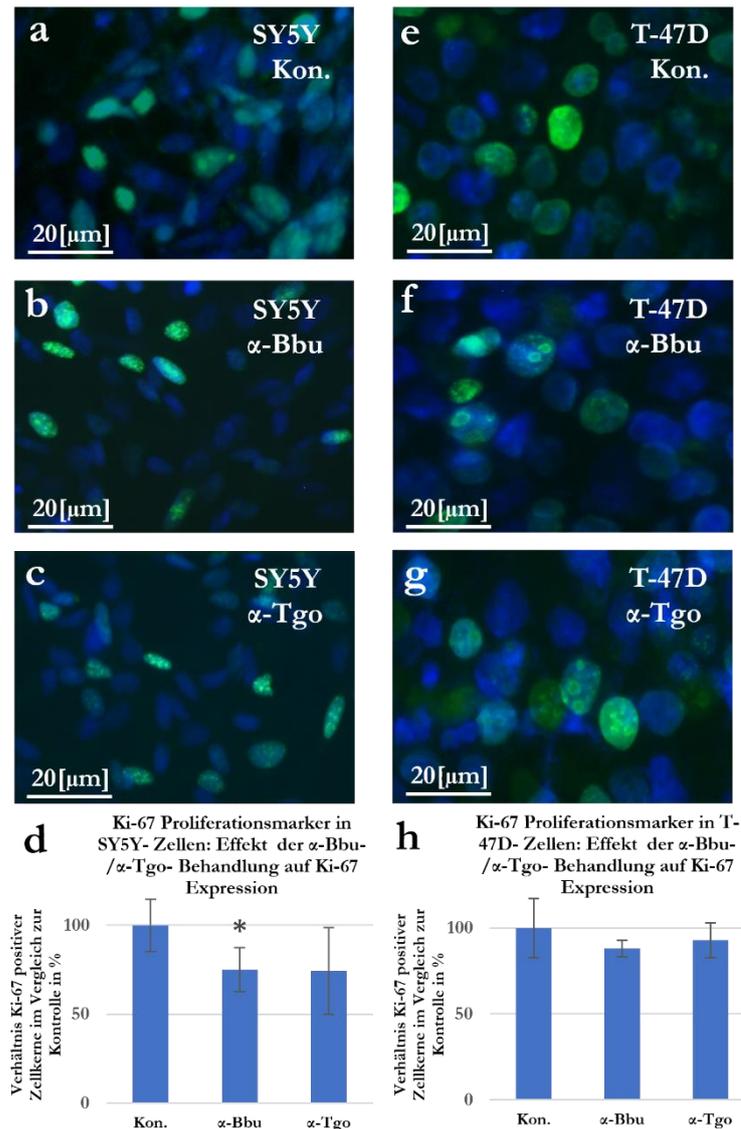


Abbildung 24: Bestimmung der Expression des Proliferations-Markers Ki-67 von SH-SY5Y- und T-47D-Zellen. Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung. (a-c) Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in SH-SY5Y-Zellen (a) Unbehandelte SH-SY5Y-Kontrolle. (b) Mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte SH-SY5Y-Zellen. (c) Mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelte SH-SY5Y-Zellen. (d) Diagramm der statistischen Auswertung einer Serie von Aufnahmen wie in den Bildern (a-c) gezeigt. Prozentuales Verhältnis der Ki-67 positiven Zellkerne der mit Antisera gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* behandelten SH-SY5Y-Zellen. (e-g) Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 in T-47D-Zellen (e) Unbehandelte T-47D-Kontrolle. (f) Mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte T-47D-Zellen. (g) Mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelte T-47D-Zellen. (h) Diagramm der statistischen Auswertung einer Serie von Aufnahmen wie in den Bildern (e-g) gezeigt. Prozentuales Verhältnis der Ki-67-positiven Zellkerne der mit Antisera gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* behandelten T-47D-Zellen.

Wie auf Abbildung 24 zu sehen ist, zeigt der mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewertete Ki-67-Zell-Proliferations-Test für die nicht-behandelte SH-SY5Y-Kontrolle einen Anteil von 30 % Ki-67-positiver Zellkerne und damit nicht in der G₀-Phase befindlicher proliferierender Zellen. Die mit den Antisera gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* vorbehandelten SH-SY5Y-Zellen zeigen demgegenüber eine Abnahme des Anteils Ki-67-positiver

Zellkerne, wobei nur die Vorbehandlung mit dem Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper eine signifikante Abnahme von 25 % im Vergleich zur nicht-behandelten SH-SY5Y-Kontrolle auszulösen vermag (* $p < 0,05$). Für die unbehandelte T-47D-Kontrolle konnte ein im Vergleich zur SH-SY5Y-Kontrolle höheres Verhältnis an Ki-67-positiven Zellkernen von 51 % ermittelt werden. Für die mit den Antiseren gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* behandelten T-47D-Zellen konnte keine signifikante Abnahme des Verhältnisses der Ki-67-positiven Zellkerne im Vergleich zur unbehandelten T-47D-Kontrolle gezeigt werden (siehe auch Tabelle 25).

Tabelle 25: Statistische Auswertung zum Ki-67-Zell-Proliferaions-Tests mit SH-SY5Y- und T-47D-Zellen. Die Test-Ansätze nicht-behandelte Kontrolle, *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-behandelt und *Toxoplasma gondii*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach Mittelwert des Verhältnis Ki-67-positiver zu DAPI-positiven Zellkernen, Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standardabweichung.

	SH-SY5Y- Kontrolle	SH-SY5Y- α -Bbu	SH-SY5Y- α -Tgo	T-47D- Kontrolle	T-47D- α -Bbu	T-47D- α -Tgo
Mittelwert des Verhältnis Ki-67-positiver zu DAPI-positiven Zellkernen	0,308	0,231	0,229	0,516	0,454	0,479
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	75 %	74 %	100 %	88 %	93 %
P-Wert	-	0,023	0,052	-	0,14	0,27
Standardabweichung	0,045	0,028	0,055	0,088	0,021	0,048

3.12 Auszählung der Mitosefiguren von DAPI-gefärbten SH-SY5Y- und T-47D-Zellen als weitere Methode zur Bestimmung der Proliferationsrate

Als Mitosefiguren werden charakteristische Anordnungen der zellulären Chromosomen während der Zellteilung bezeichnet. Je nach Mitosephase (Pro-, Meta- und Anaphase) können verschiedenen Figuren identifiziert werden. Da nur Mitose betreibende und damit aktiv proliferierende Zellen Mitosefiguren aufweisen, kann eine Zählung der Mitosefiguren einen Rückschluss auf die Proliferationsrate einer Zell-Linie geben. Mittels der Mitosefigur-Zählung wurde der Effekt des Antiserums gegen *Borrelia burgdorferi* auf die Proliferationsrate von SH-SY5Y- und T-47D erneut untersucht. Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden dafür über Nacht mit den Antiseren gegen *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* vorbehandelt. Die Zellen wurden dann fixiert und mit einem speziellen Eindeckmedium, das den Fluoreszenzfarbstoff DAPI enthielt auf Objektträgern aufgebracht. Die manuelle Auszählung

der Zellen wurde mit einem Aufricht-Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Es wurden pro Test-Ansatz 50 Hauptgesichtsfelder ausgezählt, in Mitose-Figuren pro mm^2 umgerechnet und im Verhältnis zur nicht-behandelten Kontrolle dargestellt. Als Kontrolle wurden nicht-vorbehandelte SH-SY5Y- und T-47D-Zellen genutzt. Als Kontroll-Antikörper für die Vorbehandlung diente der Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper, der keine Interaktion mit dem ERBB3-Rezeptor aufweist.

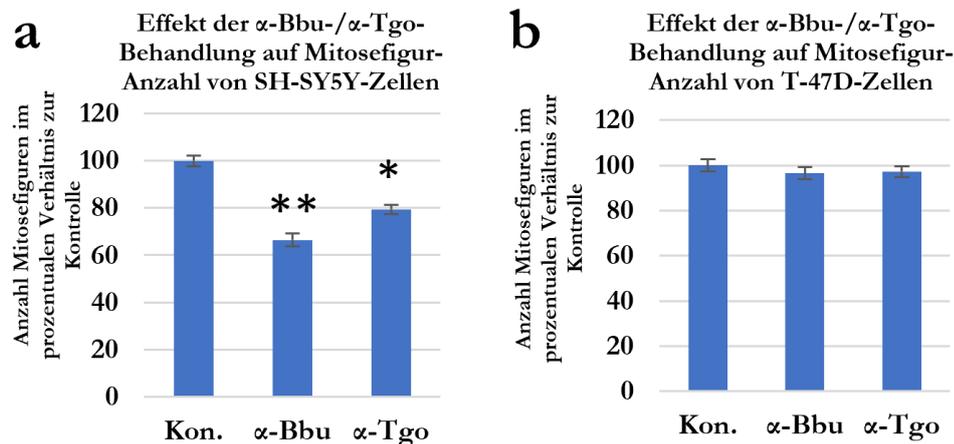


Abbildung 25: Statistische Auswertung der Mitose-Figuren-Anzahl pro mm^2 in DAPI-gefärbten SH-SY5Y- und T-47D-Zellen. (a) Diagramm der statistischen Auswertung der Zahl an Mitosefiguren in SH-SY5Y-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung mit Erreger-spezifischen Antisera. (b) Diagramm der statistischen Auswertung der Zahl an Mitosefiguren in T-47D-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung mit Erreger-spezifischen Antisera. Dargestellt ist jeweils das prozentuale Verhältnis der Anzahl an Mitosefiguren bei mit Antikörpern vorbehandelten Zellen zur Anzahl an Mitosefiguren in nicht vorbehandelten Kontroll-Zellen.

Wie die beiden Diagramme in Abbildung 25 zeigen, weisen DAPI-gefärbte SH-SY5Y-Zellen, die mit Anti-*Borrelia burgdorferi*-Antikörper vorbehandelt worden waren, im Vergleich zu nicht vorbehandelten Kontrollzellen eine hochsignifikante Abnahme der Mitosefiguren um 33 % (** $p < 0,01$) auf. Eine vergleichbare signifikante Abnahme an Mitosefiguren, um 20 % (* $p < 0,05$) konnte auch in mit Anti-*Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelten SH-SY5Y-Zellen festgestellt werden. Für die Zell-Linie T-47D waren im Gegensatz dazu keine signifikanten Effekte einer Vorbehandlung mit den beiden Erreger-spezifischen Antisera auf die Rate an Mitosefiguren beobachtbar (siehe auch Tabelle 26).

Tabelle 26: Statistische Auswertung zur Mitosefiguren-Rate mit SH-SY5Y- und T-47D-Zellen. Die Test-Ansätze nicht-behandelte Kontrolle, *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-behandelt und *Toxoplasma gondii*-Antikörper-behandelt sind aufgetragen nach DAPI-positiven Mitosefiguren pro mm², Verhältnis zur Kontrolle, P-Wert und Standartabweichung.

	SH-SY5Y- Kontrolle	SH-SY5Y- α -Bbu	SH-SY5Y- α -Tgo	T-47D- Kontrolle	T-47D- α -Bbu	T-47D- α -Tgo
DAPI-positive Mitosefiguren pro mm ²	15,9	10,5	13	15	14,5	14,4
Verhältnis zur Kontrolle	100 %	67 %	82 %	100 %	97 %	96 %
P-Wert	-	0,017	0,052	-	0,44	0,41
Standartabweichung	1,8	1,6	0,7	3,1	2,7	1,2

3.13 ERBB3-Phosphorylierungs-Assay mit SH-SY5Y- und T-47D-Zell-Lysat

Eine weitere Möglichkeit Effekte eines Antiserums gegen *Borrelia burgdorferi* auf den Tyrosinkinase-Rezeptor ERBB3 sichtbar zu machen, besteht in der Bestimmung des Phosphorylierungsgrades dieses Rezeptors nach einer Stimulierung mit seinem spezifischen Liganden NRG-1. Eine Liganden-abhängige Aktivierung von ERBB3 führt dabei zu einer Phosphorylierung der intrazellulären Domäne des Rezeptors an verschiedenen Aminosäuren, darunter auch des an Position Y1289 gelegenen Tyrosins. Eine Änderung des Aktivierungs-Grades der Rezeptor-Domäne z.B. aufgrund einer Interaktion mit einem antibakteriellen Antiserum sollte von daher zu einer veränderten Tyrosin-Phosphorylierung an Position Y1289 führen. Zur Quantifizierung der Phosphorylierung von ERBB3 an Position Y1289 wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch an das Epitop mit phosphoryliertem Tyrosin in Position Y1289 bindet.

Wie in Abbildung 27 zu sehen, konnte auch in diesem Fall in mit Antiserum gegen ERBB3 vorbehandelten SH-SY5Y- und T-47D-Zellen keine Änderung des Phosphorylierungs-Grades der Rezeptor-Tyrosin-Kinase ERBB3 nachgewiesen werden. Es konnte kein phosphoryliertes ERBB3 in SH-SY5Y-Zellen nachgewiesen werden. Die Zell-Linie T-47D zeigte keine Änderung des Phosphorylierungs-Grades in den mit dem Antiserum gegen ERBB3 vorbehandelten Test-Ansätzen.

3.14 Epitop-Kartierung mittels *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0* der *Immune Epitope Database*

Eine mögliche Antwort auf die Frage, wie es überhaupt zu den hier beschriebenen Interaktionen antibakterieller Antiseren mit humanen fötalen Proteinen kommen kann, besteht im Auftreten strukturell ähnlicher Domänen, die sowohl in humanen fötalen als auch in bakteriellen Proteinen vorkommen. Aufgrund solcher Ähnlichkeiten wären antibakterielle Antikörper nicht mehr in der Lage zwischen bakteriellen und humanen Antigenen zu unterscheiden und würden somit an beide Proteinklassen binden, ein Mechanismus, der mit dem Begriff der molekularen Mimikry umschrieben wird. Um der Frage nachzugehen, ob dieses Phänomen auch auf die hier untersuchten Proteine zutreffen könnte, wurden diese mit den Programmen *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0* der *Immune Epitope Database* auf das Vorliegen struktureller Ähnlichkeiten zu Proteinen der Pathogene, gegen welche die hier verwendeten Erreger-spezifischen Antiseren gerichtet waren (*Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* und *Toxoplasma gondii*) untersucht.

Dazu wurden zunächst die Aminosäure-Sequenzen der Proteine ASTN2, ERBB3 und SYT5 mit dem Programm *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* auf Epitope untersucht. Dieses Programm ist aufgrund eines speziellen Algorithmus in der Lage lineare (kontinuierliche) Epitope in der Primär-Struktur von Proteinsequenzen zu erkennen, welche für eine Erkennung durch Antikörper besonders prädestiniert sind. Die Sequenzen der Proteine ASTN2, CPLX2, ERBB3 und SYT5 wurden dafür im sog. *FASTA*-Format verwendet. Die von *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* identifizierten Epitope wurden dann noch mit dem Programm *DiscoTope 2.0* untersucht, das in der Lage ist aus diskontinuierlichen Sequenzen räumlich zusammengesetzte Epitope in drei-dimensionalen Proteinstrukturen zu erkennen. Die drei-dimensionalen Protein-Strukturen der hier untersuchten Proteine wurden dafür mittels PDB-Codes (*Protein Data Bank*) in dieses Programm eingegeben und auf die statistische Epitop-Wahrscheinlichkeit der gefalteten Aminosäure-Sequenz, die räumliche Orientierung der beteiligten Aminosäure-Restgruppen und schließlich deren Oberflächen-Zugänglichkeit für Antikörper hin untersucht. Leider standen für diese Untersuchungen nur die Strukturen der Proteine ASTN2, ERBB3 und SYT5 zur Verfügung, da eine eindeutige kristallographische Entschlüsselung des Proteins CPLX2 bislang nicht vorliegt. Die ermittelten Epitop-Sequenzen der fötalen Proteine wurden dann mithilfe des *Alignment-Tools BLAST* auf Se-

quenz-Ähnlichkeiten von Proteinen der Pathogene *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* und *Toxoplasma gondii* untersucht. Die mit den Epitopen fötaler Proteine übereinstimmenden Sequenzen von der Erreger-Proteinen wurden ebenfalls anhand der Programme *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0* auf die statistische Wahrscheinlichkeit Teil eines Epitopes zu sein überprüft. Dabei wurde das Proteom von *Borrelia burgdorferi* (Taxonomic-ID: 139), *Campylobacter jejuni* (Taxonomic-ID: 197), *Helicobacter pylori* (Taxonomic-ID: 210) und *Toxoplasma gondii* (Taxonomic-ID: 5811) mittels *BLAST* überprüft. Als Kontrolle wurde das Verfahren mit struktur-ähnlichen fötalen Proteinen wiederholt, welche keine Interaktionen mit den Erreger-spezifischen Antisera aufwiesen.

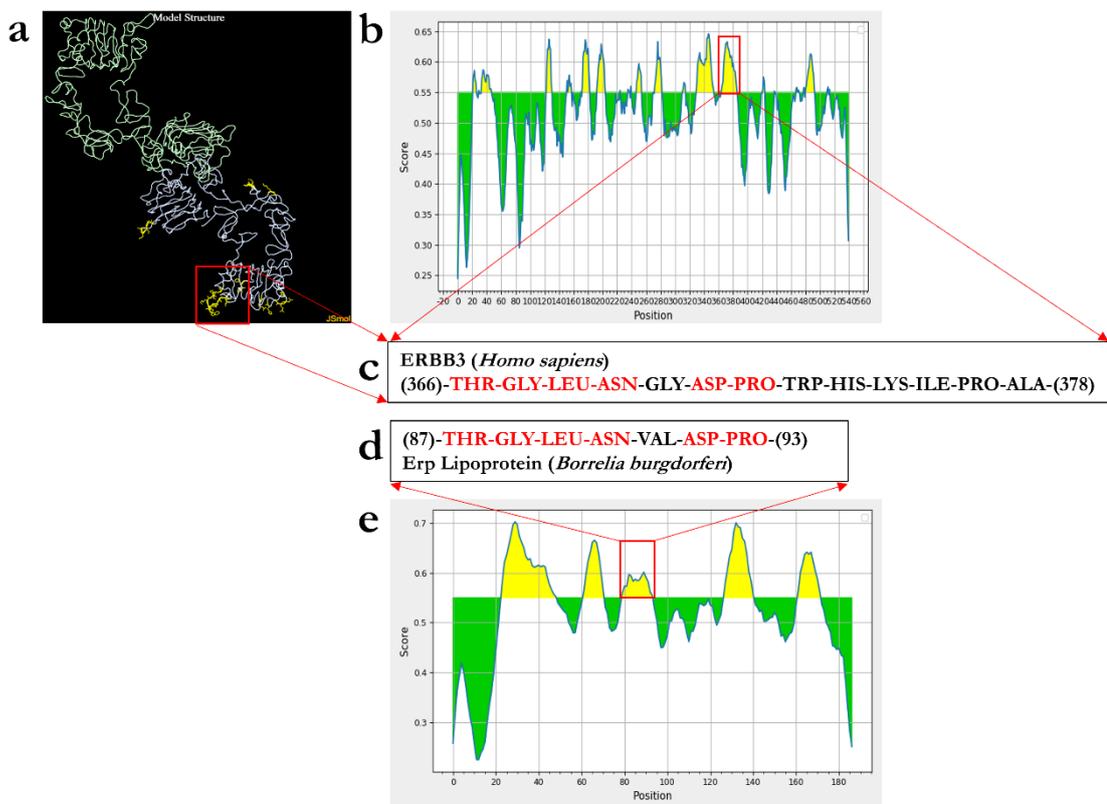


Abbildung 28: Epitop-Kartierung des humanen Proteins ERBB3 mittels *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0*. (a) Räumliche Struktur der Extrazellulär-Domäne des Proteins ERBB3, dargestellt im Jmol-Format. Gelb leuchtende Aminosäure-Reste entsprechen den mittels *DiscoTope 2.0* identifizierten diskontinuierlichen Epitopen. Der rot-eingerahmte Teil der Abbildung stellt das Epitop zwischen Aminosäure-Position 366 und 378 dar. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Jmol: *an open-source Java viewer for chemical structures in 3D*. (b) Die mit *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* identifizierten linearen Epitope des Proteins ERBB3 sind als gelbe Fläche dargestellt. Der rot-eingerahmte Teil der Abbildung stellt das Epitop zwischen Aminosäure-Position 366 und 378 dar. (c) Aminosäure-Sequenz des Epitopes von Aminosäure-Position 366 bis 378 des Proteins ERBB3. (d) Aminosäure-Sequenz des Epitopes von Aminosäure-Position 87 bis 93 des Proteins Erp Lipoprotein. (e) Die mit *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* identifizierten linearen Epitope des Proteins Erp Lipoprotein sind als gelbe Fläche dargestellt. Die Nutzung der Abbildungen (b) und (e) erfolgt mit freundlicher Genehmigung der IEDB und der Autoren des Programms *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0*.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, konnte im Ergebnis immerhin eine Epitop-Sequenz [366-THR-GLY-LEU-ASN-GLY-ASP-PRO-TRP-HIS-LYS-ILE-PRO-ALA-378] des Proteins ERBB3 sowohl als ein lineares (kontinuierliches) Epitop als auch als das einzig größere diskontinuierliche (räumliche) Epitop identifiziert werden, welches auch ein Pendant auf einem Protein des zugehörigen Erregers *Borrelia burgdorferi* aufwies. Es zeigte sich dabei, dass durch das Programm *BLAST* zunächst mehrere Proteine des Bakteriums *Borrelia burgdorferi* mit Epitopen identifiziert werden konnten, die eine zum ERBB3 Epitop ähnliche Sequenz aufweisen. Von diesen Proteinen konnte jedoch mit dem Programm *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* nur für das bakterielle Protein *Erp family outer-surface-Lipoprotein* (NCBI Reference Sequence: WP_106007531.1) ein sowohl in der Sequenz [87-THR-GLY-LEU-ASN-VAL-ASP-PRO-93] als auch in der dreidimensionalen Struktur übereinstimmendes Epitop mit ausreichender Bindungswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden.

Zwar konnte auch auf dem Protein ASTN2 ein oberflächliches Epitop ermittelt werden, das mit einem Protein des Bakteriums *Helicobacter pylori* strukturelle Ähnlichkeiten aufweist. Dabei schlug jedoch die Kontrolluntersuchung mit dem verwandten Protein ASTN1 fehl, da das gefundene Epitop auch bei diesem Protein gefunden werden kann, obwohl eine Interaktion des Antiserums gegen *Helicobacter pylori* mit diesem Protein nicht nachgewiesen wurde. Eine Bindung des Antiserums gegen *Helicobacter pylori* an ASTN2 über dieses Epitop ist von daher aufgrund der fehlenden Spezifität zwar grundsätzlich möglich, jedoch wenig spezifisch. Dem Protein SYT5 konnte kein eindeutiges oberflächliches Epitop auf einem Protein des Bakteriums *Helicobacter pylori* zugewiesen werden.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen die Bindung verschiedener Bakterien-spezifischer Antikörper an unterschiedliche neuronale Antigene, deren funktionelle Konsequenzen dann anhand einzelner ausgewählter Beispiele genauer charakterisiert wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche legen den Schluss nahe, dass ein solcher Mechanismus sehr wahrscheinlich an der Auslösung neuronaler Auto-Immun-Erkrankungen beteiligt ist. Im Folgenden sollen daher einerseits verschiedene bereits bekannte Mechanismen pathologischer Antikörper-Interaktionen im Kontext mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen diskutiert werden. Andererseits soll auch eine kritische Auseinandersetzung mit den verwendeten Methoden sowie mit den in diesem Zusammenhang auftretenden wissenschaftlich-ethischen Fragestellungen erfolgen.

4.1 Antibakterielle Antikörper als Auslöser von Auto-Immun-Enzephalitiden und ihr Einfluss auf die fötale Gehirnentwicklung

Aufgrund bakterieller Infektionen gebildete maternale Antikörper des IgG-Subtyps können transplazentar in das fötale Blut gelangen und dadurch mit Proteinen des fötalen Gehirns in Kontakt kommen. Binden solche Antikörper an ein solches Protein können sie aufgrund dieser Kreuz-Reaktivität als neuronale Auto-Antikörper agieren und dadurch die Funktion des betroffenen Proteins beeinträchtigen. Dies wiederum kann die Funktionalität ganzer Zell-Gruppen, welche das entsprechende Protein exprimieren, beeinträchtigen. Im Extremfall kann dadurch aufgrund der Aktivierung weiterer immunologischer Mechanismen eine Enzephalitis ausgelöst werden, welche zum Untergang betroffener Zellen und Hirn-Areale führen kann. Auch eine durch Auto-Antikörper ausgelöste Störung der Proliferation neuronaler Vorläuferzellen während der frühen Gehirnentwicklung wäre denkbar, welche langfristig zu Veränderungen der Struktur des adulten Gehirns beitragen kann. Eine solche Störung wird als entwicklungsbiologische Grundlage einer Vulnerabilität betroffener Patienten angesehen, im späteren Leben an einer neuropsychiatrischen Erkrankung wie der Schizophrenie zu erkranken. Bei Vorliegen einer solchen Vorbelastung kann es dann, wie im sog. Diathese-Stress-Modell postuliert, bei erhöhter psychischer Belastung der Betroffenen zur Manifestation einer Psychose kommen, obwohl zu diesem Zeitpunkt kein aktiver Entzündungs-Prozess und kein auslösendes Agens mehr nachgewiesen werden kann. Mit der modernen Bildgebung können strukturelle und funktionelle Änderungen im Gehirn von Schizophrenie-Patienten nachgewiesen werden. Diese umfassen unter anderem eine ausgedehnte Volumen-Abnahme grauer Materie im Neokortex und in subkortikalen Regionen sowie eine reduzierte Aktivität des medialen präfrontalen Kortex, des linken Hippocampus, des posterioren *Gyrus cinguli* und des *Precuneus* (Birur et al. 2017). Möglicherweise könnten diese Änderungen auf eine während der Neurogenese stattgehabte immunologische Beeinflussung hindeuten.

In den folgenden Abschnitten soll der Frage nachgegangen werden, wie maternal produzierte Antikörper mit möglichen Ziel-Antigenen jenseits der fötalen Blut-Hirn-Schranke (BHS) in Kontakt treten können, welche Auswirkungen bereits bekannte neuronale Auto-Antikörper auf das ZNS haben und wie die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Antikörper-Interaktionen in diesen Kontext einzuordnen sind.

4.1.1 Die Blut-Hirn-Schranke und ihre Überwindung durch Auto-Antikörper

Damit Auto-Antikörper mit ihren Ziel-Antigenen interagieren können und zu einer Beeinflussung der ZNS-Funktion oder einer Enzephalitis führen, müssen die Immunglobuline zunächst einmal in das ZNS gelangen. In dieses System zu gelangen ist jedoch für Antikörper nicht trivial, so stellt das ZNS ein immunologisch privilegiertes System dar, welches sich selbst durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und die Blut-Liquor-Schranke (BLS) vor dem Eindringen von Plasma-Proteinen wie den Immunglobulinen schützt. Im Folgenden werden die Eigenschaften der adulten sowie der fötalen BHS als auch der BLS dargelegt und welche Wege zur Überwindung durch Auto-Antikörper bekannt sind.

4.1.1.1 Die adulte Blut-Hirn-Schranke

Viele Eigenschaften der fötalen BHS sind noch nicht genau verstanden oder erforscht. Einige Eigenschaften der fötalen Blut-Hirn/Liquor-Schranken überschneiden sich mit denen der adulten, weshalb sich einige der Erkenntnisse über die adulte Barriere-Funktion auch auf die fötale BHS anwenden lassen. Die adulte BHS stellt eine hoch-selektive Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem ZNS dar. Nährstoffe und Metabolite werden streng reguliert über Endothel-Zellen ausgetauscht. Ein parazellulärer Transport von Molekülen über die fötale als auch die adulte BHS kann durch dichte Zell-Zell-Kontakt-Proteine, die *Tight-Junctions*, verhindert werden. Während bisher kein aktiver Antikörper-Transport identifiziert wurde, konnten verschiedene Zustände, die zu einer gesteigerten Permeabilität der BHS führen, bereits belegt werden. Entzündungsprozesse im Rahmen von Infektionen, Auto-Immun-Erkrankungen oder Tumoren, welche zur Ausschüttung verschiedener inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α , CCL-2 und IL-17A führen, können über eine Modifikation der an der Barriere-Funktion beteiligten Proteine die Integrität der BHS beeinflussen (Platt et al. 2017). Auto-Antikörper selbst sind in der Lage die Permeabilität der BHS zu manipulieren. Auto-Antikörper gegen den NR2-Glutamat-Rezeptor, wie sie bei Menschen die an einem systemischem Lupus Erythematoses leiden, zu finden sind, führen zu einer vermehrten Ausschüttung von permeabilisierenden Zytokinen und zu einer gesteigerten Expression von VCAM-1 und ICAM-1, welche die Infiltration von Lymphozyten erleichtern (Yoshio et al. 2013). Darüber hinaus ist das Endothel der zentral nervösen zirkum-ventrikulären Organe fenestriert und weist daher eine erhöhte Permeabilität auf (Morita und Miyata 2012).

4.1.1.2 Die adulte Blut-Liquor-Schranke

Die BLS stellt eine Barriere zwischen dem Blut-Kreislauf und den zentral nervösen Liquorräumen dar. Die Zellen des *Plexus Choroideus* bilden diese Barriere und produzieren einen Großteil des Liquors. Die BLS besitzt im Unterschied zur Blut-Hirn-Schranke teilweise fenestriertes Endothel, Blut-Proteine und Immunglobuline können daher leichter durch passive Diffusion diese Barriere überwinden und in den Liquor gelangen (Tumani et al. 2018). Auto-Antikörper wie sie unter anderem bei der NMDAR-Enzephalitis zu finden sind, überwinden diese Barriere und werden im Rahmen einer Basis-Diagnostik im Liquor der Betroffenen nachgewiesen (Zuliani et al. 2012). Doch können Antikörper, welche in den Liquor gelangen auch direkt mit neuronalem Gewebe interagieren? Hinweise für diese These liefern Experimente mit Auto-Antikörpern, die aus menschlichem Serum isoliert worden sind. Auto-Antikörper gegen Aquaporin-4, die auslösenden Immunglobuline der Erkrankung Neuromyelitis Optica können direkt aus dem Liquor in das Hirn-Parenchym gelangen und Erkrankungsspezifische Symptome auslösen (Mørch et al. 2018). Eine Bestätigung eines solchen Effektes mit Immunglobulinen in Föten steht bisweilen aus.

4.1.1.3 Die fötale Blut-Hirn-Schranke

Der funktionelle Zustand der fötalen BHS ist ein Gegenstand kontroverser Diskussionen. Die frühere Annahme, dass die BHS des fötalen Gehirns noch nicht voll funktionsfähig ist, hat sich nicht bestätigt. Versuche mit Säugetieren haben gezeigt, dass unter nicht-pathologischen Bedingungen Plasma-Proteine die fötale BHS nicht in signifikanten Mengen überwinden. Die Barriere-Funktion ist damit bereits effektiv an das sich entwickelnde ZNS angepasst (Saunders et al. 2012). Demgegenüber steht jedoch eine höhere Fragilität der fötalen zerebralen Blut-Kapillaren und damit der fötalen BHS. Eine systemische Störung wie z.B. eine Entzündung kann daher sehr viel leichter als beim adulten Gehirn zu einer mechanischen Störung der Barriere-Funktion führen und es so Plasma-Proteinen ermöglichen in das ZNS einzudringen. Dieser pathologische Prozess konnte bereits in Tierversuchen für Kapillaren in der weißen Hirn-Substanz nachgewiesen werden (Stolp et al. 2005; Stolp und Dziegielewska 2009).

4.1.1.4 Die fötale Blut-Liquor-Schranke

Eine weitere mögliche Eintrittsstelle von Plasma-Proteinen wie den Immunglobulinen in das fötale ZNS könnte ähnlich wie bei Erwachsenen deren Aufnahme aus dem Liquor sein. Ein fötaler Protein-Transfer aus dem Blut in den Liquor über den Plexus choroideus ist seit einiger Zeit belegt (Seller und Adinolfi 1975). In Experimenten mit Ratten konnte nachgewiesen werden, dass manche Plasma-Proteine aus dem Liquor direkt in das ZNS gelangen können (Dziegielewska et al. 2000). Die Menge an aufgenommenen Proteinen aus dem Liquor korreliert dabei positiv mit der Stärke eines Entzündungsprozesses und führt zu einer gestörten Entwicklung des fötalen Kortex in Mäusen (Stolp et al. 2011). Jedoch bleibt nach wie vor unklar, welche Mengen an Plasma-Proteinen und Immunglobulinen durch Überwindung

der BHS oder durch den direkten Transfer aus dem Liquor in das ZNS gelangen können und wie folgeschwer das Ausmaß eines verursachten Schadens ist.

4.2 Neuronale Auto-Antikörper

Ein breites Spektrum an neuronalen Auto-Antikörpern ist bereits bekannt, ihre Entstehung und deren pathologische Mechanismen sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Man kann diese Antikörper in obligat Tumor assoziierte und fakultativ Tumor assoziierte Auto-Antikörper einteilen. Fakultativ Tumor assoziierte Auto-Antikörper können auch ohne nachweisbare Tumor-Erkrankung auftreten, die Ziel-Antigene dieser Antikörper liegen meist membran-gebunden auf Zell-Oberflächen vor und können somit leichter mit Antikörpern interagieren. Obligat Tumor assoziierte Antikörper treten im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms bei Tumor-Erkrankungen auf und sind immunologisch gegen Tumor-Antigene gerichtet, häufig sind die auto-immunologischen Ziel-Antigene intrazellulär gelegen. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Experimente zu den Proteinen ASTN2 und ERBB3 als Membran-gebundene Ziel-Antigenen und zu den Proteinen SYT5 und CPLX2 als intrazellulär gelegene Ziel-Antigene diskutiert.

4.2.1 Auto-Immun-Enzephalitiden ausgelöst durch Antikörper-Interaktionen mit Membran-Proteinen

Fakultativ Tumor assoziierte Auto-Antikörper sind vor allem gegen membranständige Antigene gerichtet und führen zu Auto-Immun-Enzephalitiden, welche auch in Abwesenheit einer tumorösen Erkrankung auftreten können. Die immunologische Ätiologie dieser Antikörper ist noch nicht genau geklärt, neben dem Hauptfaktor einer Tumor-Erkrankung lassen Studien-Ergebnisse einen Zusammenhang mit systemischen Infektionen wie einer *Herpes Simplex*-Infektion vermuten (Prüss et al. 2012). Im Gegensatz zu den gegen intrazelluläre Antigene gerichteten Antikörpern, ist bei dieser Form die direkt pathogene Wirkung der Antikörper gegen membranständige Oberflächen-Antigene von Bedeutung. Die Interaktion der Auto-Antikörper mit diesen Antigenen führt zu einer direkten Störung der Funktion des betroffenen Proteins, wodurch funktions-abhängige spezifische Symptome entstehen (Lancaster und Dalmau 2012). Die betroffenen Menschen profitieren darüber hinaus mehr von einer immunsuppressiven Therapie als solche mit nicht direkt pathogenen Auto-Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene (Lancaster 2016). Der bekannteste Vertreter der Auto-Immun-Enzephalitis auslösenden Antikörper ist der NMDA-Rezeptor-Antikörper. NMDA-Rezeptoren sind Glutamat-Rezeptoren in postsynaptischen Membranen im ZNS und sind beteiligt an der synaptischen Plastizität, welche einen wesentlichen Prozess zur Gedächtnis-Bildung darstellt. Studien zeigen, dass ca. 1 % der Bevölkerung eine klinisch asymptomatische Sero-Prävalenz aufweisen. Bei diesen Antikörpern handelt es sich ebenfalls größtenteils um plazentagängige Antikörper vom Sub-Typ IgG (Dahm et al. 2014). Interessanterweise wurde ein erhöhter Titer häufiger bei Menschen gefunden, die an einer schizophrenen Psychose

litten (Steiner et al. 2013). Diese Erkenntnisse führten zu der Frage, ob diese spezifische Auto-Immunität ebenfalls durch die mütterliche Leih-Immunität in Form von transplazentar transferierten IgG-Antikörpern auf Föten übertragen werden kann. In Tierversuchen mit Mäusen konnte ermittelt werden, dass von Mutter-Tieren produzierte Anti-NMDAR-Antikörper ebenfalls transplazentar in den Blutkreislauf des Fötus gelangen und zu einer reduzierten Dichte der Rezeptoren auf Neuronen führte. In der Folge konnte eine gestörte neuronale Entwicklung mit manifesten Spätfolgen wie Verhaltens-Änderungen und einer Volumen-Minderung von Kleinhirn, Mittelhirn und Hirnstamm bis in das Erwachsenen-Alter des Nachwuchses festgestellt werden. Es wird daher angenommen, dass diese Effekte zur Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie beitragen können (Jurek et al. 2019).

Ein solcher Mechanismus könnte auch bei den in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteinen ASTN2 und ERBB3 eine Rolle spielen, da es sich bei beiden Proteinen um membranständige Oberflächen-Proteine handelt, welche während der Neurogenese funktionell von besonderer Bedeutung sind. Während für Auto-Antikörper gegen den NMDA-Rezeptor auf exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen bereits spezifische Symptome wie Psychosen, Bewusstseinsstörungen und epileptischen Anfälle nachgewiesen wurden, stellt sich die Frage, welche Konsequenzen Interaktionen der entsprechenden Antikörper mit den Oberflächen-Proteinen ASTN2 und ERBB3 haben könnten.

4.2.2 Antikörper-Interaktion mit dem neuronalen Transmembran-Protein ASTN2

Bei dem Protein ASTN2 handelt es sich um einen integralen Bestandteil von Membranen migrierender Neuronen. Funktionell scheint es durch Regulation des ihm strukturell ähnelnden Proteins ASTN1 zur Ausbildung neuronal-glialer-Bindungen beizutragen und fördert so die neuronale Migration und Wuchsrichtung (Wilson et al. 2010). Aufgrund des in dieser Arbeit erbrachten Nachweises einer spezifischen Bindung des Antikörpers gegen *Helicobacter pylori* an das neuronale Protein ASTN2 mittels *bEXselect*-Multiprotein-Array (siehe Abbildung 8) und mit den Methoden Western Blot und 2D-Gelelektrophorese (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11), wollten wir überprüfen, ob diese Bindung zu einer spezifischen funktionellen Konsequenz auf zellulärer Ebene führt.

4.2.2.1 Neuriten-Längen-Wachstum in SiMa-Zellen

Interessanter Weise konnten wir darstellen, dass eine Behandlung mit *Helicobacter pylori*-Antikörper, nicht aber mit *Campylobacter jejuni*-Antikörper zu einer verminderten Wuchslänge von Neuriten in SiMa-Neuroblastom-Zellen führt. Im Vergleich zur nicht-Antikörper behandelten Kontrolle zeigten mit *Helicobacter pylori*-Antikörper behandelte SiMa-Zellen eine im Vergleich zur Kontrolle verkürzte Neuriten-Länge von 40 % (1,21 μm) nach zwölf Stunden bzw. von 46 % (1,67 μm) nach 24 Stunden und 45 % (1,36 μm) nach 48 Stunden (**p < 0,001) (siehe Abbildung 13). Die These, dass eine Bindung des *Helicobacter pylori*-Antiserums zu die-

ser spezifischen funktionellen Auswirkung führt, stützt sich auf die folgenden Beobachtungen. Zum einen konnten wir zeigen, dass ein spezifischer gegen ASTN2 gerichteter Antikörper zu einem vergleichbaren verminderten axonalen Wachstum führt. Unspezifische Effekte wie eine Minderung der mitochondrialen Leistungsfähigkeit, welche mittels MTT-Assays überprüft wurde, kann nicht in Zusammenhang mit dieser Beobachtung gebracht werden, da mit Antiserum gegen *Helicobacter pylori* keine reduzierte mitochondriale Leistung gemessen werden konnte. Ebenso konnte anhand der Tyrosin-Hydroxylase-Intensität gezeigt werden, dass die Synthese-Leistung von spezifisch neuronalen Proteinen nicht durch *Helicobacter pylori*-Antiserum beeinflusst wird, wodurch sich ebenfalls eine verminderte ASTN2-Aktivität hätte erklären lassen. Wir konnten durch diese Experimente zeigen, dass eine spezifische Beeinflussung des membran-ständigen Proteins ASTN2 zu einer geänderten Funktion und damit zu einem verminderten Wachstum von Axonen führt. Dieses Ergebnis lässt sich unter dem Aspekt, dass sich eine geänderte ASTN2-Funktion tatsächlich auch in Patienten, welche an Schizophrenie und anderen neuronalen Entwicklungsstörungen leiden, finden lässt, in den aktuellen Stand der Forschung einbeziehen. So konnte ein Zusammenhang zwischen den ASTN2-Gen betreffenden chromosomalen Aberrationen und dem Auftreten von Schizophrenie und anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen aus dem Bereich der Autismus Spektrum Erkrankungen oder ADHD beobachtet werden (Vrijenhoek et al. 2008; Lionel et al. 2014). Eine Beeinflussung des Proteins ASTN2 könnte jedoch auch noch Auswirkungen auf die Hirnfunktion nach bereits abgeschlossener Neurogenese zu haben, da ASTN2 im Kleinhirn von Erwachsenen den dynamischen Vesikel-Verkehr von synaptischen Proteinen und damit auch die synaptische Plastizität zu regulieren scheint (Behesti et al. 2018).

4.2.3 Antikörper-Interaktion mit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase ERBB3

Das Protein ERBB3 ist Teil der Protein-Klasse der *Epithelial-Growth-Factor-Like*-Proteinen und fungiert als Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Der Ligand NRG1 führt zu einer Aktivierung von ERBB3, was zu einer Hetero-Dimerisierung mit anderen ERBB-Klasse-Proteinen führt. Die Hetero-Dimerisierung ist ein entscheidender Faktor des Aktivierungs-Weges, da ERBB3 keine phosphorylierende Aktivität aufweist. Eine Heterodimer abhängige Phosphorylierung vor allem durch ERBB2 führt über eine Aktivierung des PI3K/Akt- und des MAPK-Signal-Weges zur Weitergabe Zell-proliferativer Signale (Steinkamp et al. 2014). Durch diese Signalwege ist ERBB3 an der Proliferation und Differenzierung von kardiomuskulärem, epithelalem und neuronalem Gewebe beteiligt (Meyer und Birchmeier 1995; Bueter et al. 2006; Mei und Nave 2014; Fock et al. 2015). Mit den von uns durchgeführten Experimenten, wollten wir eine mögliche Auswirkung einer *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-Behandlung auf die Proliferation in Neuronen untersuchen, um so einen Zusammenhang mit einer gestörten zentral nervösen Entwicklung zu untersuchen. Eine spezifische Interaktion des Antiserums gegen *Borrelia burgdorferi* mit dem fötalen Protein ERBB3 konnten wir erstmalig mittels *bEXselect*-Multiprotein-Array aufdecken (siehe Abbildung 6). Mittels Western-Blot und 2D-Gelelektrophorese konnten wir eine spezifische Interaktion des Antikörpers gegen *Borrelia*

burgdorferi mit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase ERBB3 bestätigen (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).

4.2.3.1 Zell-Proliferations-Tests und ERBB3-Phosphorylierungs-Assay mit SH-SY5Y- und T-47D-Zellen

Funktionell konnten wir mit der Bestimmung der Expression von Ki-67 als eines Zell-Proliferations-Markers und der direkten Zählung von Mitose-Figuren ebenfalls zeigen, dass eine Behandlung mit *Borrelia burgdorferi*-Antikörper zu einer signifikanten Abnahme der Zell-Proliferation in SH-SY5Y- nicht aber in T-47D-Zellen führt. Die mit *Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelten SH-SY5Y-Zellen zeigten eine um 25 % signifikant reduzierte Expression des Zell-Proliferations-Markers Ki-67 (* $p < 0,05$) (siehe Abbildung 24). Auch wiesen mit *Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelte SH-SY5Y-Zellen eine im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle eine um 33 % geringere Rate an Mitose-Figuren auf (** $p < 0,01$) (siehe Abbildung 25). Eine Kontrolle mit spezifischem ERBB3-Antikörper, um den proliferations-hemmenden Effekt mit dem Protein ERBB3 zu bestätigen, konnte aufgrund technischer Limitationen nicht umgesetzt werden.

Ein anderer Effekt, der die Zell-Proliferation beeinflussen kann, wäre eine Minderung des Energie-Levels der Zellen. Der von uns durchgeführte MTT-Test zeigte jedoch keinen solchen Effekt für den *Borrelia burgdorferi*-Antikörper in SH-SY5Y- und T-47D-Zellen aus, da keine signifikante Reduktion des mitochondrialen Energie-Levels gemessen werden konnte ($p > 0,05$) (siehe Abbildung 19). Unter der Annahme, dass die Ergebnisse der Zell-Proliferations-Tests sich durch eine Inhibition der Rezeptor-Liganden-Interaktion erklären lassen, so hätte man erwarten können, dass im ERBB3-Phosphorylierungs-Assay ein ähnliches Ergebnis resultiert. Jedoch konnte mit den von uns verwendeten Methoden kein direkter Zusammenhang einer *Borrelia burgdorferi*-Antikörper Behandlung von SH-SY5Y und T-47D-Zellen und einer zur Aktivierung nachgeschalteter Signal-Wege benötigten Phosphorylierung der Tyrosin-Domäne des Proteins ERBB3 nachgewiesen werden. Es konnte keine signifikant geänderte Signalstärke der Phosphorylierung des Proteins ERBB3 in mit *Borrelia burgdorferi*-Antikörper behandelten T-47D-Zellen festgestellt werden, wie es die zuvor durchgeführten Tests zur Zell-Proliferation ebenfalls haben vermuten lassen (siehe Abbildung 26). Verschiedene Gründe könnten den fehlenden Effekt einer *Borrelia burgdorferi*-Antikörper Behandlung in T-47D-Zellen erklären. Zum einen könnten verschiedene Protein-Modifikation in der Brustkrebs-Zell-Linie T-47D zu einer reduzierten Affinität der Antikörper für das Protein ERBB3 führen, eine Interaktion würde unter diesem Umstand nicht in einer Blockierung der Rezeptor-Funktion resultieren. Ein weiterer Grund könnte trotz Inhibition des Antikörpers der Rezeptor-Domäne des Proteins ERBB3 eine nicht auszuschließende Hetero-Dimerisierung von ERBB3 mit über NRG-1 aktiviertem ERBB4 sein, welche ebenfalls einer Phosphorylierung der ERBB3-Kinase-Domäne bewirken kann (Wandinger et al. 2016). Obwohl die Ergebnisse der Proliferations-Tests mit SH-SY5Y-Zellen vielversprechend waren, konnte eine spezifische Beeinflussung des Proteins ERBB3 durch den *Borrelia burgdorferi*-

Antikörper insofern nicht nachgewiesen werden, als in dieser Zell-Linie kein Phosphorylierungs-Signal von auswertbarer Stärke gemessen werden konnte (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27). Dies kann zum einen ähnliche Gründe wie im Zusammenhang mit der Zell-Linie T-47D haben. Zugleich könnte die methodische Sensitivität durch eine unterschiedliche Affinität des von uns verwendeten pERBB3-Antikörpers an verschiedenen Zell-Linien gemindert sein. Während die Zell-Linie T47-D in dem von uns durchgeführten ERBB3-Phosphorylierungs-Assay ein zuverlässig starkes Signal liefert, konnte unabhängig von der verwendeten Protein-Menge kein Signal mit dem pERBB3-Antikörper bei SH-SY5Y-Zellen gemessen werden. Eine andere Erklärung wäre eine fehlende Expression von ERBB3 in SH-SY5Y-Zellen. Dagegen spricht, dass wir mittels Western Blot und 2D-Gelelektrophorese ein detektierbares Signal im Lysat dieser Zell-Linie nachweisen konnten. Quellen belegen ebenfalls die regelmäßige Expression des Proteins ERBB3 in der Zell-Linie SH-SY5Y in messbaren Konzentrationen (Ho et al. 2005).

4.2.3.2 *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0*

Wir konnten mit den *in silico*-Methoden *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0* zur Epitop-Kartierung einige Aminosäure-Sequenzen im humanen Protein ERBB3 ermitteln, welche in ihrer Sequenz und Epitop-Wahrscheinlichkeiten am ehesten mit dem membranständigen *Erp family outer-surface*-Lipoprotein des Bakteriums *Borrelia burgdorferi* übereinstimmen. Diese Übereinstimmung könnte erklären, wie es zu einer Auto-Reaktion der *Borrelia burgdorferi*-Antikörper gegen das Protein ERBB3 kommt. Interessanterweise konnte bereits im Tierversuch mit Mäusen nachgewiesen werden, dass eine Immunantwort gegen den Erreger *Borrelia burgdorferi* unter anderem durch eine starke IgG-Antikörper-Sekretion mit einer spezifischen Affinität für das *Erp family outer-surface*-Lipoprotein vermittelt wird (Brisette et al. 2008). Aus dieser Untersuchung ergibt sich die Vermutung, dass Antikörper vom Typ IgG, welche gegen ein Epitop auf dem *Erp family outer-surface*-Lipoprotein gerichtet sind, auto-reaktiv mit der extrazellulär gelegenen ERBB3-Rezeptor-Domäne interagieren und damit sterisch die Bindung des ERBB3-Liganden NRG-1 inhibieren könnten.

Zusammenfassend konnten wir keinen direkten Nachweis erbringen, dass der gegen *Borrelia burgdorferi* gerichtete Antikörper die Aktivität der Rezeptor-Tyrosin-Kinase ERBB3 beeinflusst, jedoch konnten wir zeigen, dass der Antikörper in der Lage ist das Protein zu binden. Eine durchgeführte *in silico*-Epitop-Kartierung konnte eine mögliche Bindungsstelle an der extrazellulären Rezeptor-Domäne von ERBB3 aufdecken, was die Vermutung nahelegt, dass eine Interaktion des *Borrelia burgdorferi*-Antikörpers tatsächlich in der Lage sein könnte, eine Liganden-Bindung von NRG-1 an ERBB3 zu inhibieren. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass eine *Borrelia burgdorferi*-Antikörper-Behandlung in neuronalen SH-SY5Y-Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Zell-Proliferation führt. Während es bisher sehr wenige Erkenntnisse zur Beteiligung des Proteins ERBB3 an der Hirn-Entwicklung und Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen gibt, ist die neuronale Proliferation und Differenzierung

aller im zentralen Nervensystem beteiligten Geweben ein fundamental bedeutender Vorgang, wobei eine Beeinflussung zu verschiedensten Störungen der fötalen Hirn-Entwicklung führen kann und damit an der Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen wie Autismus, Epilepsie, Schizophrenie oder zerebraler Malformationen beteiligt sein könnte (Guerini und Dobyns 2014; Selemon und Zecevic 2015; Pirozzi et al. 2018).

4.3 Interaktion der Antikörper mit intrazellulären Antigenen

Neben den membranständigen Proteinen können auch intrazelluläre synaptische Proteine Ziel einer Immunantwort im Rahmen einer Enzephalitis sein. Auto-Antikörper gegen intrazelluläre Antigene werden häufig bei Menschen nachgewiesen, die an einem klassischen paraneoplastischen Syndrom leiden. Intrazellulär gelegene Proteine wie CPLX2 oder SYT5 sind für Antikörper schwer zu erreichen. Wie könnten Antikörper und Immun-Zellen dennoch in Kontakt mit diesen Antigenen kommen? Dazu kommen verschiedene Mechanismen infrage, welche im Folgenden diskutiert werden

4.3.1 Interaktionen mit intrazellulären synaptischen Proteinen

Aus der Gruppe intrazellulärer Antigene gibt es eine besondere Gruppe von Proteinen, die synaptischen Proteine. Diese Proteine sind u.a. an der exozytotischen Entleerung synaptischer Vesikel im Zuge der Neurotransmitter-Freisetzung beteiligt sowie an der anschließenden endozytotischen Wiederaufnahme dieser Vesikel als Vorbereitung auf eine erneute Ausschleusung. Die Beteiligung an diesen Vorgängen und die dafür benötigte Lokalisierung an synaptischen Membranen kann als mögliche Erklärung genutzt werden, wie Antikörper in direkten Kontakt mit diesen Proteinen kommen könnten. Die intrazellulären synaptischen Proteine Amphiphysin und GAD65 stellen Ziel-Antigene für Antikörper im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms dar. Eine Antikörper-Interaktion mit diesen Proteinen kann zu typischen neurologischen Syndromen wie dem Stiff-Person-Syndrom oder der zerebellären Ataxie führen (Pittock et al. 2005; Ariño et al. 2014). Antikörper gegen das Antigen Amphiphysin können zudem bei Menschen die an einem kleinzelligen Bronchial-Karzinom leiden zu einer limbischen Enzephalitis führen (Tanaka et al. 2020). Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass diese Proteine durch Endo- und Exozytose für kurze Zeit an der extrazellulären Zell-Oberfläche exponiert und somit für Antikörper zugänglich sind. Dieser Mechanismus der vorübergehenden Oberflächen-Exposition trägt den Namen *Transient Moonlighting* und wurde bereits am Beispiel des Proteins Amphiphysin untersucht (Irani 2016; Werner et al. 2016). Bei den Proteinen CPLX2 und SYT5 handelt es sich ebenfalls um synaptische Proteine, die an Exo- und Endozytose-Vorgängen beteiligt sind. Ein solcher *Transient Moonlighting*-Mechanismus könnte daher eine mögliche Erklärung sein, wie Auto-Antikörper mit diesen intrazellulären synaptischen Proteinen interagieren könnten. Bisher gibt es jedoch keine experimentellen Studien zu einem *Transient Moonlighting*-Effekt bei den Proteinen CPLX2 und SYT5.

4.3.2 Nicht-spezifische intrazelluläre Aufnahme von IgG-Antikörpern

Wie aber könnten Antikörper ihre intrazellulären Ziel-Antigene erreichen, sollten diese auch keine transiente Zell-Oberflächen Exposition aufweisen? Hinweise aus der Literatur auf eine intrazelluläre Antikörper-Aufnahme in zerebellären Purkinje-Zellen lässt einen gewissen Aufschluss darüber zu. Zerebelläre Purkinje-Zellen sind oft Ziel einer Auto-Antikörper-Reaktion im Rahmen eines paraneoplastischen Syndroms. Ein häufiges Ziel-Antigen ist das intrazelluläre nicht-synaptische Yo-Antigen und führt im Rahmen des Anti-Yo-Syndroms zur zerebellären Degeneration. Eine *in vitro*-Untersuchung an Purkinje-Zellen von Ratten konnten zeigen, dass diese Antikörper nicht über einen Oberflächen-vermittelten Mechanismus wirken, sondern von Purkinje-Zellen aufgenommen werden, und so in der Zelle direkt mit dem Yo-Antigen interagieren können. Dies führt letztlich trotz Abwesenheit zytotoxischer T-Zellen und Makrophagen zum Zell-Untergang der Purkinje-Zellen (Hill et al. 2009; Greenlee et al. 2015).

4.3.3 Zellulär vermittelte Zytotoxizität

Immunzellen sind im adulten wie auch im fötalen zentralen Nervensystem anzutreffen. Schon im fötalen Hirn-Parenchym lassen sich CD_4^+ T-Zellen, CD_8^+ T-Zellen, B-Zellen und reichlich Mikroglia-Zellen finden. Diese Immun-Zellen unterstützen nicht nur das normale Hirn-Wachstum in Bezug auf Vaskularisation sowie Proliferation und Migration von Neuronen und myelinisierenden Glia-Zellen, sondern sind auch bei Infektionen oder Auto-Immun-Reaktionen an der Ausbildung einer Entzündungs-Reaktion beteiligt (Morimoto und Nakajima 2019). Einige Viren sowie Bakterien und Parasiten wie *Borrelia burgdorferi* und *Toxoplasma gondii* versuchen sich dem Zugriff des Immunsystems zu entziehen, indem sie in Zellen eindringen und sich so vor einer direkten humoralen oder zellulären Immunantwort schützen. Gegen eine solche Strategie exprimieren alle kernhaltigen Zellen ein Peptid-Präsentations-Protein, den *Major-Histo-Compatibility complex-1* (MHC-1). Die MHC-1 Proteine präsentieren an der Zell-Oberfläche ein genaues Abbild der intrazellulär synthetisierten Proteine in Form von Peptid-Fragmenten. Dadurch können entartete oder infizierte Zellen von Immun-Zellen, wie den zytotoxischen CD_8^+ T-Zellen erkannt und eine Apoptose eingeleitet werden, die zum Zell-Tod führt. Antigene auf Zell-Trümmern im Extrazellulär-Raum, welche als fremd erkannt werden, können von Mikroglia-Zellen phagozytiert und von einem weiteren Vertreter der Peptid-Präsentations-Proteine gebunden werden, dem *Major-Histo-Compatibility Complex-2* (MHC-2). Das vom MHC-2 präsentierte Antigen kann von CD_4^+ T-Zellen erkannt werden und so eine Entzündungs-Reaktion gegen dieses Antigen eingeleitet werden. Eine Antigen-Erkennung auf MHC-1/2 kann somit zu einer weiteren Infiltration von Immun-Zellen wie T_H17 -Zellen und Granulozyten sowie zu einer Zytokin-Ausschüttung führen, wodurch eine Neuro-Inflammation ausgelöst wird. Durch diese bekannten Mechanismen können auch intrazellulär gelegene Proteine Auto-Immun-Reaktionen auslösen, welche mit einer erheblichen Schädigung derjenigen Zell-Populationen einhergehen, welche das entsprechende Antigen exprimieren.

4.3.4 Antikörper-Interaktion mit dem synaptischen Protein SYT5

Die Freisetzung von Neurotransmittern in neuronalen Netzwerken stellt den grundlegenden Mechanismus zur synaptischen Zell-Zell-Kommunikation im zentralen wie auch im peripheren Nervensystem dar. Diese exozytotische Ausschüttung von Neurotransmittern wird unter anderem durch die SNARE-Proteine vermittelt. Der Ablauf der SNARE-Protein gestützten Verschmelzung von Neurotransmitter-haltigen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran ist dabei abhängig von einem ausreichenden Kalzium-Einstrom und dessen Bindung an eine Gruppe Kalzium detektierender Proteine, den sog. Synaptotagminen (Saegusa et al. 2002). Die Lokalisierung dieser Proteine als transmembrane Bestandteile synaptischer Vesikel ermöglicht ihre Beteiligung an einem *Transient Moonlighting*-Mechanismus im Zuge der Bindung von Antikörpern infolge einer antibakteriellen Immunantwort. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine solche Interaktion von SYT5 mit Antikörpern in Antiseren gegen *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori* die mit dem *bEXselect*-Multiprotein-Array nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8). Auch Western-Blots und 2D-Gelelektrophoresen konnten diese Interaktionen bestätigen (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).

4.3.4.1 FM1-43-Vesikel-Umsatz-Assay und Fluo-3-AM-Calcium-Imaging

Unter der Annahme, dass eine Interaktion der Antiseren mit dem Protein SYT5 eine Auswirkung auf die Exozytose-Leistung und die synaptische Aktivität von neuronalen Zellen haben sollte, wurden anhand des FM1-43-Vesikel-Umsatz-Assay und dem Fluo-3-AM-Calcium-Imaging diese Parameter an der humanen Neuroblastom-Zell-Linie SiMa untersucht. Die Ergebnisse des FM1-43-Vesikel-Umsatz-Assays zeigen eine Reduktion des Vesikel-Umsatzes von 9,8 % in mit *Campylobacter jejuni*-Antiserum behandelten SiMa-Zellen und von 11 % in mit *Helicobacter pylori*-Antiserum behandelte SiMa-Zellen (**p < 0,01) (siehe Abbildung 14). Die Resultate des Fluo-3-AM-Calcium-Imaging zeigen eine signifikante Reduktion der intrazelluläre Kalzium-Verfügbarkeit von 26 % in mit *Campylobacter jejuni*-Antiserum behandelten SiMa-Zellen und von 18 % in mit *Helicobacter pylori*-Antiserum behandelten SiMa-Zellen (**p < 0,01) (siehe Abbildung 16). Diese Beobachtung kann im Kontext der verwendeten Methode verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte ein *Transient Moonlighting*-Effekt zu einer vorübergehenden Freilegung des Proteins SYT5 an der Zell-Oberfläche und damit zu einer direkten Interaktion mit den Antiseren führen. Eine Interaktion mit SYT5 könnte in diesem Zusammenhang eine Hemmung des exo- und endozytotischen Vesikel-Umsatzes bewirken, ein Effekt, den wir anhand des FM1-43-Vesikel-Umsatz-Assays bereits messen konnten. Interessanterweise konnten wir in mit *Campylobacter jejuni*- und *Helicobacter pylori*-Antiserum behandelten SiMa-Zellen mit dem Fluo-3-AM-Calcium-Imaging eine verringerte intrazelluläre Kalzium-Konzentration messen. Zwar kann eine Minderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration auch aus Interaktionen der Antiseren mit anderen Proteinen an der Zell-Oberfläche resultieren, da jedoch der gleiche Effekt auch in mit SYT5-Antikörper behandelten SiMa-Zellen auftritt, scheint sehr wahrscheinlich ein spezifischer das SYT5-Protein betreffender Mechanismus vorzuliegen.

Zwar ist die Rolle von SYT5 an der Genese der Schizophrenie oder anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen bisher wenig erforscht; Hinweise auf eine mögliche Beteiligung am Krankheits-Geschehen konnten jedoch einige Studien zeigen. So konnte ein Zusammenhang einer geminderten SYT5-Expression und Schizophrenie unter anderem in einer *post mortem*-Gen-Expressions-Studie gefunden werden (Maycox et al. 2009). Eine anti-psychotische Therapie im Rahmen einer schizophrenen Erkrankung scheint ebenfalls einen Effekt auf die Expression von SYT5 im präfrontalen Kortex in Ratten zu haben (Kontkanen et al. 2002). Zudem scheint nicht nur SYT5 als Vertreter der Synaptotagmine eine Rolle in der Genese neuropsychiatrischer Erkrankungen zu spielen, sondern auch SYT11 konnte als ein an der Entstehung von Schizophrenie beteiligtes Protein identifiziert werden (Yan et al. 2020).

4.3.5 Antikörper-Interaktion mit dem synaptischen Protein CPLX2

Das Protein CPLX2 ist ebenso wie SYT5 an synaptischen Prozessen wie der Exozytose beteiligt. Eine CPLX2 regulierte Exozytose, welche zu einer gesteigerten Vesikel-Freisetzung führt, wurde in vielen Exozytose betreibenden Zellen nachgewiesen, darunter auch Neuronen und Mast-Zellen (Tadokoro et al. 2005; Zhou et al. 2017). Funktionell reguliert CPLX2 eine zur Exozytose benötigte SNARE-Protein-Komplexierung und fördert damit eine synchronisierte Freisetzung von Vesikeln nach einer Stimulation (Ramakrishnan et al. 2020). Ein verändertes zentral nervöses Expressions- und Aktivitätsmuster von CPLX2 wurde im Zusammenhang mit verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen gefunden. So u.a. bei der Alzheimer-Demenz, der Chorea-Huntington, bei bipolarer affektive Störung und bei der Schizophrenie (Begemann et al. 2010). Die vorliegende Arbeit zeigt nun erstmalig anhand des *bEXselect*-Multiprotein-Arrays, dass ein Antiserum gegen *Toxoplasma gondii* mit dem synaptischen Protein CPLX2 interagiert (siehe Abbildung 9), eine Interaktion die auch mittels Western-Blot und 2D-Gelelektrophorese bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 10 und Abbildung 11).

4.3.5.1 Einfluss des *Toxoplasma gondii*-Antikörpers auf Mast-Zell-Degranulation und neuronalen Vesikel-Umsatz

Für die Untersuchung der funktionellen Konsequenzen einer Interaktion eines Antiserums gegen *Toxoplasma gondii* mit CPLX2 wurden RBL-2H3-Zellen als Exozytose-Modell ausgewählt. Diese Zellen entstammen einer basophilen Ratten-Leukämie-Zell-Linie, und zeigen ebenso wie Neuronen eine durch den SNARE-Komplex vermittelte und CPLX2-anhängige Exozytose. Zudem weisen sie viele Charakteristiken menschlicher Mast-Zellen auf (Passante und Frankish 2009). Neben der zentralen Bedeutung der Mast-Zellen in der Entstehung von Typ-1-Allergien, ist eine Mast-Zell-Aktivierung unter anderem auch Bestandteil der immunologischen Reaktion auf eine Infektion mit Protozoen wie *Toxoplasma gondii* (Lu und Huang 2017). Doch welche Auswirkung hat eine *Toxoplasma gondii*-Infektion auf Mast-Zellen? *In vitro*-Studien zeigen, dass bis zu 70 % infektiöser *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten bei Mast-Zell-Kontakt untergehen, wenn sie zuvor durch IgG-Immunglobuline opsoniert wurden.

Ohne IgG-Opsonierung konnte keine effiziente Immunantwort der Mast-Zellen auf *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten beobachtet werden (Jouliia et al. 2015). Auch konnte gezeigt werden, dass *Toxoplasma gondii* in der Lage ist, die Immunantwort bewirkende Mast-Zell-Degranulation um bis zu 50 % zu reduzieren, indem sie die Kalzium-Mobilisierung bei intrazellulärer Mast-Zell-Infektion mindern. Auch nicht intrazellulär-infizierte Mast-Zellen werden in ihrer Aktivität beeinflusst, eine Adhäsion der *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten an der Mast-Zell-Oberfläche reicht aus, um die Degranulations-Leistung um 32 % zu reduzieren (Smith et al. 2013).

Mit unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass IgG-Immunglobuline gegen *Toxoplasma gondii* ohne Anwesenheit des Erregers ebenfalls zu einer reduzierten Mast-Zell-Degranulation führen. Dabei wurde untersucht, ob dieser Effekt mit einer spezifischen Interaktion der Antikörper mit dem Protein CPLX2 zusammenhängen könnte. Die photometrisch bestimmte Degranulations-Leistung der RBL-2H3-Zellen nahm um 25 % (**p < 0,01) unter vorheriger *Toxoplasma gondii*-Antikörper- als auch unter CPLX2-Antikörper-Behandlung um 20 % (*p < 0,05) signifikant ab, andere Antikörper vom Typ IgG zeigten keinen solchen Effekt (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). Die Beobachtung, dass der *Toxoplasma gondii*-Antikörper einen möglichen inhibierenden Effekt auf die Degranulations-Leistung von stimulierten RBL-2H3-Zellen haben könnte, wurde durch Bestimmung des Kern-Zytoplasma-Verhältnisses Toluidin-Blau gefärbter Zellen bestätigt, da die mit *Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ein um 36 % größeres zytoplasmatisches Volumen nach einer Stimulation mit *Compound 48/80* aufwiesen und dieses Volumen mit der relativen Menge intrazellulär verbleibender Granula korreliert (***p < 0,001) (siehe Abbildung 22). Eine auf Stimulation mit *Compound 48/80* folgende CPLX2-Translokation mit einhergehender fluoreszenz-mikroskopischer Intensitätszunahme an der Zell-Membran der RBL-2H3-Zellen sowie einer typischen Änderung der Zell-Morphologie welche zuvor bereits beschrieben wurde, blieb bei mit *Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelten RBL-2H3-Zellen allerdings aus (Tadokoro et al. 2005). Mit *Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelte RBL-2H3-Zellen zeigten eine im Vergleich zur nicht-behandelten Kontrolle um 50 % niedrigere CPLX2-Intensität (***p < 0,0001) (siehe Abbildung 23). Ein durchgeführter MTT-Test zur Bestimmung des Energie-Haushaltes und der Zell-Vitalität zeigt, dass RBL-2H3-Zellen eine um 8 % und SH-SY5Y-Zellen eine um 9 % reduzierte mitochondriale Aktivität aufweisen, sofern sie zuvor mit *Toxoplasma gondii*-Antikörper behandelt wurden (**p < 0,01) (siehe Abbildung 19). Dieser Effekt kann ebenfalls zu einer geringeren Exozytose-Leistung führen, wobei jedoch erwähnt werden muss, dass behandelte SH-SY5Y-Zellen keine signifikante Änderung der Exozytose-Leistung im FM1-43-Test trotz gemindertem Energie-Level zeigten. Diese Abweichung könnten unter anderem neben einer methodischen Divergenz zwischen dem verwendeten β -Hexosaminidase-Degranulations-Test mit RBL-2H3-Zellen und FM-1-43-Vesikel-Umsatz-Test mit SH-SY5Y-Zellen, auch durch den Umstand hervorgerufen werden, dass es bei allen Übereinstimmungen auch einige Unterschiede zwischen Mast-Zell-Degranulation und neuronaler Exozytose gibt. Im Gegensatz zur neuronalen

Exozytose, bei der jeder Vesikel selbstständig mit der Plasmamembran wechselwirkt, können Mast-Zell-Granula zu komplexen Oberflächen-Kanälen fusionieren, um dadurch die sogenannte *Compound*-Exozytose effizienter ablaufen zu lassen (Lorentz et al. 2012).

Wir konnten zwar keine direkte Beeinflussung des Proteins CPLX2 in neuronalen Zell-Linien beobachten, dennoch scheint der *Toxoplasma gondii*-Antikörper einen Einfluss auf den Energie-Level neuronaler SH-SY5Y-Zellen zu haben. Dieser Effekt könnte in der Tat dazu beitragen, die zentral nervöse Entwicklung zu stören, so stellt die Bereitstellung von Energie in Form von ATP einen zentralen Aspekt der Verknüpfung neuronaler Netzwerke dar (Vergara et al. 2019). Aufgrund des im Vergleich zu anderen Geweben sehr hohen Energie-Verbrauchs von Neuronen, reagieren diese Zellen sensibler auf Schwankungen des Zell-Metabolismus (Ames 2000). Darüber hinaus konnte eine spezifische Beeinflussung von CPLX2 in RBL-2H3-Zellen durch den *Toxoplasma gondii*-Antikörper gezeigt werden. Dies ist von immunologischer Relevanz, da *Toxoplasma gondii* auch eine immunmodulatorische Wirkung in Bezug auf Allergien besitzt. Mit *Toxoplasma gondii* infizierte Mäuse zeigen eine geringere Allergen-spezifische T-Zell-Proliferation sowie eine geringere IgE-Immunglobulin-Synthese (Fenoy et al. 2009; Fenoy et al. 2015). Eine zusätzliche Beeinflussung von Mast-Zellen durch *Toxoplasma gondii* spezifische IgG-Immunglobuline könnte damit einen synergistischen Effekt auf diese Immunmodulation bei einer Infektion besitzen. Eine weitere Erforschung dieses Effektes könnte dazu beitragen, die immunmodulatorische Komponente einer *Toxoplasma gondii*-Infektion und die Rolle der Mast-Zellen bei der Erreger-Abwehr besser zu verstehen.

4.4 Die Rolle des Proteins SSPO in der Genese des Hydrozephalus

Ein Hydrozephalus bei Neugeborenen stellt eine schwerwiegende und bis heute in ihrer Genese nicht genau geklärte Komplikation bei einer kongenitalen *Toxoplasma gondii*-Infektion dar. Häufig führt eine Obstruktion des *Aquaeductus mesencephali* zur Stauung des Liquors, es können aber auch weitere Kompartimente des Ventrikel-Systems betroffen sein wie die *Foramina interventricularia* (Hutson et al. 2015). Der genaue Mechanismus dieser Obstruktion ist bislang jedoch nicht wirklich verstanden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern nun einen ersten Hinweis auf einen möglichen immunologischen Zusammenhang zwischen der Entstehung eines Neugeborenen-Hydrozephalus und maternal-übertragenen *Toxoplasma gondii*-Antikörpern. So konnte eine Bindung des *Toxoplasma gondii*-Antikörpers an das Protein SSPO mehrfach auf dem *bEXselect*-Multiprotein-Array nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9). Leider konnten im Zuge der vorliegenden Arbeit zu diesem Zusammenhang keine weiterführenden Experimente durchgeführt werden, da nach derzeitigem Stand auf dem freien Markt weder polyklonale Antikörper gegen SSPO, noch entsprechende rekombinante Proteine oder Überexpressions-Lysate zur Verfügung stehen, mittels derer eine solche Interaktion eingehender erforscht werden könnte.

Doch welche Bedeutung könnte eine Interaktion zwischen dem *Toxoplasma gondii*-Antikörper und dem SSPO-Protein in der Genese des Hydrozephalus bei Neugeborenen theoretisch haben? SSPO oder auch SCO-Spondin ist ein vom im dritten Ventrikel gelegenen Subcommissural-Organ in das Liquor-System sezerniertes Protein. Im Liquor interagieren SSPO-Proteine untereinander und bilden einen Hauptbestandteil der sog. Reissner-Faser. Die Reissner-Faser durchzieht ausgehend vom Subcommissural-Organ, den *Aquaeductus mesencephali*, den vierten Ventrikel und den *Canalis centralis* (Muñoz et al. 2019). Eine zentrale Aufgabe der Reissner-Faser ist dabei unter anderem die Erhaltung der Integrität des Neural-Rohres. Experimente mit verschiedenen Wirbeltieren zeigen tatsächlich, dass eine gestörte Ausbildung des SSPO-Reissner-Faser-Komplexes zu einer Obliteration des *Aquaeductus mesencephali* führt. Die Folge eines solchen obstruierten *Aquaeductus mesencephali* ist ein eingeschränkter Liquor-Abfluss und ein dadurch hervorgerufener obstruktiver Hydrozephalus (Aboitiz und Montiel 2021). Eine solche Störung der Reissner-Faser-Ausbildung könnte auch durch maternal produzierte und transplazentar auf Föten übertragene Antikörper vom Typ IgG zustande kommen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Ratten-Föten einen obstruktiven Hydrozephalus entwickeln, sofern die Mutter-Tiere zuvor gegen ein Reissner-Faser-Glykoprotein immunisiert wurden. Die IgG-Antikörper verhinderten eine Zusammenlagerung der Reissner-Faser-Proteine, was in der Folge zu einer Obliteration des *Aquaeductus mesencephali* führte (Vio et al. 2000). Dieser Mechanismus bietet damit die Möglichkeit eine Hypothese zur Entstehung eines Neugeborenen-Hydrozephalus bei Kindern von *Toxoplasma gondii* infizierten Müttern zu formulieren. Die mit dem SSPO-Protein kreuz-reagierenden *Toxoplasma gondii*-Antikörper könnten im fötalen Liquor die Assemblierung der SSPO-Proteine zur Reissner-Faser blockieren und über eine folgende Obliteration des *Aquaeductus mesencephali* zu einem Neugeborenen-Hydrozephalus führen.

4.5 Effekte einer maternalen Immunantwort auf die fötale Neurogenese und deren Auswirkungen auf die psychische Vulnerabilität

Im Folgenden Abschnitt wird die komplexe Antikörper-gestützte Immun-Antwort näher beleuchtet, welche durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften einen Einfluss auf einen Fötus haben kann. Auch wird der Frage nachgegangen, inwiefern eine mögliche schädigende Wirkung der maternal transferierten Antikörper auf den Fötus minimiert werden kann. Abschließend wird im Kontext der Gen-Umwelt-Interaktion bei psychischen Erkrankungen ein Erklärungs-Modell zur unterschiedlichen Manifestation von psychiatrischen Erkrankungen formuliert.

4.5.1 Immunantwort vermittelt durch komplexe Antikörper-Gemische

Während wir durch unsere Untersuchungen vor allem die Wirkung spezifischer Antikörper und Antiseren gerichtet gegen spezifische Erreger auf die Funktion einzelner Proteine oder

Zell-Mechanismen untersuchen konnten, muss erwähnt werden, dass dies nur modellhaft die physiologischen Verhältnisse im Menschen widerspiegeln kann. Im menschlichen Blutkreislauf findet sich ein komplexes Gemisch aus Antikörpern gegen Erreger, Allergene und zum Teil auch gegen kommensale Mikroorganismen, also jene Organismen, welche mit dem Menschen ein symbiotisches Verhältnis bilden (Beutgen et al. 2021). Es lassen sich ab der Geburt bis in das hohe Lebensalter auch sogenannte natürliche Antikörper finden, welche ohne vorherige Immunisierung des Organismus von B1-Lymphozyten sekretiert werden und damit eine schnelle und multispezifische Reaktion des adaptiven Immunsystems darstellen (Palma et al. 2018). Einige der in gesunden Individuen zirkulierenden Antikörper besitzen auto-reaktive Eigenschaften, die Existenz dieser Antikörper ist jedoch nicht obligat von pathologischer Natur, so scheinen diese Antikörper an verschiedenen physiologischen Aufgaben beteiligt zu sein (Berlin et al. 2007; Siloși et al. 2016). Dazu gehören unter anderem regulatorische Funktionen wie die Verhinderung einer überschießenden Immunreaktion (Zohar et al. 2006). Häufig ist ein Ansteigen der Konzentration von Auto-Antikörpern während akuter Infektionen zu beobachten, wobei angenommen wird, dass dieser Anstieg ganz wesentlich durch die sog. Molekulare Mimikry verursacht wird (Rivera-Correa und Rodriguez 2018). Zwar bietet die Produktion von potenziell auto-reaktiven Antikörpern immunologische Vorteile, wodurch sich ihr zahlreiches Vorkommen erklären lassen könnte, die potenziell pathologische Wirkung eben jener Antikörper kann jedoch auch auf Föten übertragen werden (Ciobanu et al. 2020). Aus diesen Erkenntnissen leitet sich ab, dass ein sehr breites Spektrum an IgG-Antikörpern mit potenziell auto-reaktiven Eigenschaften in die Blut-Zirkulation des Fötus gelangen kann. Es ist daher wahrscheinlich, dass nicht nur einzelne Interaktionen zwischen Antikörpern und spezifischen fötalen Proteinen stattfinden, sondern ein komplexes Muster an Interaktionen mit verschiedenen Antigenen entsteht, welches die Diversität der IgG-Immunglobuline mitsamt der auto-reaktiven Immunglobuline der Mutter widerspiegelt. Unterstützt wird diese These auch durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit insofern, als die durchgeführten Inkubationen des *bEXselect*-Multiprotein-Arrays ebenfalls je nach verwendetem Antiserum Erreger-spezifische komplexe Interaktions-Muster zeigten. Zudem wird sie auch dadurch untermauert, dass neuronale Auto-Immunerkrankungen nicht nur durch einzelne Interaktionen, sondern durch eine Vielzahl an Interaktionen von Auto-Antikörpern mit neuronalen Epitopen charakterisiert sind (Cojocaru et al. 2010).

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit können wir zwar einige wesentliche Aspekte der Interaktion von Antiseren gegen spezifische Erreger aufdecken, um ein möglichst genaues Bild der Interaktionen mit fötalen Proteinen und einer daraus resultierenden Beeinflussung zellulärer Funktionen zu erhalten, müsste die Gesamtheit der Wirkung des komplexen Immunglobulin-Gemisches auf fötales Gewebe untersucht werden.

4.5.2 Der maternale Nest-Schutz

Trotz der bestehenden Möglichkeit einer Übertragung von Antikörpern mit für den Fötus potentiell schädigenden Eigenschaften, stellt der transplazentare Transfer von IgG-Antikörpern im Rahmen des Nest-Schutzes grundsätzlich eine wichtige immunologische Funktion zum Schutz des Fötus dar! Aufgrund des sich noch in Entwicklung befindlichen Immunsystems des Fötus bzw. des Neugeborenen, muss die maternal „gespendete“ passive Immunität wesentliche Aufgaben zur Erreger-Abwehr übernehmen. Konnatal und perinatal erworbene Infektionen stellen bis heute weltweit eine ernsthafte Bedrohung für das Überleben von Embryonen und Föten dar. Virale oder bakterielle Infektionen sind bis in die heutige moderne Zeit weltweit zwischen 10 % in Ländern mit hohem Wohlstands-Grad und bis zu 50 % in Ländern mit niedrigerem Wohlstands-Grad für das Auftreten von Tot-Geburten verantwortlich (Goldenberg et al. 2010). Um eine letale Gefahr für das Kind abzuwenden und gleichzeitig potenziell schädigende Immunreaktionen zu verhindern oder zumindest zu verkürzen, ist eine wirkungsvolle und schnelle Erreger-Eradikation von entscheidender Bedeutung. Zum einen sollte bei während der Schwangerschaft bestehender Infektion eine zielgerichtete Therapie eingeleitet werden, diese kann zum einen supportiv oder durch antibiotische Verfahren geschehen. Ein weiterer wichtiger Aspekt von zentraler Bedeutung ist eine zielgerichtete und effiziente Immunantwort der Mutter. Diese kann vor einer bestehenden Schwangerschaft mittels Immunisierung optimiert werden. Eine Immunisierung kann entweder durch vorherigen Erreger-Kontakt und überstandener Infektion oder im Gegensatz dazu bei höchst-möglicher Sicherheit durch Impfungen erfolgen (Dudley et al. 2020). So konnte auch die These, dass Impfungen zu neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Autismus führen, unzweifelhaft widerlegt werden (Taylor et al. 2014). Eine Immunisierung führt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches bei einer erneuten Konfrontation des Organismus mit einem Erreger durch das Vorhandensein hoch Antigen-spezifischer B- und T-Zellen zu einer hoch-spezifischen und effektiven Immunantwort führt. Der immunologische Schutz besteht dabei für den Fötus als auch für mehrere Monate nach der Geburt für das Neugeborene.

Weiterhin muss erwähnt werden, dass nicht jede Infektion mit dem Potential kreuz-reagierende Antikörper oder Immun-Zellen zu erzeugen, tatsächlich auch während der Schwangerschaft zu einer ausgeprägten Auto-Immun-Reaktion führt. Das maternale Immunsystem ist nicht nur dafür verantwortlich, dass eine ausreichende Immunantwort gegen Erreger besteht, sondern auch, dass eine immunologische Toleranz gegenüber dem Fötus an sich besteht, da dieser nicht als körpereigen erkannt wird. Dafür ist eine feine Balance zwischen reaktiven Immun-Zellen wie den T_H17 -Zellen und regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) verantwortlich, welche sich während einer Schwangerschaft deutlich in Richtung der tolerierenden T_{Reg} -Zellen verschieben muss (Aluvihare et al. 2004; Osborne et al. 2019). Diese erhöhte Toleranz besteht dabei auch bei analog ablaufenden Auto-Immun-Prozessen, so zeigt sich unter anderem bei Schwangeren, dass sich Symptome von Auto-Immun-Erkrankungen wie

der multiplen Sklerose oder auch der rheumatoiden Arthritis verbessern und diese Erkrankungen eine geringere Aktivität aufweisen (Figueiredo und Schumacher 2016). Das Vorliegen von potenziell auto-reagierender Bestandteilen des Immunsystems muss daher während der Schwangerschaft nicht zwangsläufig zu einer schädigenden Wirkung am Fötus führen, vorausgesetzt, die tolerierende Wirkung des maternalen Immunsystems ist nicht gestört und wird aufrechterhalten.

4.5.3 Zerebrale Phänotypen und Gen-Expressionsmuster neuropsychiatrischer Erkrankungen

Wie können verschiedene Einwirkungen auf das menschliche Gehirn zu unterschiedlichen neuropsychiatrischen Erkrankungen führen? Neuropsychiatrische Erkrankungen manifestieren sich häufig in verschiedenen Hirn-Regionen mit individuellen Funktionen. So konnte mittels moderner Bildgebung gezeigt werden, dass Menschen, die an einer Schizophrenie leiden im Vergleich zu solchen mit einer bipolaren Störung eine signifikante Abnahme des Volumens präfrontaler, temporaler und occipitaler Hirnregionen aufweisen und zudem eine verringerte kortikale Dicke im anterioren und posterioren *Gyrus cinguli* sowie in Bereichen der *Insula* zeigen. Menschen mit einer bipolaren Störung zeigen dagegen eine ausgedehntere kortikale Reduktion im linken superioren und mittleren temporalen Kortex, im superior-frontalen und orbito-frontalen Kortex sowie im rechten parahippocampalen *Gyrus* (Madre et al. 2019). Diese phänotypischen Veränderungen der Erkrankungen korrelieren dabei auch mit genotypischen Abweichungen. So korrelieren strukturelle Änderungen aufgrund einer Abnahme grauer Substanz kortikaler, hippocampaler und zerebellärer Regionen bei Menschen mit einer Schizophrenie oder einer bipolaren Störung, unter anderem auch mit Polymorphismen des Gens *NRG1*, dem Liganden der ERBB3-Tyrosin-Kinase (Kurnianingsih et al. 2011).

Man könnte daraus die Hypothese formulieren, dass bekannte Risiko-Gene väterlicher- oder mütterlicherseits an den Nachwuchs weitergegeben werden, wobei maternal-pränatale Umwelt-Einflüsse Effekte auf die Expression jener Gene im Fötus und damit Auswirkungen auf die Aktivität dieser Gene in unterschiedlichen Hirn-Regionen haben könnte. Somit könnten unterschiedliche Hirn-Regionen wiederum vulnerabel für humorale oder zytotoxische Interaktionen vermittelt durch Antikörper, Zytokine und/oder Immun-Zellen folgend auf eine Immunantwort durch akute oder latente Infektionen sein. Dabei wäre die Ausprägung der einzelnen Faktoren entscheidend für die Penetranz der Vulnerabilität neuropsychiatrischer Erkrankungen wie der Schizophrenie oder den bipolaren Störungen. Während einige Schädigungen des ZNS direkt mit einer Beeinflussung der zentral nervösen Funktionalität wie kognitiven Defiziten, Demyelinisierungen oder zerebraler Paralyse einhergehen, treten neuropsychiatrische Erkrankungen nur auf, sobald im Verlauf ihres Lebens die Betroffenen zusätzlich zur erhöhten Vulnerabilität auch einem erhöhten Stress-Level durch Trigger-Faktoren und unzureichende *Coping*-Strategien zur Kompensierung ausgesetzt sind. Damit könnte im Rahmen des Vulnerabilitäts-Stress-*Coping*-Modells die Verzögerung einer Manifestation

der Erkrankungen erklärt werden. Zu klären wäre in diesem Zusammenhang auch die Frage ob Genmutationen auch zu einer veränderten Immun-Reaktivität bestimmter Proteine beitragen können und damit das Risiko für eine Auto-Immunreaktion erhöhen, was letztlich zu einer erhöhten Vulnerabilität betroffener Menschen führen könnte an einer mit dem betreffenden Protein assoziierten Störung zu erkranken.

4.6 Limitierung der verwendeten Methoden und Materialien

4.6.1 Methoden der Proteomik

Multi-Protein Arrays wie der von uns verwendete *bEXselect*-Multiprotein-Array oder auch die Methoden Western-Blot und 2D-Gelelektrophorese sind seit vielen Jahren anerkannte und zuverlässige wissenschaftliche Methoden der Proteomik und der Proteinanalyse mit methodenspezifischen qualitativen und quantitativen Vor- und Nachteilen. Während die Multiprotein-Array Methode einen hohen Verarbeitungssatz aufweist, ist die tatsächliche Spezifität der Interaktionen nicht von gleicher Qualität wie die der Verfahren Western-Blot und 2D-Gelelektrophorese. Daher wurden die Antikörper-Interaktionen der mit dem *bEXselect*-Multiprotein-Array identifizierten Proteine jeweils auch noch zusätzlich durch eine Western-Blot-Analyse und eine 2D-Gelelektrophorese untersucht. Obwohl sich viele der Ergebnisse des *bEXselect*-Multiprotein-Arrays durch Western-Blot und 2D-Gelelektrophorese reproduzieren lassen, wiesen einige Proteine bei Verwendung dieser Methoden keine Interaktionen mehr mit den von uns verwendeten Antikörpern auf. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die unterschiedliche Herstellung und Gewinnung der Proteine auf den *bEXselect*-Multiprotein-Arrays im Vergleich mit den für die Western-Blot-Analyse und die 2D-Gelelektrophorese verwendeten Zell-Lysaten. Zwar stammen die Sequenzen der Proteine auf dem *bEXselect*-Multiprotein-Array von einer cDNA-Bank, welcher ein humanes fötales Genom zugrunde liegt, die daraus gewonnenen Proteine werden jedoch auf einer PVDF-Membran durch ein *E.coli*-basiertes bakterielles *in-vitro*-Translations-System erzeugt. Die Ko- oder Posttranslationalen Modifizierungen der mit diesem bakteriellen System hergestellten Proteine können von daher erheblich von jener in eukaryotischen Zellen abweichen. Dies kann sich auch auf die Antikörper-Bindungsstärke und die Interaktions-Fähigkeit mit diesen Proteinen auswirken. Die verwendeten Zell-Lysate und Zell-Überexpressions-Lysate sind bis auf die Ratten-Zell-Linie RBL-2H3 humaner Herkunft, weisen aber insgesamt ein eukaryotisches Modifikations-Level auf. Eine Verwendung dieser Lysate liefert damit spezifischere Ergebnisse und dient als qualitative Bestätigung der identifizierten Antikörper-Protein-Interaktionen.

4.6.2 Ethische Fragestellungen

Die Experimente der vorliegenden Arbeit, wie z.B. die Untersuchungen mit dem *bEXselect*-Multiproteins-Array, oder auch die Untersuchungen mit diversen Antiseren und Zell-Lysaten

werfen neben der Frage nach der Verlässlichkeit der gewonnenen Ergebnisse, auch grundsätzliche ethische Fragestellungen auf. So wurden im Zuge der durchgeführten Experimente kommerziell erhältliche Antiseren und Blut-Bestandteile verwendet, die aus Säugetieren gewonnen wurden. Auch die Verwendung der *bEXselect*-Multiprotein-Arrays birgt ein ethisches Problem, da die den Gen-Daten zugrundeliegende cDNA-Bank aus Gewebe-Material gewonnen ist, welches von zwei im Rahmen der gesetzlich vorgegebenen Regelungen durchgeführten Schwangerschafts-Abbrüchen stammt. Wir haben uns in beiden Fällen für eine Verwendung dieser Materialien entschieden, da es bislang keine etablierten Alternativen gibt, um polyklonale Antikörper oder sonstige Blut-Bestandteile herzustellen. Auch gibt es bis heute keine andere Möglichkeit, ein möglichst genaues Abbild des Proteoms des fötalen Gehirns darzustellen. Die Verwendung dieser Materialien ist daher von unschätzbarem Wert nicht nur für diese Arbeit, sondern ganz allgemein für die internationale Forschungsgemeinschaft.

4.6.3 Die Bedeutung der Verwendung von nicht-menschlichen Antikörpern und *in vitro*-Experimenten

Neben den ethischen Fragestellungen, die sich bei der Verwendung von menschlichen und tierischen Zellen und Geweben eröffnen, ist auch die Frage, ob man Antiseren aus Kaninchen und *in vitro*-Experimente an Zell-Kulturen überhaupt als experimentelles Modell für die formulierte Fragestellung dieser Arbeit verwenden kann.

4.6.3.1 Immunglobuline des Kaninchens

Bei der Betrachtung einer Immunreaktion zwischen Art-fremden Immunglobulinen und Geweben muss berücksichtigt werden, dass sich die Affinität der Immunglobuline gegenüber ihren Ziel-Antigenen je nach Organismus unterscheiden kann. So zeigen monoklonale Kaninchen-Immunglobuline eine generell hohe Affinität gegenüber ihren Ziel-Antigenen und eine im Vergleich zu Maus-Immunglobulinen erhöhte Affinität gegen humane Antigene (Spieker-Polet et al. 1995). Dennoch bietet die Ähnlichkeit des Immunsystems des Kaninchens mit dem des Menschen insbesondere in Bezug auf die Immunantwort auf Infektionen eine gute Annäherung an die immunologischen Verhältnisse im Menschen und damit die besondere Möglichkeit, Kaninchen-Immunglobuline in experimentellen Modellen der Immunantwort zu verwenden (Esteves et al. 2018). Die Interaktion zwischen Antikörpern und den von uns identifizierten Proteinen des fötalen Gehirns müsste zur weiteren Absicherung der Ergebnisse jedoch noch mit Antikörpern gegen die untersuchten Erreger bestätigt werden, welche aus humanen Seren gewonnen worden sind.

4.6.3.2 *In vitro*-Experimente mit Zell-Kulturen

Die Verwendung von Zell-Kulturen anstelle von komplexen Geweben wie dem ZNS bietet sowohl Vor- als auch Nachteile. Während die hier verwendeten Neuroblastom-Zell-Linien SH-SY5Y und SiMa, welche aus Neoplasien nervösen Ursprungs stammen, eine Möglichkeit

bieten mit geringem experimentellem Aufwand reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, können damit nur annähernd die komplexen Verhältnisse während der Gehirnentwicklung *in vivo* dargestellt werden. Weder kann damit der Einfluss der Blut-Hirn-Schranke noch der Einfluss regulatorischer Mechanismen als fundamentale Bestandteile des Immunsystems untersucht werden. Zwar ist die Verwendung von *in vitro*-Experimenten unverzichtbar für die Erforschung zell-biologischer Mechanismen und kann auch bis zu einem gewissen Grad die Auswirkung von extrazellulären Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene darstellen; eine Bestätigung der physiologischen und pathologischen Bedeutung jener Mechanismen kann jedoch nur durch entsprechende *in vivo*-Experimente und letztlich anhand klinischer randomisierter Studien erreicht werden.

5 Zusammenfassung

Schizophrene Erkrankungen betreffen ca. 1 % der weltweiten Bevölkerung und gehen mit einer starken Einschränkung der psychischen und körperlichen Gesundheit einher. Bis heute ist, ähnlich wie bei vielen anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen keine eindeutige Genese bekannt, Hinweise lassen eine gestörte fötale Hirn-Entwicklung vermuten, welche die Vulnerabilität für schizophrene Erkrankungen erhöht. Epidemiologische und experimentelle Studien zeigen zudem, dass diese gestörte Hirn-Entwicklung eine auto-immunologische Grundlage hat. Dabei sind die maternal gebildeten und in das Blut des Fötus transferierten Antikörper vom Sub-Typ IgG von besonderer Relevanz. Eine unbalancierte maternale Immun-Toleranz und eine fragile fötale Blut-Hirn-Schranke können dazu führen, dass auto-reaktive IgG-Antikörper mit fötalem neuronalem Gewebe in Kontakt kommen. Ähneln fötale neuronale Proteine auf Grundlage der molekularen Mimikry strukturell oder sequenziell den Erreger-spezifischen Epitopen, kann es zu einer auto-reaktiven Interaktion und zur Störung der fötalen Hirn-Entwicklung kommen.

Die vorliegende Arbeit untersucht dafür Interaktionen Erreger-spezifischer Antikörper mit fötalen neuronalen Proteinen. Untersucht wurden die Antiseren gerichtet gegen *Borrelia burgdorferi*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* und *Toxoplasma gondii*. Zur Interaktions-Identifikation wurden *hEXselect*-Multiprotein-Arrays, welche in Form von 23.806 cDNA-Klonen ca. 10.000 Proteine des pränatalen fötalen ZNS im ersten Trimenon präsentieren. Durch die Inkubation der *hEXselect*-Multiprotein-Arrays mit den Erreger-spezifischen Antiseren konnten wir 31 Interaktions-Partner des *Borrelia burgdorferi*-Antiserum identifizieren, darunter die Rezeptor-Tyrosin-Kinase ERBB3, welche an Zell-proliferativen Prozessen beteiligt ist. Für das *Campylobacter jejuni*-Antiserum wurden 107 Interaktions-Partner identifiziert. Das synaptische Protein SYT5 konnte dabei als Interaktions-Partner von sowohl *Campylobacter jejuni* als auch *Helicobacter pylori*-Antiserum identifiziert werden. Das *Helicobacter pylori*-Antiserum wies Interaktionen mit 99 fötalen Proteinen auf, darunter konnte auch ASTN2 identifiziert werden, ein neuronales Oberflächen-Protein, welches an Wachstums-Prozessen von Dendriten beteiligt ist. 32 Interaktions-Partner konnten für das *Toxoplasma gondii*-Antiserum identifiziert werden, darunter das synaptische Protein CPLX2 und das neuronale Struktur-Protein SSPO. Die Interaktionen konnten für ASTN2, CPLX2, ERBB3 und SYT5 mittels Western Blot und 2D-Gelelektrophorese bestätigt werden.

Funktionelle Tests wurden mit der Mast-Zell-Linie RBL-2H3, den neuronalen Zell-Linien SiMa und SH-SY5Y sowie mit der Brust-Krebs-Zell-Linie T-47D durchgeführt. Bei mit *Helicobacter pylori*-Antiserum behandelten SiMa-Zellen konnten wir ein reduziertes Dendriten-Wachstum messen. Anhand des FM1-43- und des Fluo-3-AM-Assays konnten wir eine reduzierte Freisetzung von synaptischen Vesikeln in mit *Campylobacter jejuni*- und *Helicobacter pylori*-Antiserum behandelten SiMa-Zellen nachweisen. Mittels MTT-Assay konnten wir eine reduzierte mitochondriale Leistung in mit *Toxoplasma gondii*-Antiserum behandelten RBL-2H3- und SH-SY5Y-Zellen nachweisen. RBL-2H3-Zellen zeigten unter *Toxoplasma gondii*-

Antiserum Behandlung ein post-stimulatorisch verändertes Kern-Zytoplasma-Verhältnis und eine mittels β -Hexosaminidase-Degranulations-Test photometrisch bestimmte verminderte Exozytose-Leistung sowie eine veränderte intrazelluläre CPLX2-Fluoreszenz-Intensität. In mit *Borrelia burgdorferi*-Antiserum behandelten SH-SY5Y-Zellen konnte sowohl mittels KI-67-Assay als auch mittels Mitose-Figuren-Rate eine verminderte Zell-Proliferation gemessen werden. Mit den Epitop-Kartierungs-Programmen *Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0* und *DiscoTope 2.0* im Abgleich mit der Sequenz-Datenbank *BLAST*, konnten wir eine Aminosäure-Sequenz-Homologie zwischen dem menschlichen Protein ERBB3 und dem *Borrelia burgdorferi*-Protein *Erp family outer-surface*-Lipoprotein entdecken.

Die erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit stellen eine experimentelle Grundlage für die tiefere Erforschung der Genese neuropsychiatrischer Erkrankungen im Kontext auto-immunologischer Reaktionen dar. Die praktische Relevanz dieser Ergebnisse muss aber noch in der Zukunft durch weitere klinische und *in-vivo*-Studien bestätigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aboitiz F, Montiel JF (2021): The Enigmatic Reissner's Fiber and the Origin of Chordates. *Front Neuroanat* 15, 703835
- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG (2004): Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 5, 266–271
- Ames A (2000): CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 34, 42–68
- Apache OpenOffice Calc. <https://www.openoffice.org/de/product/calc.html>; abgerufen am 28.01.2022
- Ariño H, Gresa-Arribas N, Blanco Y, Martínez-Hernández E, Sabater L, Petit-Pedrol M, Rouco I, Bataller L, Dalmau JO, Saiz A, Graus F (2014): Cerebellar ataxia and glutamic acid decarboxylase antibodies: immunologic profile and long-term effect of immunotherapy. *JAMA Neurol* 71, 1009–1016
- Begemann M, Grube S, Papiol S, Malzahn D, Krampe H, Ribbe K, Friedrichs H, Radyushkin KA, El-Kordi A, Benseler F, et al. (2010): Modification of cognitive performance in schizophrenia by complexin 2 gene polymorphisms. *Arch Gen Psychiatry* 67, 879–888
- Behesti H, Fore TR, Wu P, Horn Z, Leppert M, Hull C, Hatten ME (2018): ASTN2 modulates synaptic strength by trafficking and degradation of surface proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E9717–E9726
- Berlin T, Zandman-Goddard G, Blank M, Matthias T, Pfeiffer S, Weis I, Toubi E, Singh S, Asherson R, Fraser A, et al. (2007): Autoantibodies in Nonautoimmune Individuals during Infections. *Ann N Y Acad Sci* 1108, 584–593
- Beutgen VM, Schmelter C, Pfeiffer N, Grus FH (2021): Contribution of the Commensal Microflora to the Immunological Homeostasis and the Importance of Immune-Related Drug Development for Clinical Applications. *Int J Mol Sci* 22, 8896
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978): Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38, 3751–3757
- BioRender. <https://biorender.com/>; abgerufen am 28.01.2022
- Birur B, Kraguljac NV, Shelton RC, Lahti AC (2017): Brain structure, function, and neurochemistry in schizophrenia and bipolar disorder—a systematic review of the magnetic resonance neuroimaging literature. *npj Schizophr* 3, 1–15
- Blanchard N, Dunay IR, Schlüter D (2015): Persistence of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system: a fine-tuned balance between the parasite, the brain and the immune system. *Parasite Immunol* 37, 150–158
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; abgerufen am 28.01.2022
- Bleuler E: Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. In G. Aschaffenburg (Hrsg.), *Handbuch der Psychiatrie* (spez. Teil, 4. Abtlg., 1. Hälfte). Deuticke, Leipzig 1911

- Blomström Å, Karlsson H, Wicks S, Yang S, Yolken RH, Dalman C (2012): Maternal antibodies to infectious agents and risk for non-affective psychoses in the offspring—a matched case–control study. *Schizophr Res* 140, 25–30
- Bora E, Fornito A, Radua J, Walterfang M, Seal M, Wood SJ, Yücel M, Velakoulis D, Pantelis C (2011): Neuroanatomical abnormalities in schizophrenia: A multimodal voxelwise meta-analysis and meta-regression analysis. *Schizophr Res* 127, 46–57
- Brimberg L, Mader S, Jeganathan V, Berlin R, Coleman T, Gregersen P, Huerta P, Volpe B, Diamond B (2016): Caspr2-reactive antibody cloned from a mother of an ASD child mediates an ASD-like phenotype in mice. *Mol Psychiatry* 21, 1663–1671
- Brissette CA, Cooley AE, Burns LH, Riley SP, Verma A, Woodman ME, Bykowski T, Stevenson B (2008): Lyme borreliosis spirochete Erp proteins, their known host ligands, and potential roles in mammalian infection. *Int J Med Microbiol* 298, 257–267
- Brown AS, Schaefer CA, Quesenberry CP, Liu L, Babulas VP, Susser ES (2005): Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *Am J Psychiatry* 162, 767–773
- Bueter W, Dammann O, Zscheppang K, Korenbaum E, Dammann CEL (2006): ErbB receptors in fetal endothelium – a potential linkage point for inflammation-associated neonatal disorders? *Cytokine* 36, 267–275
- Buka SL, Cannon TD, Torrey EF, Yolken RH, Collaborative Study Group on the Perinatal Origins of Severe Psychiatric Disorders (2008): Maternal exposure to herpes simplex virus and risk of psychosis among adult offspring. *Biol Psychiatry* 63, 809–815
- Bürgy M (2008): The Concept of Psychosis: Historical and Phenomenological Aspects. *Schizophr Bull* 34, 1200–1210
- Büssow K, Cahill D, Nietfeld W, Bancroft D, Scherzinger E, Lehrach H, Walter G (1998): A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res* 26, 5007–5008
- Ciobanu AM, Dumitru AE, Gica N, Botezatu R, Peltecu G, Panaitescu AM (2020): Benefits and Risks of IgG Transplacental Transfer. *Diagnostics (Basel)* 10, 583
- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I (2010): Multiple autoimmune syndrome. *Maedica (Bucur)* 5, 132–134
- Cunningham MW (2014): Rheumatic Fever, Autoimmunity and Molecular Mimicry: The Streptococcal Connection. *Int Rev Immunol* 33, 314–329
- Dahm L, Ott C, Steiner J, Stepniak B, Teegen B, Saschenbrecker S, Hammer C, Borowski K, Begemann M, Lemke S, et al. (2014): Seroprevalence of autoantibodies against brain antigens in health and disease. *Ann Neurol* 76, 82–94
- Damian RT (1964): Molecular Mimicry: Antigen Sharing by Parasite and Host and Its Consequences. *Am. Nat.* 98, 129–149
- Dardiotis E, Tsouris Z, Mentis A-FA, Siokas V, Michalopoulou A, Sokratous M, Dastamani M, Bogdanos DP, Deretzi G, Kountouras J (2018): H. pylori and Parkinson’s disease: Meta-analyses including clinical severity. *Clin Neurol Neurosurg* 175, 16–24

- DIMDI - ICD-10-GM Version 2013. <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2013/block-f20-f29.htm>; abgerufen am 19.10.2021
- Dudley MZ, Halsey NA, Omer SB, Orenstein WA, O’Leary ST, Limaye RJ, Salmon DA (2020): The state of vaccine safety science: systematic reviews of the evidence. *Lancet Infect Dis* 20, e80–e89
- Dziegielewska KM, Daikuhara Y, Ohnishi T, Waite MP, Ek J, Habgood MD, Lane MA, Potter A, Saunders NR (2000): Fetuin in the developing neocortex of the rat: distribution and origin. *J Comp Neurol* 423, 373–388
- Eaton WW, Byrne M, Ewald H, Mors O, Chen C-Y, Agerbo E, Mortensen PB (2006): Association of Schizophrenia and Autoimmune Diseases: Linkage of Danish National Registers. *AJP* 163, 521–528
- Elde NC, Malik HS (2009): The evolutionary conundrum of pathogen mimicry. *Nat Rev Microbiol* 7, 787–797
- Esteves PJ, Abrantes J, Baldauf H-M, BenMohamed L, Chen Y, Christensen N, González-Gallego J, Giacani L, Hu J, Kaplan G, et al. (2018): The wide utility of rabbits as models of human diseases. *Exp Mol Med* 50, 66
- Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F (2014): Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 19 Suppl 1, 1–5
- Fallon BA, Strobino B, Reim S, Stoner J, Cunningham MW (2020): Anti-lysoganglioside and other anti-neuronal autoantibodies in post-treatment Lyme Disease and Erythema Migrans after repeat infection. *Brain Behav Immun Health* 2, 100015
- Fenoy I, Giovannoni M, Batalla E, Martín V, Frank FM, Piazzon I, Goldman A (2009): *Toxoplasma gondii* infection blocks the development of allergic airway inflammation in BALB/c mice. *Clin Exp Immunol* 155, 275–284
- Fenoy IM, Sánchez VR, Soto AS, Picchio MS, Martín V, Goldman A (2015): *Toxoplasma gondii* infection modulate systemic allergic immune response in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 154, 47–50
- Figueiredo AS, Schumacher A (2016): The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology* 148, 13–21
- Fiji. <https://imagej.github.io/software/fiji/index>; abgerufen am 28.01.2022
- Flaum M, Schultz SK (1996): The Core Symptoms of Schizophrenia. *Ann Med* 28, 525–531
- Fock V, Plessl K, Draxler P, Otti GR, Fiala C, Knöfler M, Pollheimer J (2015): Neuregulin-1-mediated ErbB2–ErbB3 signalling protects human trophoblasts against apoptosis to preserve differentiation. *J Cell Sci* 128, 4306–4316
- Fritzsche M (2002): Seasonal correlation of sporadic schizophrenia to Ixodes ticks and Lyme borreliosis. *Int J Health Geogr* 1, 2
- Gaffield MA, Betz WJ (2006): Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat Protoc* 1, 2916–2921

- Goldenberg RL, McClure EM, Saleem S, Reddy UM (2010): Infection-related stillbirths. *Lancet* 375, 1482–1490
- Greenlee JE, Clawson SA, Hill KE, Wood B, Clardy SL, Tsunoda I, Carlson NG (2015): Anti-Yo Antibody Uptake and Interaction with Its Intracellular Target Antigen Causes Purkinje Cell Death in Rat Cerebellar Slice Cultures: A Possible Mechanism for Paraneoplastic Cerebellar Degeneration in Humans with Gynecological or Breast Cancers. *PLoS One* 10, e0123446
- Guerrini R, Dobyns WB (2014): Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. *Lancet Neurol* 13, 710–726
- Halonen SK, Weiss LM (2013): TOXOPLASMOSIS. *Handb Clin Neurol* 114, 125–145
- Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O (2006): Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* 15, 2558–2567
- Henkel AW, Bieger SC (1994): Quantification of Proteins Dissolved in an Electrophoresis Sample Buffer. *Anal Biochem* 223, 329–331
- Hill KE, Clawson SA, Rose JW, Carlson NG, Greenlee JE (2009): Cerebellar Purkinje cells incorporate immunoglobulins and immunotoxins in vitro: implications for human neurological disease and immunotherapeutics. *J Neuroinflammation* 6, 31
- Hjorthøj C, Stürup AE, McGrath JJ, Nordentoft M (2017): Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry* 4, 295–301
- Ho R, Minturn JE, Hishiki T, Zhao H, Wang Q, Cnaan A, Maris J, Evans AE, Brodeur GM (2005): Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 65, 9868–9875
- Huda S, Whittam D, Bhojak M, Chamberlain J, Noonan C, Jacob A, Kneen R (2019): Neuromyelitis optica spectrum disorders. *Clin Med (Lond)* 19, 169–176
- Hutson SL, Wheeler KM, McLone D, Frim D, Penn R, Swisher CN, Heydemann PT, Boyer KM, Noble AG, Rabiah P, et al. (2015): Patterns of Hydrocephalus Caused by Congenital *Toxoplasma gondii* Infection Associate With Parasite Genetics. *Clin Infect Dis* 61, 1831–1834
- IEDB.org: Free epitope database and prediction resource. <http://www.iedb.org>; abgerufen am 28.01.2022
- Irani SR (2016): ‘Moonlighting’ surface antigens: a paradigm for autoantibody pathogenicity in neurology? *Brain* 139, 304–306
- Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P (2017): BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res* 45, W24–W29
- Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://jmol.sourceforge.net/>; abgerufen am 28.01.2022
- Johnstone EveC, Frith CD, Crow TJ, Husband J, Kreef L (1976): Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet* 308, 924–926

- Joulia R, Gaudenzio N, Rodrigues M, Lopez J, Blanchard N, Valitutti S, Espinosa E (2015): Mast cells form antibody-dependent degranulatory synapse for dedicated secretion and defence. *Nat Commun* 6, 6174
- Jurek B, Chayka M, Kreye J, Lang K, Kraus L, Fidzinski P, Kornau H-C, Dao L-M, Wenke NK, Long M, et al. (2019): Human gestational N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies impair neonatal murine brain function. *Ann Neurol* 86, 656–670
- Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC (2001): Persistence of Immunoglobulin M or Immunoglobulin G Antibody Responses to *Borrelia burgdorferi* 10–20 Years after Active Lyme Disease. *Clin Infect Dis* 33, 780–785
- Kao JPY, Harootunian AT, Tsien RY (1989): Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *J Biol Chem* 264, 8179–8184
- Karachaliou M, Chatzi L, Michel A, Kyriklaki A, Kampouri M, Koutra K, Roumeliotaki T, Chalkiadaki G, Stiakaki E, Pawlita M, et al. (2017): Helicobacter pylori Seropositivity and Childhood Neurodevelopment, the Rhea Birth Cohort in Crete, Greece. *Paediatr Perinat Epidemiol* 31, 374–384
- Khandaker GM, Zimbron J, Lewis G, Jones PB (2013): Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychol Med* 43, 239–257
- Kleine AD, Reuss B (2021): Interactions of Antibodies to the Gram-Negative Gastric Bacterium Helicobacter pylori with the Synaptic Calcium Sensor Synaptotagmin 5, Correlate to Impaired Vesicle Recycling in SiMa Human Neuroblastoma Cells. *J Mol Neurosci* 71, 481–505
- Kontkanen O, Törönen P, Lakso M, Wong G, Castrén E (2002): Antipsychotic drug treatment induces differential gene expression in the rat cortex. *J Neurochem* 83, 1043–1053
- Kraepelin E: Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte (7. Aufl.). J.A. Barth, Leipzig 1903
- Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M (2012): Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. *PLoS Comput Biol* 8, e1002829
- Kurnianingsih YA, Kuswanto CN, McIntyre RS, Qiu A, Ho BC, Sim K (2011): Neurocognitive-genetic and neuroimaging-genetic research paradigms in schizophrenia and bipolar disorder. *J Neural Transm* 118, 1621–1639
- Laemmli UK (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lancaster E (2016): The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis. *J Clin Neurol* 12, 1–13
- Lancaster E, Dalmau J (2012): Neuronal autoantigens—pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol* 8, 380–390
- Larsen JEP, Lund O, Nielsen M (2006): Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Res* 2, 2

- Lee YH, Cherkerzian S, Seidman LJ, Papandonatos GD, Savitz DA, Tsuang MT, Goldstein JM, Buka SL (2020): Maternal bacterial infection during pregnancy and offspring's risk of psychoses: variation by severity of infection and offspring sex. *Am J Psychiatry* 177, 66–75
- Lionel AC, Tammimies K, Vaags AK, Rosenfeld JA, Ahn JW, Merico D, Noor A, Runke CK, Pillalamarri VK, Carter MT, et al. (2014): Disruption of the *ASTN2/TRIM32* locus at 9q33.1 is a risk factor in males for autism spectrum disorders, ADHD and other neurodevelopmental phenotypes. *Hum Mol Genet* 23, 2752–2768
- Lorentz A, Baumann A, Vitte J, Blank U (2012): The SNARE Machinery in Mast Cell Secretion. *Front Immunol* 3, 143
- Lu F, Huang S (2017): The Roles of Mast Cells in Parasitic Protozoan Infections. *Front Immunol* 8, 363
- Madre M, Canales-Rodríguez EJ, Fuentes-Claramonte P, Alonso-Lana S, Salgado-Pineda P, Guerrero-Pedraza A, Moro N, Bosque C, Gomar JJ, Ortíz-Gil J, et al. (2019): Structural abnormality in schizophrenia versus bipolar disorder: A whole brain cortical thickness, surface area, volume and gyrification analyses. *Neuroimage Clin* 25, 102131
- Marini P, MacLeod RAF, Treuner C, Bruchelt G, Böhm W, Wolburg H, Schweizer P, Girgert R (1999): SiMa, a New Neuroblastoma Cell Line Combining Poor Prognostic Cytogenetic Markers with High Adrenergic Differentiation. *Cancer Genet Cytogenet* 112, 161–164
- Maycox PR, Kelly F, Taylor A, Bates S, Reid J, Logendra R, Barnes MR, Larminie C, Jones N, Lennon M, et al. (2009): Analysis of gene expression in two large schizophrenia cohorts identifies multiple changes associated with nerve terminal function. *Mol Psychiatry* 14, 1083–1094
- McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J (2008): Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 30, 67–76
- Mednick SA (1988): Adult Schizophrenia Following Prenatal Exposure to an Influenza Epidemic. *Arch Gen Psychiatry* 45, 189
- Mei L, Nave K-A (2014): Neuregulin-ERBB Signaling in the Nervous System and Neuropsychiatric Diseases. *Neuron* 83, 27–49
- Meyer D, Birchmeier C (1995): Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378, 386–390
- Microsoft Excel. <https://www.microsoft.com/de-de/microsoft-365/excel>; abgerufen am 28.01.2022
- Moncó JCG, Wheeler CM, Benach JL, Furie RA, Lukehart SA, Stanek G, Steere AC (1993): Reactivity of neuroborreliosis patients (Lyme disease) to cardiolipin and gangliosides. *J Neurol Sci* 117, 206–214
- Mørch MT, Sørensen SF, Khorrooshi R, Asgari N, Owens T (2018): Selective localization of IgG from cerebrospinal fluid to brain parenchyma. *J Neuroinflammation* 15, 110
- Morimoto K, Nakajima K (2019): Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. *Front Neurosci* 13, 916

- Morita S, Miyata S (2012): Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res* 349, 589–603
- Mortensen PB, Nørgaard-Pedersen B, Waltoft BL, Sørensen TL, Hougaard D, Torrey EF, Yolken RH (2007): *Toxoplasma gondii* as a Risk Factor for Early-Onset Schizophrenia: Analysis of Filter Paper Blood Samples Obtained at Birth. *Biol Psychiatry* 61, 688–693
- Muhsen K, Ornoy A, Akawi A, Alpert G, Cohen D (2011): An association between *Helicobacter pylori* infection and cognitive function in children at early school age: a community-based study. *BMC Pediatrics* 11, 43
- Muñoz RI, Kähne T, Herrera H, Rodríguez S, Guerra MaM, Vío K, Hennig R, Rapp E, Rodríguez E (2019): The subcommissural organ and the Reissner fiber: old friends revisited. *Cell Tissue Res* 375, 507–529
- Murray RM, Lewis SW (1987): Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J (Clin Res Ed)* 295, 681–682
- Nachamkin I, Liu J, Li M, Ung H, Moran AP, Prendergast MM, Sheikh K (2002): *Campylobacter jejuni* from Patients with Guillain-Barré Syndrome Preferentially Expresses a GD1a-Like Epitope. *Infect Immun* 70, 5299–5303
- Nuechterlein KH, Dawson ME (1984): A Heuristic Vulnerability/Stress Model of Schizophrenic Episodes. *Schizophr Bull* 10, 300–312
- Osborne LM, Brar A, Klein SL (2019): The role of Th17 cells in the pathophysiology of pregnancy and perinatal mood and anxiety disorders. *Brain Behav Immun* 76, 7–16
- Pachner AR, Steere AC (1985): The triad of neurologic manifestations of Lyme disease: Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis. *Neurology* 35, 47–47
- Palma J, Tokarz-Deptuła B, Deptuła J, Deptuła W (2018): Natural antibodies – facts known and unknown. *Cent Eur J Immunol* 43, 466–475
- Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M (2012): IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies. *Clin Dev Immunol* 2012, 985646
- Passante E, Frankish N (2009): The RBL-2H3 cell line: its provenance and suitability as a model for the mast cell. *Inflamm Res* 58, 737–745
- Pirozzi F, Nelson B, Mirzaa G (2018): From microcephaly to megalencephaly: determinants of brain size. *Dialogues Clin Neurosci* 20, 267–282
- Pittock SJ, Lucchinetti CF, Parisi JE, Benarroch EE, Mokri B, Stephan CL, Kim K-K, Kilimann MW, Lennon VA (2005): Amphiphysin autoimmunity: paraneoplastic accompaniments. *Ann Neurol* 58, 96–107
- Platt MP, Agalliu D, Cutforth T (2017): Hello from the Other Side: How Autoantibodies Circumvent the Blood–Brain Barrier in Autoimmune Encephalitis. *Front Immunol* 8, 442
- Pleyer U, Gross U, Schlüter D, Wilking H, Seeber F (2019): Toxoplasmosis in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 116, 435–444

- Ponomarenko JV, Bourne PE (2007): Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct Biol* 7, 64
- Protein Data Bank R. <https://www.rcsb.org/>; abgerufen am 28.01.2022
- Prüss H, Finke C, Höltje M, Hofmann J, Klingbeil C, Probst C, Borowski K, Ahnert-Hilger G, Harms L, Schwab JM, et al. (2012): N-Methyl-d-Aspartate Receptor Antibodies in Herpes Simplex Encephalitis. *Ann Neurol* 72, 902–911
- Ramakrishnan S, Bera M, Coleman J, Rothman JE, Krishnakumar SS Synergistic roles of Synaptotagmin-1 and complexin in calcium-regulated neuronal exocytosis. *eLife* 2, e54506
- Reshetnyak VI, Reshetnyak TM (2017): Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World J Gastroenterol* 23, 4867–4878
- Ribatti D (2018): The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. *IAA* 176, 55–60
- Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JT, Farh K-H, Holmans PA, Lee P, Bulik-Sullivan B, Collier DA, Huang H, et al. (2014): Biological Insights From 108 Schizophrenia-Associated Genetic Loci. *Nature* 511, 421–427
- Rivera-Correa J, Rodriguez A (2018): Divergent roles of anti-self antibodies during infection. *Trends Immunol* 39, 515–522
- Rogovskyy AS, Bankhead T (2013): Variable VlsE Is Critical for Host Reinfection by the Lyme Disease Spirochete. *PLoS One* 8, e61226
- Rojas M, Restrepo-Jiménez P, Monsalve DM, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramírez-Santana C, Leung PSC, Ansari AA, Gershwin ME, Anaya J-M (2018): Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun* 95, 100–123
- Saadoun S, Papadopoulos MC (2015): Role of membrane complement regulators in neuromyelitis optica. *Mult Scler* 21, 1644–1654
- Saegusa C, Fukuda M, Mikoshiba K (2002): Synaptotagmin V Is Targeted to Dense-core Vesicles That Undergo Calcium-dependent Exocytosis in PC12 Cells. *J Biol Chem* 277, 24499–24505
- Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM (2012): Barrier Mechanisms in the Developing Brain. *Front Pharmacol* 3, 46
- Schielke A, Rosner BM, Stark K (2014): Epidemiology of campylobacteriosis in Germany – insights from 10 years of surveillance. *BMC Infect Dis* 14, 30
- Schultz SH, North SW, Shields CG (2007): Schizophrenia: A Review. *AFP* 75, 1821–1829
- Selemon LD, Zecevic N (2015): Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. *Transl Psychiatry* 5, e623
- Seller MJadinolfi M (1975): Levels of albumin, alpha-fetoprotein, and IgG in human fetal cerebrospinal fluid. *Arch Dis Child* 50, 484–485
- Sellner J, Hemmer B, Mühlau M (2010): The clinical spectrum and immunobiology of parainfectious neuromyelitis optica (Devic) syndromes. *J Autoimmun* 34, 371–379
- Shahrizaila N, Lehmann HC, Kuwabara S (2021): Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 397, 1214–1228

- Shindler-Itskovitch T, Ravona-Springer R, Leibovitz A, Muhsen K (2016): A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Helicobacterpylori Infection and Dementia. *J Alzheimers Dis* 52, 1431–1442
- Siloși I, Siloși CA, Boldeanu MV, Cojocaru M, Biciușcă V, Avrănescu CS, Cojocaru IM, Bogdan M, FolcuȚi RM (2016): The role of autoantibodies in health and disease. *Rom J Morphol Embryol* 57, 633–638
- Smith NL, Abi Abdallah DS, Butcher BA, Denkers EY, Baird B, Holowka D (2013): Toxoplasma gondii inhibits mast cell degranulation by suppressing phospholipase C γ -mediated Ca $^{2+}$ mobilization. *Front Microbiol* 4, 179
- Sollome JJ, Thavathiru E, Camenisch TD, Vaillancourt RR (2014): HER2/HER3 regulates extracellular acidification and cell migration through MTK1 (MEKK4). *Cell Signal* 26, 70-82
- Soto EO, Pecht I (1988): A monoclonal antibody that inhibits secretion from rat basophilic leukemia cells and binds to a novel membrane component. *J Immunol* 141, 4324–4332
- Spieker-Polet H, Sethupathi P, Yam PC, Knight KL (1995): Rabbit monoclonal antibodies: generating a fusion partner to produce rabbit-rabbit hybridomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9348–9352
- Steiner J, Walter M, Glanz W, Sarnyai Z, Bernstein H-G, Vielhaber S, Kästner A, Skalej M, Jordan W, Schiltz K, et al. (2013): Increased prevalence of diverse N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antibodies in patients with an initial diagnosis of schizophrenia: specific relevance of IgG NR1a antibodies for distinction from N-methyl-D-aspartate glutamate receptor encephalitis. *JAMA Psychiatry* 70, 271–278
- Steinkamp MP, Low-Nam ST, Yang S, Lidke KA, Lidke DS, Wilson BS (2014): erbB3 Is an Active Tyrosine Kinase Capable of Homo- and Heterointeractions. *Mol Cell Biol* 34, 965–977
- Stolp HB, Dziegielewska KM (2009): Review: Role of developmental inflammation and blood–brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35, 132–146
- Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Lane MA, Potter AM, Saunders NR (2005): Breakdown of the blood-brain barrier to proteins in white matter of the developing brain following systemic inflammation. *Cell Tissue Res* 320, 369–378
- Stolp HB, Turnquist C, Dziegielewska KM, Saunders NR, Anthony DC, Molnár Z (2011): Reduced ventricular proliferation in the foetal cortex following maternal inflammation in the mouse. *Brain* 134, 3236–3248
- Tadokoro S, Nakanishi M, Hirashima N (2005): Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing Ca $^{2+}$ sensitivity of the fusion process. *J Cell Sci* 118, 2239–2246
- Tadokoro S, Nakanishi M, Hirashima N (2010): Complexin II regulates degranulation in RBL-2H3 cells by interacting with SNARE complex containing syntaxin-3. *Cell Immunol* 261, 51–56
- Tanaka K, Kawamura M, Sakimura K, Kato N (2020): Significance of Autoantibodies in Autoimmune Encephalitis in Relation to Antigen Localization: An Outline of Frequently Reported Autoantibodies with a Non-Systematic Review. *Int J Mol Sci* 21, 4941

- Taylor LE, Swerdfeger AL, Eslick GD (2014): Vaccines are not associated with autism: An evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine* 32, 3623–3629
- Thornicroft G, Brohan E, Rose D, Sartorius N, Leese M, INDIGO Study Group (2009): Global pattern of experienced and anticipated discrimination against people with schizophrenia: a cross-sectional survey. *Lancet* 373, 408–415
- Tumani H, Huss A, Bachhuber F (2017): The cerebrospinal fluid and barriers – anatomic and physiologic considerations. *Handb Clin Neurol.* 146, 21–32
- Unger A, Erfurth A, Sachs G (2018): Negativsymptome in der Schizophrenie und ihre Differenzialdiagnose. *Psychopraxis Neuropraxis* 21, 73–78
- Varrin-Doyer M, Spencer CM, Schulze-Topphoff U, Nelson PA, Stroud RM, C Cree BA, Zamvil SS (2012): Aquaporin 4-Specific T Cells in Neuromyelitis Optica Exhibit a Th17 Bias and Recognize Clostridium ABC Transporter. *Ann Neurol* 72, 53–64
- Vergara RC, Jaramillo-Riveri S, Luarte A, Moëne-Loccoz C, Fuentes R, Couve A, Maldonado PE (2019): The Energy Homeostasis Principle: Neuronal Energy Regulation Drives Local Network Dynamics Generating Behavior. *Front Comput Neurosci* 13, 49
- Vio K, Rodríguez S, Navarrete EH, Pérez-Fígares JM, Jiménez AJ, Rodríguez EM (2000): Hydrocephalus induced by immunological blockage of the subcommissural organ–Reissner’s fiber (RF) complex by maternal transfer of anti-RF antibodies. *Exp Brain Res* 135, 41–52
- Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, Wheeler DK, Sette A, Peters B (2019): The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res* 47, D339–D343
- von Hausswolff-Juhlin Y, Bjartveit M, Lindström E, Jones P (2009): Schizophrenia and physical health problems. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 119, 15–21
- Vrijenhoek T, Buizer-Voskamp JE, van der Stelt I, Strengman E, Sabatti C, Geurts van Kessel A, Brunner HG, Ophoff RA, Veltman JA (2008): Recurrent CNVs Disrupt Three Candidate Genes in Schizophrenia Patients. *Am J Hum Genet* 83, 504–510
- Walker EF, Savoie T, Davis D (1994): Neuromotor Precursors of Schizophrenia. *Schizophr Bull* 20, 441–451
- Wandinger SK, Lahortiga I, Jacobs K, Klammer M, Jordan N, Elschenbroich S, Parade M, Jacoby E, Linders JTM, Brehmer D, et al. (2016): Quantitative Phosphoproteomics Analysis of ERBB3/ERBB4 Signaling. *PLoS One* 11, e0146100
- Wang W-J, Hao C-F, Yi-Lin, Yin G-J, Bao S-H, Qiu L-H, Lin Q-D (2010): Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J Reprod Immunol* 84, 164–170
- Werner C, Pauli M, Doose S, Weishaupt A, Haselmann H, Grünewald B, Sauer M, Heckmann M, Toyka KV, Asan E, et al. (2016): Human autoantibodies to amphiphysin induce defective presynaptic vesicle dynamics and composition. *Brain* 139, 365–379
- Wilking H, Fingerle V, Klier C, Thamm M, Stark K (2015): Antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato among Adults, Germany, 2008–2011. *Emerg Infect Dis* 21, 107–110

- Willison HJ, Jacobs BC, Doorn PA van (2016): Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 388, 717–727
- Wilson PM, Fryer RH, Fang Y, Hatten ME (2010): Astn2, A Novel Member of the Astrotactin Gene Family, Regulates the Trafficking of ASTN1 during Glial-Guided Neuronal Migration. *J Neurosci* 30, 8529–8540
- Yan S, Wang Y, Zhang Y, Wang L, Zhao X, Du C, Gao P, Yan F, Liu F, Gong X, et al. (2020): Synaptotagmin-11 regulates the functions of caveolae and responds to mechanical stimuli in astrocytes. *FASEB j* 34, 2609–2624
- Yilmaz Y, Gul C, Arabul M, Eren M (2008): Helicobacter pylori: A role in schizophrenia? *Med Sci Monit* 14, HY13-6
- Yolken RH, Bachmann S, Rouslanova I, Lillehoj E, Ford G, Torrey EF, Schroeder J (2001): Antibodies to Toxoplasma gondii in Individuals with First-Episode Schizophrenia. *Clin Infect Dis* 32, 842–844
- Yoshio T, Okamoto H, Hirohata S, Minota S (2013): IgG anti-NR2 glutamate receptor autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus activate endothelial cells. *Arthritis Rheum* 65, 457–463
- Yuki N, Ho TW, Tagawa Y, Koga M, Li CY, Hirata K, Griffin JW (1999): Autoantibodies to GM1b and GalNAc-GD1a: relationship to Campylobacter jejuni infection and acute motor axonal neuropathy in China. *J Neurol Sci* 164, 134–138
- Zabriskie JB, Freimer EH (1966): An immunological relationship between the Group A Streptococcus and mammalian muscle. *J Exp Med* 124, 661–678
- ZEN. <https://www.zeiss.com/microscopy/us/products/microscope-software/zen.html>; abgerufen am 21.02.2022
- Zhou Q, Zhou P, Wang AL, Wu D, Zhao M, Südhof TC, Brunger AT (2017): The Primed SNARE-Complexin-Synaptotagmin Complex for Neuronal Exocytosis. *Nature* 548, 420–425
- Zohar Y, Wildbaum G, Karin N (2006): Beneficial autoimmunity participates in the regulation of rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 11, 368–79
- Zuliani L, Graus F, Giometto B, Bien C, Vincent A (2012): Central nervous system neuronal surface antibody associated syndromes: review and guidelines for recognition. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83, 638–645

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Prof. Dr. Bernhard Reuss, der durch seinen beständigen praktischen Einsatz und seine geschätzten theoretischen Anregungen für eine exzellente Betreuung dieser Arbeit gesorgt hat. Außerdem möchte ich mich ausdrücklich für die vielen mir gewährten kreativen Freiheiten bei der Umsetzung der Experimente bedanken, die mein wissenschaftliches Interesse und Verständnis lohnend gefördert haben.

Auch möchte ich Prof. Dr. Abdul Rahman Asif für die freundliche und konstruktive Unterstützung an dieser Arbeit danken.

Für die außerordentliche Hilfsbereitschaft von Prof. Dr. Jörg Wilting und Dr. Jürgen Becker sowie von Berti Manshausen, Sonja Schwoch und Christina Zelent aus dem Zentrum Anatomie der Universitätsmedizin Göttingen möchte ich mich ebenfalls ausdrücklich bedanken.

