

Narkolepsie

Autoantikörper gegen Tribbles Homolog 2 (anti-TRIB2)

Prof. Dr. med. Hans-Peter Seelig
Dr. rer. nat. Claudia A. Seelig



Autoantikörper - Autoantibodies - Autoanticorpi

Prof. Dr. med. Hans-Peter Seelig - Dr. rer. nat. Claudia A. Seelig
Karlsruhe - Merano

kontakt@hpseelig.de · www.hpseelig.de

Autoantikörper gegen Tribbles homolog 2 (anti-TRIB2) wurden erstmals bei drei Patienten mit autoimmuner Uveitis beschrieben (73). Fünf Jahre später wurden sie auch bei europäischen, amerikanischen und japanischen Narkolepsie-Patienten nachgewiesen (7, 28, 66). Ihre Rolle in der Pathogenese der Narkolepsie ist zwar noch unbekannt, die bei Untersuchungen an Mäusen erhaltenen Ergebnisse (27) lassen aber vermuten, dass ihnen möglicherweise eine pathologische Bedeutung zukommt.

Narkolepsie

Die Narkolepsie (klassische Narkolepsie*) ist eine von exzessiver Tagesschläfrigkeit gekennzeichnete, zentral bedingte Hypersomnie. Die Prävalenz dieser meist in der Pubertät beginnenden, lebenslangen Erkrankung liegt bei $2,5 - 5,0 \times 10^{-4}$. Zu den Symptomen zählen u. a. die Kataplexie, Schläflähmungen, beim Einschlafen (hypnagoge) und Aufwachen (hypnopompe) auftretende visuelle und auditive Halluzinationen, fraktionierter Nachtschlaf, automatisches Verhalten (Fortführung begonnener Handlungen in der Schlafphase), verkürzte Einschlaflatenz, vorzeitiger REM-(Rapid Eye Movement-) Schlaf (8, 40).

Die Ursache der klassischen Narkolepsie liegt in einer Hypocretin- (Orexin-) Defizienz, bedingt durch den Untergang der hypocretinsynthetisierenden Neuronen (HCRT-Neuronen) im lateralen Hypothalamus. Die Hypocretin-Spiegel im Liquor cerebrospinalis sind erniedrigt, oft liegen sie unterhalb der Nachweisgrenze (45, 48, 56, 64, Übersicht 67).

Für den Untergang der HCRT-Neuronen werden vor allem Autoimmunprozesse verantwortlich gemacht, die sich, ausgelöst durch stochastische endo- und/oder exogene Noxen, bei genetisch entsprechend prädisponierten Individuen manifestieren können. Die genetische Prädisposition äußert sich in dem 10- bis 40-fach höheren Krankheitsrisiko bei Verwandten ersten Grades und in der ungewöhnlich hohen Assoziation der Hypocretin-Defizienz mit dem (HLA)-DQ-Haplotyp DQA1*01:02 / DQB1*06:02 (42, 44) sowie in zusätzlichen Polymorphismen in einer Reihe immunregulatorischer Gene (Abbildung 2). Für Beteiligung exogener Faktoren als Auslöser der Erkrankung sprechen die geringe Konkordanz (20 - 35 %) bei eineiigen Zwillingen (26, 43, 69) sowie epidemiologische Daten, die auf Infektionen mit Streptokokken und Influenza-Viren hinweisen (1, 33, 20).

Trotz intensiver Untersuchungen ließ sich die Autoimmunpathogenese der Narkolepsie bisher nicht eindeutig beweisen. Der kürzlich erbrachte Nachweis autoreaktiver, durch Hypocretin-Peptide stimulierbarer CD4⁺ T-Helferzellen bei Narkolepsie-Patienten (10) sowie der Nachweis pathogener Eigenschaften der gegen Tribbles homolog 2 gerichteten Autoantikörper (27) rücken diese jedoch in ein neues Blickfeld.

Tribbles homolog 2 (TRIB2)

Tribbles homolog 2, ein Mitglied der Tribbles-Familie (TRIB1-3), ist eine Pseudokinase mit einer Kinase-Domäne, der aber die für die katalytische Aktivität notwendigen Motive fehlen (Abbildung 1). Die von TRIB2 ausgeübten Funktionen sind vielfältig und reichen vom Adapterprotein für den Aufbau von Multienzymkomplexen („Signalosomen“) über die Inaktivierung von Zielproteinen bis zum Mediator von Signaltransduktionskaskaden bei multiplen physiologischen und pathologischen Prozessen (39, 72). Es kann mit zahlreichen

* Die „International Classification of Sleep Disorders“ unterscheidet zwischen der Narkolepsie mit Kataplexie (klassische Narkolepsie), der Narkolepsie ohne Kataplexie (monosymptomatische Narkolepsie) und der sekundären Narkolepsie (z. B. bei Hypothalamus- oder Hirnstammläsionen).

Komponenten dieser Kaskaden wie AKT1/2 (Proteinkinase B), MEK1, C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein), COP1 (constitutive photomorphogenic 1), MKK7 (MAP kinase kinase 7), C/EBP β oder NF-kappaB2/p100 (nuclear factor κ B) interagieren (13, 14, 29, 30, 31, 46, 68).

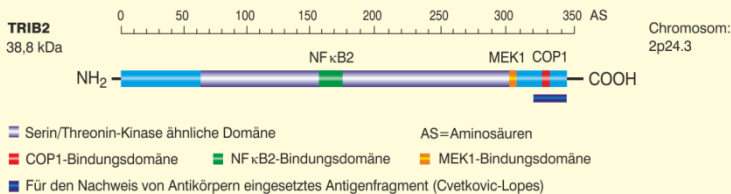


Abbildung 1 Molekülstruktur von Tribbles homolog 2 (TRIB2)

Es handelt sich um eine Pseudokinase, mit einer Kinasedomäne (AS 61 - 308), der aber die für die katalytische Aktivität essenziellen Motive fehlen. Die Sequenzhomologie zu den Proteinkinasen beträgt 30 %. Im C-Terminus liegen das COP1 (constitutive photomorphogenic 1) RING E3 Ubiquitin-Ligase-Bindungsmotiv und das MEK1 [MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) / ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Kinase 1]-Bindungsmotiv. Das erstere ist für die Bindung von C/EBP α und den anschließenden proteosomalen Abbau essenziell (akute myeloische Leukämien und Lungenkarzinome). Ein für die Bindung von NF κ B2 verantwortliches Motiv liegt zwischen AS 158 und AS 177. Von Cvetkovic-Lopes und Mitarbeitern (2010) (7) wurde zum Nachweis von anti-TRIB2 das endständige 28 AS lange C-terminale Fragment als Antigen eingesetzt.

TRIB2 wird weitverbreitet in einer Vielzahl von Zellen und Geweben exprimiert. Es findet sich in hämatopoetischen Zellen (37), in Zellen des Immunsystems wie B-Zellen, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und Makrophagen (12, 14, 36, 60, 68), in Adipozyten (46, 47) sowie auch in HeLa-Zellen (71). Nach Entzug von GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) bzw. von Interleukin-2 (IL-2) wird TRIB2 in humanen, aus einer Erythroleukämie stammenden TF-1 Zellen oder in aktivierten CD4⁺ T-Zellen vermehrt exprimiert, was *in vitro* mit einer verstärkten Apoptose einhergeht (38). Es findet sich auch in embryonalen Geweben (62), in hepatozellulären Karzinomen (55) und Lungenkarzinomen (18). Im Zentralnervensystem beschränkt sich seine Expression nicht nur auf die HCRT-Neuronen im lateralen Hypothalamus, in denen bei der Maus eine im Vergleich zu anderen Hirnregionen verstärkte Expression gemessen wurde (7), sondern sie erstreckt sich auch auf andere Groß- und Kleinhirnregionen (36, Allen Brain Atlas). Die Regulierung der Expression von TRIB2 und seine Funktionen sind für den jeweiligen Zelltyp spezifisch (31, 60).

Onkogene Eigenschaften erlangt TRIB2 z. B. durch die Vermittlung der proteosomalen Proteolyse von C/EBP α , einem Regulator der Myelopoese (54), dessen gesteigerte Proteolyse bei Mäusen akute myeloische Leukämien (AML) induzieren kann. Wird die für die Interaktion mit C/EBP α notwendige (Ubiquitin-Ligase) E3-Ligase-COP1-Bindungsstelle in TRIB2 deletiert, unterbleibt die Degradation von C/EBP α und die Entwicklung der Leukämie (29, 30). Fehlregulationen des *TRIB2*-Gens scheinen bei der Entstehung humaner Leukämien an Bedeutung zu gewinnen (23, 37). Auch bei bestimmten Lungenkarzinomen kann die Überexpression von TRIB2 und die dadurch verstärkte Inaktivierung von C/EBP α onkogen wirken (18).

In Monozyten hemmt TRIB2 die LPS-induzierbare Synthese von Interleukin 8 (IL-8) durch die Bindung und Inaktivierung der MAPKK-Kinasen MKK7 und MEK1, wodurch die Aktivierung und nukleäre Translokation von JNK (jun kinase) und ERK inhibiert werden. Eine verminderte Expression von TRIB2 steigert dagegen die Aktivität von JNK und ERK und

fördert die IL-8-Synthese (14). Durch den regulatorischen Einfluss auf die IL-8-Synthese in Monozyten/Makrophagen ist TRIB2 an der Kontrolle der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten bei Entzündungsreaktionen beteiligt und eine verminderte TRIB2-Expression könnte unerwünschte Entzündungsprozesse auslösen. Die Bedeutung von TRIB2 für die Regulierung und Kontrolle der Immunantwort offenbart sich auch darin, dass es die durch den Toll-like Rezeptor-5 (TLR-5) vermittelte Aktivierung von NF- κ B und damit die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α in Monozyten hemmt. Die durch die Bindung des TLR5-Liganden Flagellin induzierte, gesteigerte Expression von TRIB2 inhibiert den NF- κ B-Komplex durch die direkte Bindung von TRIB2 an die Subkomponente NF- κ B2 (p100) (68).

Autoantikörper gegen Tribbles homolog 2 (anti-TRIB2)

Autoantikörper gegen TRIB2 wurden erstmals bei 3 von 10 Patienten mit autoimmuner Uveitis beschrieben (73). Ihre Assoziation mit der Narkolepsie konnte in einer eleganten Studie mit transgenen Mäusen gezeigt werden, deren HCRT-Neuronen ein markiertes Poly-A-Bindungsprotein unter der Kontrolle des HCRT-Promotors exprimierten, das in der Lage war, die in diesen Neuronen synthetisierten mRNAs zu binden. Die mithilfe dieser mRNAs identifizierten Proteinantigene wurden dann zur Suche nach Autoantikörpern in Seren von Narkolepsie-Patienten eingesetzt. Hierbei wurde TRIB2 als ein in HCRT-Neuronen exprimiertes Autoantigen erkannt, gegen das bei 14,3 % der Narkolepsie-Patienten und bei 4,8 % der gesunden Kontrollen Autoantikörper nachzuweisen waren. Die Antikörper reagierten auch direkt mit den HCRT-Neuronen im Hypothalamus von Mäusen (7). Die Assoziation von anti-TRIB2 und Narkolepsie konnte in zwei nachfolgenden Studien (28, 66) bestätigt werden (Tabelle 1). Die unterschiedliche Prävalenz von anti-TRIB2 bei den in Tabelle 1 dargestellten Studien (14 % bei Cvetkovic-Lopes et al. 2010 (7) versus 25 - 26 % bei Kawashima et al. 2010 (28) und Toyoda et al. 2010 (66)) könnte sich dadurch erklären, dass im ersten Falle nur ein C-terminales TRIB2-Fragment von 28 der insgesamt 343 Aminosäuren als Antigen eingesetzt wurde, während von den anderen Untersuchern das gesamte intakte Protein mit einem vermutlich größeren Spektrum an immunreaktiven Epitopen verwendet wurde.

Anti-TRIB2 fanden sich vor allem in der Frühphase der Erkrankung. Bis zu 2,3 Jahre nach deren Beginn ist die Wahrscheinlichkeit für die Anwesenheit von anti-TRIB2 7,4-mal größer als in späteren Krankheitsphasen (7, 28). Nach dieser zeitorientierten Betrachtung fanden sich anti-TRIB2 in der Frühphase bei 41 % der DQB1*0602 positiven Patienten, während im späteren Verlauf die Antikörper nur noch bei 4 - 8 % der Fälle gefunden wurden (28). Innerhalb der ersten zwei bis drei Krankheitsjahre sinken die Antikörpertiter deutlich ab (7, 28). In niederen Titern (≥ 1 SD der im Mittel bei gesunden Kontrollen gemessenen Werte) ließen sie sich in Einzelfällen jedoch auch noch nach 20-jähriger Krankheitsdauer nachweisen (7). Die Höhe der anti-TRIB2-Titer war signifikant mit der Frequenz kataleptischer Attacken korreliert (7); sie waren besser korreliert mit der Manifestation einer Katalepsie als mit HLA-DQB1*0602 oder niederen Hypocretin-Spiegeln im Liquor (28). Bei den wenigen anti-TRIB2-positiven gesunden Personen fanden sich gleich häufig HLA-DQB1*0602-positive wie -negative Individuen (28). Anti-TRIB2 scheinen gelegentlich auch im Liquor cerebrospinalis vorzuliegen, quantitative Angaben wurden aber nicht gemacht (7).

Die wichtige Frage nach der Pathogenität von anti-TRIB2 wurde an Mäusen untersucht (27). Sechs Wochen nach intraventrikulärer Injektionen von antikörperhaltigen IgG-Fractionen aus anti-TRIB2-positiven Seren entwickelten die Tiere nicht nur morphologisch

Tabelle 1 Prävalenz von Autoantikörpern gegen Tribbles homolog 2 bei Patienten mit Narkolepsie und autoimmuner Uveitis sowie bei Kontrollgruppen.

Krankheitsbilder	n	anti-TRIB2 [%]	Autoren
Narkolepsie mit Kataplexie ^{*1}	119	14,3 ^{*2}	Cvetkovic-Lopes et al. 2010 (7)
Narkolepsie ohne Kataplexie	24	12,5 ^{*2}	
Idiopathische Hypersomnie	23	0,0	
Multiple Sklerose	16	0,0	
Entzündliche Neuropathien	9	11,1	
Gesunde Kontrollen	42	4,8	
Narkolepsie mit Kataplexie ^{*1}	90	21,1 ^{*3}	Kawashima et al. 2010 (28)
Narkolepsie ohne Kataplexie	57	3,5	
Gesunde Kontrollen	156	4,5	
Narkolepsie mit Kataplexie ^{*1}	88	26,1 ^{*3}	Toyoda et al. 2010 (66)
Narkolepsie ohne Kataplexie	18	5,6	
Idiopathische Hypersomnie	11	0,0	
Gesunde Kontrollen	87	0,0	
Autoimmune Uveitis	10	30,0	Zhang et al. 2005 (73)

n Anzahl untersuchte Personen

^{*1} HLA-DQB1*0602 positive Patienten

^{*2} Die prozentualen Anteile antikörperpositiver Patienten beziehen sich auf Extinktionen (ELISA) von ≥ 2 Standardabweichungen (SD) der gesunden Kontrollen. Bei einem Grenzwert von ≥ 1 SD der gesunden Kontrollen waren 39 % der Patienten mit Narkolepsie (56 von insgesamt 143) als positiv zu bewerten gewesen (7).

^{*3} Cut off ≥ 2 SD über dem Mittel gesunder Kontrollen.

nachweisbare Läsionen im Hypothalamus sondern auch Narkolepsie-ähnliche Immobilitätsattacken, Hyperaktivität und Defizite des Langzeitgedächtnisses. Histologisch zeigte sich ein deutlicher Verlust an Neuronen, insbesondere von HCRT-Neuronen im lateralen Hypothalamus. Die ausgeprägte Schädigung der Neuronen manifestierte sich in einem Verlust des NeuN-Markers (Neuronen-Kerne), als Zeichen einer reduzierten neuronalen Aktivität und Signalübertragung wurde die Verminderung von synaptischem Synaptophysin angesehen, möglicherweise eine Folge des Untergangs der HCRT-Neuronen.

Immunpathologische Aspekte

Für den die Narkolepsie auslösenden Untergang der hypocretinsynthetisierenden Neuronen werden vor allem Autoimmunphänomene verantwortlich gemacht (3, 16, 34, 41, 53, 58). Als wichtiges Argument wird, analog zu anderen Autoimmunerkrankungen, die Assoziation mit bestimmten HLA-Haplotypen vorgebracht, in diesem Falle die bei 98 % der Patienten anzutreffende Assoziation mit dem (HLA)-DQ-Haplotyp DQA1*01:02 / DQB1*06:02 (DQ0602). In den letzten Jahren wurden weitere, die Krankheitsempfänglichkeit modulierende multiethnische Polymorphismen in mehreren für die Immunregulation wichtigen Genen entdeckt (Abbildung 2). Sie betreffen das J-Segment der α -Kette

des T-Zellrezeptors (19), den an der MHC-TCR-Kostimulierung beteiligten TNFSF4 (OX40L) aus den TNF-Superfamilien-Liganden, sowie das in antigenpräsentierenden Zellen (APC) an der endolysosomalen Antigenverarbeitung beteiligte Cathepsin H (15), den purinergen ATP-Rezeptor P2RY11, dessen Expression auf CD8⁺ T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NKZ) deutlich vermindert war, verbunden mit einer eingeschränkten Resistenz gegenüber einem ATP-induzierten Zelltod (21, 35). Mutationen in seinem benachbarten *DNMT1*-Gen fanden sich bei einer mit Ataxie, Taubheit und Demenz einhergehenden Form der Narkolepsie (70). Die von diesem Gen kodierte DNA-Methyltransferase DNMT1 beeinflusst die Foxp3-Expression und die Genese regulatorischer T-Zellen (25). Weitere Polymorphismen fanden sich in dem *ZNF365*-Gen (Zinkfinger-Protein), in den Genen des Interleukin-10-Rezeptor β , des Interferon- α -Rezeptor 1 sowie des TCR- α (22). Ungeachtet der Bedeutung dieser genetischen Faktoren setzt die Bestätigung der Autoimmunpathogenese einer Organ- oder Zellschädigung den Nachweis gewebe- oder zellspezifischer Autoantikörper und/oder autoreaktiver T-Zellen voraus.

Die lange Suche nach Narkolepsie-spezifischen oder -assoziierten Markerantikörpern blieb weitgehend erfolglos. Es fanden sich mit den konventionellen Untersuchungsmethoden der Autoantikörperdiagnostik keine gegenüber gesunden Kontrollen vermehrt vorkommenden krankheitsassoziierten Antikörper gegen nukleäre (57) oder onkoneurale Antigene (2, 51), nicht gegen Ganglioside (50), eine Untersuchung, die wegen niedriger oder unter der Nachweisgrenze liegenden Hypocretinspiegeln bei einigen Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom, Miller-Fisher-Syndrom oder chronischer entzündlicher demyelinisierender Polyneuropathie (49) erfolgte. Ergebnislos blieb auch die Suche nach Antikörpern gegen Hypocretin und Hypocretin-Rezeptoren (5, 6, 63) sowie immunhistologische Untersuchungen an Gehirnschnitten (32, 52, 57) und Immunoblot-Analysen mit hypothalamischen Proteinextrakten (61). Nur in drei Studien wurden Antikörper nachgewiesen: [1] aus den Seren von Narkolepsie-Patienten isolierte IgG-Fractionen verstärkten bei Mäusen die Kontraktion der Harnblasenmuskulatur bei cholinergischer Stimulierung (59) und hemmten die interdigestive Motilität (migrating motor complex) in *ex vivo* Colonpräparaten (24), was auf die Anwesenheit möglicher Antikörper gegen muskuläre Ionenkanäle zurückgeführt wurde, [2] IgG aus CSF reagierte im Immunoblot mit nicht näher differenzierten Proteinen aus dem Hypothalamus von Ratten (4), [3] bei kataplektischen und nicht kataplektischen Narkolepsie-Patienten sowie bei nicht hypocretindefizienten Patienten mit idiopathischer Hypersomnie wurden mittels ELISA zirkulierende Immunkomplexe bestehend aus Antikörpern gegen ein Hypocretin-1-Peptid und anti-idiotypischem IgM gemessen; freie Hypocretin-Antikörper waren nicht nachweisbar. Verglichen wurden allerdings nur die beiden Mittelwerte der Extinktionen aus je einem Kollektiv gesunder und kranker Personen. Im Westernblot reagierte die aus einem Serum-Pool gewonnene IgG-Fraktion mit einem aus Hypothalamusgewebe der Maus isolierten Protein, dessen elektrophoretische Mobilität dem Präpro-Hypocretin entsprach (11).

Die gegen Tribbles homolog 2 gerichteten Antikörper repräsentieren das einzige bei einer nennenswerten Anzahl von Narkolepsie-Patienten nachweisbare Phänomen eines humoralen Autoimmunprozesses. Ihr bevorzugtes Auftreten in der Frühphase der Erkrankung würde insofern dem zeitlichen Verlauf eines Autoimmunprozesses entsprechen als auch mit der Zerstörung der HCRT-Neuronen der pathologische Prozess zum Stillstand käme, eine Hypothese, der allerdings das negative Ergebnis der anti-TRIB2-Bestimmung bei 16 Patienten in der Frühphase einer postvaxinalen Narkolepsie (9) widerspräche. Es gilt aber zu bedenken, dass es sich bei den in den drei Studien untersuchten Patienten

(Tabelle 1) um sporadische und nicht um postvaksinale Formen der Narkolepsie handelte und dass diese beiden Formen der Erkrankung hinsichtlich ihrer Pathogenese differieren könnten. Da TRIB2 aber nicht nur in den HCRT-Neuronen sondern auch in anderen Regionen des Gehirns und vor allem auch in zahlreichen peripheren Zellen und Geweben exprimiert wird, sind Zweifel an der pathogenen Bedeutung der Antikörper bezüglich des selektiven Untergangs von HCRT-Neuronen berechtigt, es sei denn, man unterstellt diesen Zellen eine besondere Sensibilität gegenüber bestimmten immunpathologischen Prozessen. Da TRIB2 in zellspezifischer Weise exprimiert und reguliert wird, ist es denkbar, dass HCRT-Neuronen in diesem Kontext anders reagieren. Das Verhalten von TRIB2 in HCRT-Neuronen wurde bisher noch nicht näher untersucht. Allerdings wäre TRIB2 als intrazelluläres Antigen nur dann für Antikörper und Effektor-Zellen akzessibel, wenn es auch auf der Zellmembran exponiert würde. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Anwesenheit von anti-TRIB2 und der Untergang von HCRT-Neuronen zwei rein zufällig zusammenfallende Ereignisse mit jeweils individueller Pathogenese darstellen.

Denkbar wäre, dass ein den Untergang der HCRT-Neuronen auslösender Entzündungsprozess gleichzeitig eine Immunantwort gegen TRIB2 in Gang setzt. Auch könnte im Gefolge einer Schädigung von HCRT-Neuronen durch Autoimmunprozesse (z. B. postinfektiös) oder durch andere Noxen (neurotrope Viren, Toxine, degenerative Prozesse) intrazelluläres TRIB2 freigesetzt werden, das dann eine eigene Immunreaktion auslöst oder bei Anwesenheit autoreaktiver Effektorzellen einen Entzündungsprozess unterhält. Ungewiss bleibt vorerst auch die pathophysiologische Bedeutung der bei Mäusen durch intraventrikuläre Applikation von IgG-Fractionen aus anti-TRIB2-positiven Humanseren auslösbaren Nekrosen von HCRT-Neuronen (27). Auch wenn unter solchen experimentellen Bedingungen eine antikörpervermittelte Destruktion der HCRT-Neuronen erfolgte, bleibt es ungewiss, ob auch periphere anti-TRIB2, selbst bei erhöhter Permeabilität der Blut-Hirnschranke, den gleichen Effekt auszulösen vermögen. Die Frage nach der möglichen pathogenen Bedeutung von anti-TRIB2 lässt sich zur Zeit nicht befriedigend beantworten. Anti-TRIB2 sind nicht für die Narkolepsie spezifisch, sie finden sich auch bei Patienten mit autoimmuner Uveitis und bei gesunden Kontrollpersonen (Tabelle 1) und das in Frage stehende Antigen, wird nahezu ubiquitär exprimiert.

Die Auslösung des Autoimmunprozesses im Rahmen eines molekularen Mimikry auf T- und B-Zellebene impliziert, dass autoreaktive CD4⁺ T-Zellen und/oder B-Zellen, welche von APC im Kontext mit DQ0602-Molekülen angebotene kreuzreaktive Epitope (z. B. aus Influenza-Viren [H1N1], *S. pyogenes*, apoptotischen Zellen) erkennen, aktiviert werden und dann eine pathologische Immunreaktion in Gang setzen (Abbildung 2). Die Stimulierung der B-Zellen bedarf dabei der Hilfe aktivierter T-Helfer-Zellen. Ob Narkolepsie-Patienten anti-TRIB2-reaktive CD4⁺ T-Zellen besitzen wurde bisher nicht untersucht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich CD4⁺ T-Zellen von Narkolepsie-Patienten durch Hypocretin-Peptide (HCRT₅₈₋₅₈, HRC₈₇₋₉₉) im Komplex mit DQ0602 stimulieren lassen (10) und dass das Hämagglutinin des H1N1-Virus ein homologes Epitop (pHA₁₂₇₅₋₂₈₇) enthält, das ebenfalls in der Lage war, CD4⁺ T-Zellen von Narkolepsie-Patienten zu stimulieren. Dieses kreuzreaktive Verhalten wäre eine mögliche Erklärung für die Häufung kindlicher Narkolepsien nach der 2009 aufgetretenen H1N1-Pandemie in China (20) und nach der Applikation von H1N1-Adjuvansvakzine in Skandinavien, Frankreich, Irland, England und Dänemark (65).

Ob und wie solche autoreaktiven aktivierten CD4⁺ T-Zellen den selektiven Untergang von HCRT-Neuronen bewerkstelligen ist noch unbekannt. Der Akzess von aktivierten T-Zellen

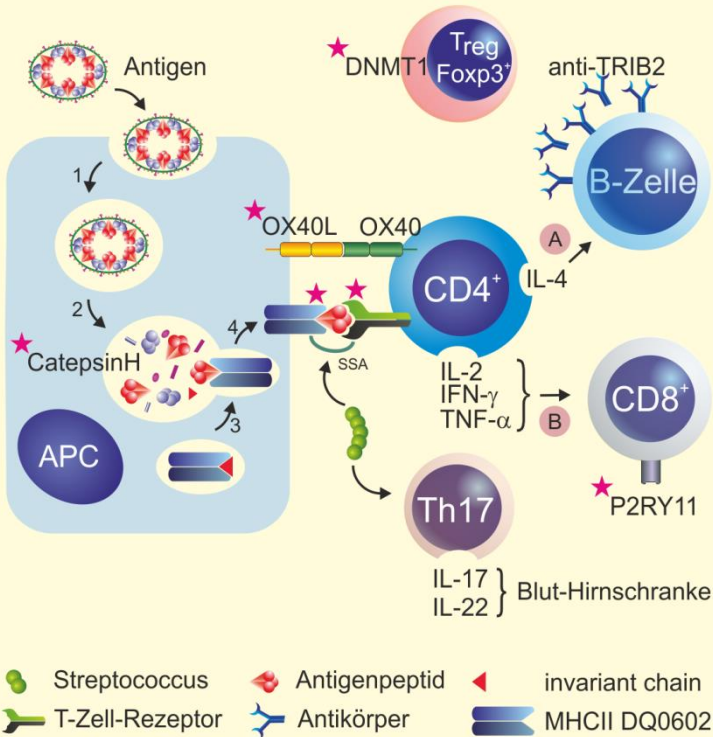


Abbildung 2 Schema der Endozytose und endolysosomalen Hydrolyse von Antigenen durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC) und Präsentation des MHCII-Peptids an eine autoreaktive CD4⁺ T-Helfer-Zelle mit korrespondierendem T-Zellrezeptor. 1 und 2: Endozytose der Antigene und endolysosomale Hydrolyse in Phagolysosomen. 3: MHCII-Protein enthaltender Vesikel verschmilzt mit dem Phagolysosom, die invariant chain wird aus der Peptid-Bindungstasche entfernt und durch ein passendes Antigenpeptid ersetzt. 4: Präsentation des MHCII-Peptidkomplexes auf der Zellmembran und Reaktion mit dem komplementären T-Zell-Rezeptor einer CD4⁺ T-Helfer-Zelle. Anschließend Aufbau des kostimulierenden Ox40-OX40L-Komplexes.

A Von aktivierten CD4⁺ T-Zellen freigesetztes IL-4 kann durch die Stimulierung autoreaktiver B-Zellen eine humorale Immunantwort mit Synthese von Antikörpern z. B. gegen TRIB2 oder gegen andere Selbstantigene auslösen. Denkbar wäre auch eine Aktivierung ruhender autoreaktiver B-Zellen als Folge einer allgemeinen Immunaktivierung (Entzündung) unabhängig von spezifischen Antigenen (bystander activation).

B IL-2, INF- α und TNF- α aus aktivierten CD4⁺ T-Zellen stimulieren autoreaktive CD8⁺ T-Zellen (Th1-Immunantwort) mit zytotoxischer Wirkung gegenüber eigenen, das korrespondierende Antigen exprimierenden, Zellen. Denkbar wäre eine solche Aktivierung auch im Rahmen einer allgemeinen Entzündungssituation (bystander activation).

SSA Epidemiologische Daten sprechen für eine mögliche Assoziationen von Narkolepsie und *S. pyogenes*-Infektionen (1, 33, 40). Streptokokken können Autoimmunprozesse insofern begünstigen, als sie Superantigene (SSA) generieren, die unabhängig von der Antigenespezifität MHC- und TCR-Moleküle vernetzen und dadurch autoreaktive CD4⁺- und/oder CD8⁺ T-Zellen aktivieren.

★ Mit der Narkolepsie assoziierte genetische Polymorphismen

DNMT1 DNA-Methyltransferase 1; **IL** Interleukin; **MHCII** Major Histocompatibility Complex II; **OX40L** (TNFSF4): Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 4 CD252); **P2RY11** Purinergic Receptor P2Y; **Th17** Th17 T-Zelle; **TNF** Tumor-Nekrose-Faktor; **Treg** T-Regulator-Zelle.

und/oder von Antikörpern (anti-TRIBB2) zum Gehirn setzt eine Steigerung der Permeabilität der Blut-Hirnschranke voraus, bei der möglicherweise eine durch Begleitinfektionen (Streptokokken) aktivierte Synthese von IL-17 und IL-22 durch Th17-Zellen behilflich sein könnte (Abbildung 2). In den Hypothalamus eingewanderte aktivierte T-Zellen könnten HCRT-Neuronen-spezifische Antigene erkennen. Es gilt aber zu bedenken, dass diese ihnen nicht von den HCRT-Neuronen selbst, die keine MHCII-Moleküle exprimieren, sondern auf eine andere Weise angeboten werden müssen. Sodann könnten die von den aktivierten, kreuzreaktiven T-Zellen freigesetzten Zytokine und Chemokine sowie aktivierte Makrophagen die Zerstörung von HCRT-Neuronen in Gang setzen. Die hierdurch ausgelöste Freisetzung weiterer Antigene wie z. B. auch von TRIB2 und deren Aufnahme und Verarbeitung durch APC (Mikroglia) könnte den Autoimmunprozess unterhalten. Denkmodelle bisher rein spekulativen Charakters.

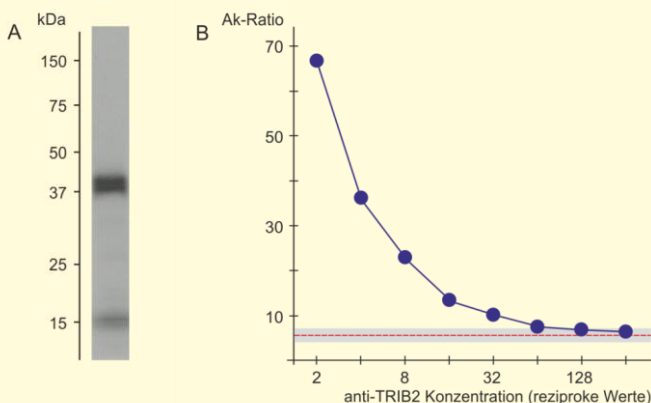


Abbildung 3 Nachweis von Autoantikörpern gegen TRIB2 mittels Radioimmunopräzipitation (Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Leb. Chem. O. Bauer).

A Autoradiogramm eines mittels SDS-PAGE aufgetrennten, *in vitro* transkribierten und translatierten sowie ^{35}S -Methionin markierten vollständigen TRIB2-Proteins (343 Aminosäuren, Mr 38,8 kDa) nach Chromatographie auf Sephadex G25 zur Entfernung nicht eingebauten Methionins. Die für die Synthese als Template dienende cDNA wurde aus einer humanen Cerebellum-cDNA-Bibliothek mit entsprechenden Primern amplifiziert (100 % Übereinstimmung mit der Konsensus-Sequenz; NP_067675.1; Q92519) und in einen modifizierten pCITE-4a-Vektor (Novagen) kloniert. Das radioaktive Antigen ist weitgehend frei von Kontaminationen und besitzt das zu erwartende Molekulargewicht.

B Standardkurve der Radioimmunopräzipitation von ^{35}S -Methionin-TRIB2 mit einem polyvalenten anti-TRIB2-Antikörper vom Kaninchen (TRIB-2 (H-53); Santa Cruz Biotechnology). Die gestrichelte rote Linie entspricht dem Mittelwert von 5 Negativkontrollen, der Graubereich entspricht $\pm 1\text{SD}$. Sie Auswertung der Immunopräzipitation erfolgte nach Frey et al. 1998 (17).

Nachweismethoden

Der Nachweis der Antikörper erfolgte mittels ELISA unter Verwendung eines rekombinanten Glutathion-S-Transferase-Fusionspeptids mit den 28 C-terminalen Aminosäuren der TRIB2-Sequenz (7) sowie mittels Radioimmunopräzipitation von rekombinantem, *in vitro* transkribiertem und translatiertem ^{35}S -Methionin-markiertem (Abbildung 3) vollständigem TRIB2-Protein (28, 66). Die Methode der Radioimmunopräzipitation ist möglicherweise emp-

findlicher als der hier eingesetzte ELISA (höhere Anzahl anti-TRIB2 positiver Patienten [Tabelle 1]), da ein größeres Antigen mit vermutlich mehr immunreaktiven Epitopen und einer natürlichen Konformation eingesetzt wurde.

Literatur

Anklicken der Nummern führt zum Text zurück.

- 1 Aran A, Lin L, Nevsimalova S, Plazzi G, Hong SC, Weiner K, Zeitzer J, Mignot E: Elevated anti-streptococcal antibodies in patients with recent narcolepsy onset. *Sleep* (2009); 32(8): 979 - 983 (PMID: [19725248](#)).
- 2 Black JL 3rd, Krahn LE, Pankratz VS, Silber M: Search for neuron-specific and nonneuron-specific antibodies in narcoleptic patients with and without HLA DQB1*0602. *Sleep* (2002); 25: 719 - 723 (PMID: [12405606](#)).
- 3 Black JL 3rd: Narcolepsy: a review of evidence for autoimmune diathesis. *Int Rev Psychiatry* (2005); 17(6): 461 - 469 (PMID: [16401544](#)).
- 4 Black JL 3rd, Avula RK, Walker DL, Silber MH, Krahn LE, Pankratz VS, Fredrickson PA, Slocumb NL: HLA DQB1*0602 positive narcoleptic subjects with cataplexy have CSF IgG reactive to rat hypothalamic protein extract. *Sleep* (2005a); 28(9): 1.191 - 1.192 (PMID: [16268389](#)).
- 5 Black JL 3rd, Silber MH, Krahn LE, Avula RK, Walker DL, Pankratz VS, Fredrickson PA, Slocumb NL: Studies of humoral immunity to preprohypocretin in human leukocyte antigen DQB1*0602-positive narcoleptic subjects with cataplexy. *Biol Psychiatry* (2005b); 58(6): 504 - 509 (PMID: [16043129](#)).
- 6 Black JL 3rd, Silber MH, Krahn LE, Fredrickson PA, Pankratz VS, Avula R, Walker DL, Slocumb NL: Analysis of hypocretin (orexin) antibodies in patients with narcolepsy. *Sleep* (2005c); 28(4): 427 - 431 (PMID: [16171287](#)).
- 7 Cvetkovic-Lopes V, Bayer L, Dorsaz S, Maret S, Pradervand S, Dauvilliers Y, Lecendreux M, Lammers GJ, Donjacour CE, Du Pasquier RA, Pfister C, Petit B, Hor H, Mühlethaler M, Tafti M: Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. *J Clin Invest* (2010); 120(3): 713 - 719 (PMID: [20160349](#)).
- 8 Dauvilliers Y, Arnulf I, Mignot E: Narcolepsy with cataplexy. *Lancet* (2007); 369(9.560): 499 - 511 (PMID: [17292770](#)).
- 9 Dauvilliers Y, Montplaisir J, Cochen V, Desautels A, Einen M, Lin L, Kawashima M, Bayard S, Monaca C, Tiberge M, Filipini D, Tripathy A, Nguyen BH, Kotagal S, Mignot E: Post-H1N1 narcolepsy-cataplexy. *Sleep* (2010); 33(11): 1.428 - 1.430 (PMID: [21102981](#)).
- 10 De la Herrán-Arita AK, Kornum BR, Mahlios J, Jiang W, Lin L, Hou T, Macaubas C, Einen M, Plazzi G, Crowe C, Newell EW, Davis MM, Mellins ED, Mignot E: CD4⁺ T Cell Autoimmunity to Hypocretin/Orexin and Cross-Reactivity to a 2009 H1N1 Influenza A Epitope in Narcolepsy. *Sci Transl Med* (2013); 5(216): 216ra176 (PMID: [24353159](#)).
- 11 Deloumeau A, Bayard S, Coquerel Q, Déchelotte P, Bole-Feysot C, Carlander B, Cochen De Cock V, Fetissov SO, Dauvilliers Y: Increased immune complexes of hypocretin autoantibodies in narcolepsy. *PLoS One* (2010); 5(10): e13320 (PMID: [20967199](#)).
- 12 Deng J, James CH, Patel L, Smith A, Burnand KG, Rahmoune H, Lamb JR, Davis B: Human tribbles homologue 2 is expressed in unstable regions of carotid plaques and regulates macrophage IL-10 in vitro. *Clin Sci* (2009); 116(3): 241 -248 (PMID: [18643775](#)).
- 13 Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M: TRIB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* (2003); 300(5625): 1.574 - 1.577 (PMID: [12791994](#)).
- 14 Eder K, Guan H, Sung HY, Ward J, Angyal A, Janas M, Sarmay G, Duda E, Turner M, Dower SK, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E: Tribbles-2 is a novel regulator of inflammatory activation of monocytes. *Int Immunol* (2008); 20(12): 1.543 - 1.550 (PMID: [18952906](#)).
- 15 Faraco J, Lin L, Kornum BR, Kenny EE, Trynka G, Einen M, et al.: ImmunoChip study implicates antigen presentation to T cells in narcolepsy. *PLoS Genet* (2013); 9(2): e1003270 (PMID: [23411111](#)).

- 16** Fontana A, Gast H, Reith W, Recher M, Birchler T, Bassetti CL: Narcolepsy: autoimmunity, effector T cell activation due to infection, or T cell independent, major histocompatibility complex class II induced neuronal loss? *Brain* (2010); 133(Pt 5): 1.300 - 1.311 (PMID: [20403960](#)).
- 17** Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D: A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* (1998); 221(1-2): 35 - 41 (PMID: [9894896](#)).
- 18** Grandinetti KB, Stevens TA, Ha S, Salamone RJ, Walker JR, Zhang J, Agarwalla S, Tenen DG, Peters EC, Reddy VA: Overexpression of TRIB2 in human lung cancers contributes to tumorigenesis through downregulation of C/EBP α . *Oncogene* (2011); 30: 3.328 - 3.335 (PMID: [21399661](#)).
- 19** Hallmayer J, Faraco J, Lin L, Hesselson S, Winkelmann J, et al.: Narcolepsy is strongly associated with the T-cell receptor alpha locus. *Nat Genet* (2009); 41(6): 708 - 711 (PMID: [19412176](#)).
- 20** Han F, Lin L, Warby SC, Faraco J, Li J, Dong SX, An P, Zhao L, Wang LH, Li QY, Yan H, Gao ZC, Yuan Y, Strohl KP, Mignot E: Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in China. *Ann Neurol* (2011); 70(3): 410 - 417 (PMID: [21866560](#)).
- 21** Han F, Lin L, Li J, Aran A, Dong SX, An P, Zhao L, Li QY, Yan H, Wang JS, Gao HY, Li M, Gao ZC, Strohl KP, Mignot E: TCRA, P2RY11, and CPT1B/CHKB associations in Chinese narcolepsy. *Sleep Med* (2012); 13(3): 269 - 272 (PMID: [22177342](#)).
- 22** Han F, Faraco J, Dong XS, Ollila HM, Lin L, Li J, An P, Wang S, Jiang KW, Gao ZC, Zhao L, Yan H, Liu YN, Li QH, Zhang XZ, Hu Y, Wang JY, Lu YH, Lu CJ, Zhou W, Hallmayer J, Huang YS, Strohl KP, Pollmächer T, Mignot E: Genome wide analysis of narcolepsy in China implicates novel immune loci and reveals changes in association prior to versus after the 2009 H1N1 influenza pandemic. *PLoS Genet* (2013); 9(10): e1003880 (PMID: [24204295](#)).
- 23** Hannon MM, Lohan F, Erbilgin Y, Sayitoglu M, O'Hagan K, Mills K, Ozbek U, Keeshan K: Elevated TRIB2 with NOTCH1 activation in paediatric/adult T-ALL. *Br J Haematol* (2012); 158(5): 626 - 634 (PMID: [22775572](#)).
- 24** Jackson MW, Reed JH, Smith AJ, Gordon TP: An autoantibody in narcolepsy disrupts colonic migrating motor complexes. *J Neurosci* (2008); 28(49): 13.303 - 13.309 (PMID: [19052222](#)).
- 25** Josefowicz SZ, Wilson CB, Rudensky AY: Cutting edge: TCR stimulation is sufficient for induction of Foxp3 expression in the absence of DNA methyltransferase 1. *J Immunol* (2009); 182(11): 6.648 - 6.652 (PMID: [19454658](#)).
- 26** Kadotani H, Faraco J, Mignot E: Genetic studies in the sleep disorder narcolepsy. *Genome Res* (1998); 8(5): 427 - 434 (PMID: [9582188](#)).
- 27** Katzav A, Arango MT, Kivity S, Tanaka S, Givaty G, Agmon-Levin N, Honda M, Anaya JM, Chapman J, Shoenfeld Y: Passive transfer of narcolepsy: anti-TRIB2 autoantibody positive patient IgG causes hypothalamic orexin neuron loss and sleep attacks in mice. *J Autoimmun* (2013); 45: 24 - 30 (PMID: [23834844](#)).
- 28** Kawashima M, Lin L, Tanaka S, Jennum P, Knudsen S, Nevsimalova S, Plazzi G, Mignot E: Anti-Tribbles homolog 2 (TRIB2) autoantibodies in narcolepsy are associated with recent onset of cataplexy. *Sleep* (2010); 33(7): 869 - 874 (PMID: [20614846](#)).
- 29** Keeshan K, He Y, Wouters BJ, Shestova O, Xu L, Sai H, Rodriguez CG, Maillard I, Tobias JW, Valk P, Carroll M, Aster JC, Delwel R, Pear WS: Tribbles homolog 2 inactivates C/EBP α and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell* (2006); 10(5): 401 - 411 (PMID: [17097562](#)).
- 30** Keeshan K, Bailis W, Dedhia PH, Vega ME, Shestova O, Xu L, Toscano K, Uljon SN, Blacklow SC, Pear WS: Transformation by Tribbles homolog 2 (Trib2) requires both the Trib2 kinase domain and COP1 binding. *Blood* (2010); 116(23): 4.948 - 4.957 (PMID: [20805362](#)).
- 31** Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill LA, Qvarnstrom EE, Dower SK: Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* (2004); 279(41): 42.703 - 42.708 (PMID: [15299019](#)).
- 32** Knudsen S, Mikkelsen JD, Jennum P: Antibodies in narcolepsy-cataplexy patient serum bind to

- rat hypocretin neurons. *Neuroreport* (2007); 18(1): 77 - 79 (PMID: [17259865](#)).
- 33** Koepsell TD, Longstreth WT, Ton TGN: Medical exposures in youth and the frequency of narcolepsy with cataplexy: a population-based case-control study in genetically predisposed people. *Journal of Sleep Research* (2010); 19: 80 - 86 (PMID: [19732319](#)).
- 34** Kornum BR, Faraco J, Mignot E: Narcolepsy with hypocretin/orexin deficiency, infections and autoimmunity of the brain. *Curr Opin Neurobiol* (2011a); 21(6): 897 - 903 (PMID: [21963829](#)).
- 35** Kornum BR, Kawashima M, Faraco J, Lin L, Rico TJ, Hesselson S, et al.: Common variants in P2RY11 are associated with narcolepsy. *Nat Genet* (2011b); 43(1): 66 - 71 (PMID: [21170044](#)).
- 36** Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, et al.: Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* (2007); 445(7.124): 168 - 176 (PMID: [17151600](#)). siehe auch: <http://www.brain-map.org>
- 37** Liang KL, Rishi L, Keeshan K: Tribbles in acute leukemia. *Blood* (2013); 121(21): 4.265 - 4.270 (PMID: [23550039](#)).
- 38** Lin KR, Lee SF, Hung CM, Li CL, Yang-Yen HF, Yen JJ: Survival factor withdrawal-induced apoptosis of TF-1 cells involves a TRB2-Mcl-1 axis-dependent pathway. *J Biol Chem* (2007); 282(30): 21.962 - 21.972 (PMID: [17545167](#)).
- 39** Lohan F, Keeshan K: The functionally diverse roles of tribbles. *Biochem Soc Trans* (2013); 41(4): 1.096 - 1.100 (PMID: [23863185](#)).
- 40** Longstreth WT Jr, Koepsell TD, Ton TG, Hendrickson AF, van Belle G: The epidemiology of narcolepsy. *Sleep* (2007); 30(1): 13 - 26 (PMID: [17310860](#)).
- 41** Mahlios J, De la Herrán-Arita AK, Mignot E: The autoimmune basis of narcolepsy. *Curr Opin Neurobiol* (2013); 23(5): 767 - 773 (PMID: [23725858](#)).
- 42** Mignot E, Lin X, Arrigoni J, Macaubas C, Olive F, Hallmayer J, Underhill P, Guilleminault C, Dement WC, Grumet FC: DQB1*0602 and DQA1*0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in Caucasian and black Americans. *Sleep* (1994); 17(8 Suppl): S60 - S67. (PMID: [7701202](#)).
- 43** Mignot E: Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* (1998); 50(2 Suppl 1): S16 - S22 (PMID: [9484418](#)).
- 44** Mignot E, Lin L, Rogers W, Honda Y, Qiu X, Lin X, Okun M, Hohjoh H, Miki T, Hsu S, Leffell M, Grumet F, Fernandez-Vina M, Honda M, Risch N: Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* (2001); 68(3): 686 - 699 (PMID: [11179016](#)).
- 45** Mignot E, Lammers GJ, Ripley B, Okun M, Nevsimalova S, Overeem S, Vankova J, Black J, Harsh J, Bassetti C, Schrader H, Nishino S: The role of cerebrospinal fluid hypocretin measurement in the diagnosis of narcolepsy and other hypersomnias. *Arch Neurol* (2002); 59(10): 1.553 - 1.562 (PMID: [12374492](#)).
- 46** Naiki T, Saijou E, Miyaoka Y, Sekine K, Miyajima A: TRB2, a mouse Tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting AKT and C/EBP β . *J Biol Chem*(2007); 282(33): 24.075 - 24.082 (PMID: [17576771](#)).
- 47** Nakayama K, Ogawa A, Miyashita H, Tabara Y, Igase M, Kohara K, Miki T, Kagawa Y, Yanagisawa Y, Katashima M, Onda T, Okada K, Fukushima S, Iwamoto S: Positive natural selection of TRIB2, a novel gene that influences visceral fat accumulation, in East Asia. *Hum Genet* (2013); 132(2): 201 - 217 (PMID: [23108367](#)).
- 48** Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E: Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* (2000); 355(9.197): 39 - 40 (PMID: [10615891](#)).
- 49** Nishino S, Kanbayashi T, Fujiki N, Uchino M, Ripley B, Watanabe M, Lammers GJ, Ishiguro H, Shoji S, Nishida Y, Overeem S, Toyoshima I, Yoshida Y, Shimizu T, Taheri S, Mignot E: CSF hypocretin levels in Guillain-Barré syndrome and other inflammatory neuropathies. *Neurology* (2003); 61(6): 823 - 825 (PMID: [14504329](#)).

- 50** Overeem S, Geleijns K, Garssen MP, Jacobs BC, van Doorn PA, Lammers GJ: Screening for anti-ganglioside antibodies in hypocretin-deficient human narcolepsy. *Neurosci Lett* (2003); 341(1): 13 - 16 (PMID: [12676332](#)).
- 51** Overeem S, Dalmaj J, Bataller L, Nishino S, Mignot E, Verschuuren J, Lammers GJ: Hypocretin-1 CSF levels in anti-Ma2 associated encephalitis. *Neurology* (2004); 62(1): 138 - 140 (PMID: [14718718](#)).
- 52** Overeem S, Verschuuren JJ, Fronczek R, Schreurs L, den Hertog H, Hegeman-Kleinn IM, van Duinen SG, Unmehopa UA, Swaab DF, Lammers GJ: Immunohistochemical screening for auto-antibodies against lateral hypothalamic neurons in human narcolepsy. *J Neuroimmunol* (2006); 174(1-2): 187 - 191 (PMID: [16563524](#)).
- 53** Overeem S, Black JL 3rd, Lammers GJ: Narcolepsy: immunological aspects. *Sleep Med Rev* (2008); 12(2): 95 - 107 (PMID: [18291691](#)).
- 54** Paz-Priel I, Friedman A: C/EBP α dysregulation in AML and ALL. *Crit Rev Oncog* (2011); 16(1-2): 93 - 102 (PMID: [22150310](#)).
- 55** Qiao Y, Zhang Y, Wang J: Ubiquitin E3 ligase SCF(β -TRCP) regulates TRIB2 stability in liver cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2013); 441(3): 555 - 559 (PMID: [24211582](#)).
- 56** Ripley B, Overeem S, Fujiki N, Nevsimalova S, Uchino M, Yesavage J, Di Monte D, Dohi K, Melberg A, Lammers GJ, Nishida Y, Roelandse FW, Hungs M, Mignot E, Nishino S: CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology* (2001); 57(12): 2.253 - 2.258 (PMID: [11756606](#)).
- 57** Rubin RL, Hajdukovich RM, Mitler MM. HLA-DR2 association with excessive somnolence in narcolepsy does not generalize to sleep apnea and is not accompanied by systemic autoimmune abnormalities. *Clin Immunol Immunopathol* (1988); 49: 149 - 158 (PMID: [3261667](#)).
- 58** Singh AK, Mahlios J, Mignot E: Genetic association, seasonal infections and autoimmune basis of narcolepsy. *J Autoimmun* (2013); 43: 26 - 31 (PMID: [23497937](#)).
- 59** Smith AJ, Jackson MW, Neufing P, McEvoy RD, Gordon TP: A functional autoantibody in narcolepsy. *Lancet* (2004); 364 (9.451): 2.122 - 2.124 (PMID: [15589310](#)).
- 60** Sung HY, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E: Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunol Lett* (2006); 104(1-2): 171 - 177 (PMID: [16364454](#)).
- 61** Taheri S, Krempetz M, Jackson M, et al. Investigation of the autoimmune basis of narcolepsy using western blot analysis of lateral hypothalamus protein extract with serum and cerebrospinal fluid (abstract). *Sleep* (2003); 26: A285.
- 62** Takasato M, Kobayashi C, Okabayashi K, Kiyonari H, Oshima N, Asashima M, Nishinakamura R: Trb2, a mouse homolog of tribbles, is dispensable for kidney and mouse development. *Biochem Biophys Res Commun* (2008); 373(4): 648 - 652 (PMID: [18593568](#)).
- 63** Tanaka S, Honda Y, Inoue Y, Honda M: Detection of autoantibodies against hypocretin, hcrt1, and hcrt2 in narcolepsy: anti-Hcrt system antibody in narcolepsy. *Sleep* (2006); 29(5): 633 - 638 (PMID: [16774153](#)).
- 64** Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM: Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* (2000); 27(3): 469 - 474 (PMID: [11055430](#)).
- 65** Thebault S, Vincent A, Gringras P: Narcolepsy and H1N1 vaccination: a link? *Curr Opin Pulm Med* (2013); 19(6): 587 - 593 (PMID: [24048081](#)).
- 66** Toyoda H, Tanaka S, Miyagawa T, Honda Y, Tokunaga K, Honda M: Anti-Tribbles homolog 2 autoantibodies in Japanese patients with narcolepsy. *Sleep* (2010); 33(7): 875 - 878 (PMID: [20614847](#)).
- 67** Tsujino N, Sakurai T: Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev* (2009); 61(2): 162 - 176 (PMID: [19549926](#)).

- 68** Wei SC, Rosenberg IM, Cao Z, Huett AS, Xavier RJ, Podolsky DK: Tribbles 2 (Trib2) is a novel regulator of toll-like receptor 5 signaling. *Inflamm Bowel Dis* (2012); 18(5): 877 - 888 (PMID: [22271508](#)).
- 69** Wing YK, Chen L, Lam SP, Li AM, Tang NL, Ng MH, Cheng SH, Ho CK, Mok V, Leung HW, Lau A, Chan MH, Chan HS, Chan PS: Familial aggregation of narcolepsy. *Sleep* (2011); 12(10): 947 - 951 (PMID: [22036600](#)).
- 70** Winkelmann J, Lin L, Schormair B, Kornum BR, Faraco J, Plazzi G, Melberg A, Cornelio F, Urban AE, Pizza F, Poli F, Grubert F, Wieland T, Graf E, Hallmayer J, Strom TM, Mignot E: Mutations in DNMT1 cause autosomal dominant cerebellar ataxia, deafness and narcolepsy. *Hum Mol Genet* (2012); 21(10): 2.205 - 2.210 (PMID: [22328086](#)).
- 71** Xin JX, Yue Z, Zhang S, Jiang ZH, Wang PY, Li YJ, Pang M, Xie SY: miR-99 inhibits cervical carcinoma cell proliferation by targeting TRIB2. *Oncol Lett* (2013); 6(4): 1.025 - 1.030 (PMID: [24137458](#)).
- 72** Yokoyama T, Nakamura T: Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci* (2011); 102(6): 1.115 - 1.122 (PMID: [21338441](#)).
- 73** Zhang Y, Davis JL, Li W: Identification of tribbles homolog 2 as an autoantigen in autoimmune uveitis by phage display. *Mol Immunol* (2005); 42(11): 1.275 - 1.281 (PMID: [15950723](#)).