

Aus der Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie der
Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

&

Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen –
Helmholtzgemeinschaft

DISSERTATION

**Zellbasierte Testverfahren zur Untersuchung von
NMDA-Rezeptor-Antikörpern**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas Leubner
aus Bad Muskau

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---|--|----|
| 1 | Abstract | 2 |
| 2 | Eidesstattliche Versicherung einschließlich Anteilserklärung | 5 |
| 3 | Auszug aus der Journal Summary List | 7 |
| 4 | Ausgewählte Publikation als Promotionsleistung | 8 |
| 5 | Lebenslauf | 16 |
| 6 | Komplette Publikationsliste | 18 |
| 7 | Danksagung | 19 |

1 Abstract

Zellbasierte Testverfahren zur Untersuchung von NMDA-Rezeptor-Antikörpern

Die Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR)-Encephalitis wurde 2007 erstmals beschrieben und ist eine der häufigsten Ursachen für eine Encephalitis. Im Unterschied zu anderen Formen autoimmuner Encephalitiden folgt die Anti-NMDAR-Encephalitis häufig einem rasanten und schweren Verlauf einhergehend mit Bewusstseinsintrübung, epileptischen Anfällen, autonomer Dysregulation und Hypopnoe bis hin zu Intensivpflichtigkeit mit teils tödlichem Ausgang. Die Diagnostik erfolgt bei typischer Klinik durch den spezifischen Nachweis der pathogenen Antikörper aus Liquor oder Serum gegen den NMDA-Rezeptor. Eine Vorhersage der Krankheitsschwere ist derzeit nicht möglich, wäre aber für die frühzeitige und angemessene Behandlung sehr hilfreich.

Eine denkbare Rolle für die Prognose könnte die Affinität der NMDAR-Antikörper spielen. Daher entwickelten wir zellbasierte Testverfahren, mit denen sich geringe Antikörpertiter mit hoher Sensitivität nachweisen lassen und ein Vergleich der Bindungsaffinitäten von NMDAR-Antikörpern unterschiedlicher Patienten in Folgeuntersuchungen möglich ist.

Zu diesem Zweck wurde die cDNA der NR1-Untereinheit des humanen NMDA-Rezeptors mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, in verschiedene Vektoren kloniert und aus *Escheria coli* aufgereinigt. Im Folgenden wurden transient transfizierte, und stabile NMDAR-exprimierende HEK-Zelllinien entwickelt. Hiermit konnten in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung humane NMDAR-Antikörper aus Liquor und Serum von Patienten in deutlich niedrigerer Konzentration als mit kommerziell verfügbaren Assays nachgewiesen werden. Eine Verwendung der transfizierten HEK-Zellen in der Durchflusszytometrie ermöglichte eine exakte Quantifizierung der Antikörpertiter, welches zur Prüfung des Behandlungserfolges genutzt werden könnte und somit zur Verlaufskontrolle geeignet wäre.

Weiterhin koppelten wir Liquorantikörper von Patienten mit dem Fluorochrom Alexa 594. Dies ermöglichte humane NMDAR-Antikörper auch ohne Zweitantikörper nachzuweisen. Weiterhin konnten mit diesem Verfahren erstmals nicht-humane NMDAR-Liquorantikörper detektiert werden. Die post mortem Liquoranalyse eines jungen Eisbären (*Ursus maritimus*) erbrachte den

Nachweis von hochtitrigen Antikörpern gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Diese Antikörper zeigten in der Immunhistochemie ein typisches neuropiles Verteilungsmuster in Hippocampus und Kleinhirn, wie es bei menschlichen Patienten mit Anti-NMDAR-Encephalitis typisch ist. In Übereinstimmung mit der Klinik, insbesondere epileptischen Anfällen, und dem histopathologischen Nachweis einer floriden Encephalitis mit Plasmazellinfiltration lässt dies darauf schließen, dass dieser Eisbär an einer Anti-NMDAR-Encephalitis gestorben ist. Dies ist weltweit der erste dokumentierte nicht-menschliche Fall und legt nahe, dass auch andere Säugetiere von dieser behandelbaren Erkrankung betroffen sein könnten. Autoimmunität gegen neuropile Strukturen könnte somit ein neuer spezies-übergreifender und damit grundlegender Pathomechanismus bei Säugetieren sein.

Cell-based assay to detect NMDA receptor antibodies

Discovered in 2007, anti-N-Methyl-D-Aspartat receptor (NMDAR) encephalitis is one of the most commonly identified causes for encephalitis. The disease often runs a severe and rapid course showing reduced state of consciousness, epileptic seizures, autonomic dysregulation and hypopnea leading to intensive care unit treatment and even death. Clinical diagnosis is made by detection of pathogenic NMDAR antibodies from a patient's cerebrospinal fluid (CSF) or serum. Little is known about prognosis factors for the disease severity, but would be helpful for providing early and appropriate treatment.

We suppose the affinity of NMDAR antibodies might be an important predicting factor. We developed highly sensitive methods to detect low concentrations of NMDAR antibodies, which can be used to analyze antibody affinity of different patients in future.

Therefore, cDNA of the NR1 subunit of the NMDA receptors was amplified by polymerase chain reaction, cloned into different vectors and purified from *Escheria coli* for transient and stable transfection. Immunofluorescence staining on transfected HEK-cells detected lower concentrations of human NMDAR antibodies than commercial assays and flow cytometry showed exact quantification of the antibody titer, which can be used to monitor clinical progress and evaluate therapeutic success in follow-up examinations.

Further CSF was conjugated with Alexa Fluor 594 to detect human and non-human NMDA receptor antibodies without secondary antibodies. The post mortem CSF analysis of a young polar bear (*Ursus maritimus*) suffering epileptic seizures showed strong binding to HEK cells expressing NMDA receptors. Tissue immunohistochemistry exploration demonstrated a typical neuropil signal in hippocampus and cerebellum as in human patients with NMDAR encephalitis and histopathological examination showed an encephalitis with infiltration of plasma cells. We conclude, death was caused by NMDAR encephalitis. This is the first reported non-human case and suggests, that other mammals might suffer from this treatable disease. Autoimmune response against neuropil structures might be a basic pathomechanism across mammal species.

2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jonas Leubner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zellbasierte Testverfahren zur Untersuchung von NMDA-Rezeptor-Antikörpern“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

01.11.2016

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

„Anti-NMDA Receptor Encephalitis in the Polar Bear (*Ursus maritimus*) Knut“,

H. Prüss*, J. Leubner*, N. K. Wenke, G. Á. Czirjáky, C. A. Szentiks & A. D. Greenwood;
Scientific Reports 2015 (Impact factor 5,2)

*contributed equally

Amplifikation von cDNA der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors

Vektor- und Primerdesign, Amplifikation durch Polymerase-Kettenreaktion, Gelelektrophorese, Klonierung in unterschiedliche Vektoren: pBudCE4.1, pEYFP und pFUSE (Verdau, Ligation, Aufreinigung), Klonierung mithilfe von TOP10 E.coli. Aufreinigung der cDNA mit Maxi-/Miniprep.

NMDAR-Expression in HEK-Zellen durch Transfektion mithilfe von Polyethylenimin

Kultivierung von HEK-Zellen, Etablierung effizienter Transfektionsbedingungen: Variation Verhältnis cDNA : Polyethylenimin (PEI), Zelldichte, Zellkulturmedien und Temperatur; Herstellung von transient transfizierten und stabilen NMDAR-exprimierenden Zelllinien.

Immunfluoreszenzfärbung auf transfizierten HEK-Zellen zum Nachweis von NMDAR-Antikörpern

Kultivierung von NMDAR-exprimierenden Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen. Verbesserung der Zellfixierung. Etablierung der Zellfärbung durch indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von NMDAR-Antikörpern aus Liquor und Serum.

Immunfluoreszenzfärbung mit Fluorochrom-konjugierten Erstantikörpern

Inkubation von Liquor und N-Hydroxysuccinimid-ester von Alexa Fluor 594 (Life Technologies), Aufreinigung, Etablierung der direkten Immunfluoreszenzfärbung auf transfizierten HEK-Zellen zum Nachweis von NMDAR-Antikörpern aus Patienten- und Eisbärliquor.

01.11.2016

Unterschrift

3 Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Rank in Category: Scientific Reports

Journal Ranking

For **2015**, the journal **Scientific Reports** has an Impact Factor of **5.228**.

This table shows the ranking of this journal in its subject categories based on Impact Factor.

| Category Name | Total Journals in Category | Journal Rank in Category | Quartile in Category |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|
| MULTIDISCIPLINARY SCIENCES | 63 | 7 | Q1 |

Journal Summary List: Journals 1 - 8 (of 63)

| Rank | Abbreviated Journal Title | ISSN | JCR Data | | | | <i>Eigenfactor</i> [®] Metrics |
|------|---------------------------|------------------|--------------|---------------|----------------------|--------------|---|
| | | | Total Cites | Impact Factor | 5-Year Impact Factor | Articles | <i>Eigenfactor</i> [®] Score |
| 1 | NATURE | 0028-0836 | 627846 | 38.138 | 41.458 | 897 | 1.44256 |
| 2 | SCIENCE | 0036-8075 | 568210 | 34.661 | 34.921 | 828 | 1.15367 |
| 3 | NAT COMMUN | 2041-1723 | 75139 | 11.329 | 12.001 | 3192 | 0.47684 |
| 4 | P NATL ACAD SCI USA | 0027-8424 | 593284 | 9.423 | 10.285 | 3281 | 1.32197 |
| 5 | NATL SCI REV | 2095-5138 | 239 | 8.000 | 8.000 | 25 | 0.00142 |
| 6 | GIGASCIENCE | 2047-217X | 636 | 7.463 | 11.660 | 54 | 0.00431 |
| 7 | SCI REP-UK | 2045-2322 | 46918 | 5.228 | 5.525 | 10642 | 0.20894 |
| 8 | ANN NY ACAD SCI | 0077-8923 | 44076 | 4.518 | 4.416 | 295 | 0.05264 |

4 Ausgewählte Publikation als Promotionsleistung

„Anti-NMDA Receptor Encephalitis in the Polar Bear (*Ursus maritimus*) Knut“,
H. Prüss*, J. Leubner*, N. K. Wenke, G. Á. Cziráky, C. A. Szentiks & A. D. Greenwood;
Scientific Reports 2015 (Impact factor 5,2)

* contributed equally

<http://dx.doi.org/10.1038/srep12805>

5 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

6 Komplette Publikationsliste

„Human monoclonal NMDA receptor antibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis“

J. Kreye, N. K. Wenke, M. Chayka, J. Leubner, R. Murugan, N. Maier, B. Jurek, L. Ly, D. Lüdecke, B. Rost, A. Stumpf, H. Radbruch, A. Hauser, F. Pache, A. Meisel, L. Harms, F. Paul, U. Dirnagl, C. Garner, D. Schmitz, H. Wardemann, H. Prüss;
Brain 2016 (Impact factor 10,1)

„Transient spurious intrathecal immunoglobulin synthesis in neurological patients after therapeutic apheresis“

B. Berger, T. Hottenrott, J. Leubner, R. Dersch, S. Rauer, O. Stich, H. Prüss;
BMC Neurology 2015 (Impact factor 2,5)

„Anti-NMDA Receptor Encephalitis in the Polar Bear (*Ursus maritimus*) Knut“

H. Prüss*, J. Leubner*, N. K. Wenke, G. Á. Czirjány, C. A. Szentiks & A. D. Greenwood;
Scientific Reports 2015 (Impact factor 5,2)

* contributed equally

„Sexual Well-Being in Adult Male Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia“

B. Dudzińska, J. Leubner, M. Venz, M. Quinkler;
International Journal of Endocrinology 2014 (Impact factor 1,9)

7 Danksagung

„Ich bin dankbar, nicht weil es vorteilhaft ist, sondern weil es Freude macht.“

Lucius Annaeus Seneca

Ich danke allen, die mich während der Promotion großzügig unterstützt haben – sei es durch gute Ideen, gute Laune, ein offenes Ohr, Gebet oder finanzielle Unterstützung.

In diesem Sinne danke ich meinen Eltern, meiner Freundin Laura, meinem Doktorvater PD Dr. med. Harald Prüß, meinem Studienkameraden Jakob Kreye, meiner Arbeitsgruppe (insbesondere M.Sc. Betty Jurek und M.Sc. Nina Wenke), Felix Zimmermann und M.Sc. Konstantin Böttger.

Es war eine sehr bereichernde, arbeitswütige und lustige Zeit. Vielen Dank!