

Aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Prävalenz von Autoantikörpern gegen Synapsin in Patienten mit
psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Robert Mertens
aus Berlin

Datum der Promotion: 06. März 2020

Inhaltsverzeichnis

1. Abstract (Deutsch).....	3
2. Abstract (Englisch)	5
3. Eidesstattliche Versicherung	7
4. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	8
5. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM)	10
6. Original-Publikation	11
7. Lebenslauf	22
8. Publikationsliste	24
9. Danksagung	25

1. Abstract (Deutsch)

Ziel: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Prävalenz von Autoantikörpern gegen das präsynaptische Protein Synapsin in Patienten mit verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen zu untersuchen und klinische Merkmale dieser Patienten zu charakterisieren.

Methodik: Für das erste Screening von 375 Blutseren von Patienten mit verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen sowie 97 Kontrollseren von gesunden Personen auf IgG-Autoantikörper gegen Synapsin wurden zellbasierte Assays verwendet. Dabei wurden HEK293-Zellen mittels Transfektion zur Expression von Ratten-Synapsin Ia angeregt, an welches Autoantikörper binden konnten. Nach Inkubation der Zellen mit den Blutseren bei einer Verdünnung von 1:320 wurden gebundene Antikörper mittels fluoreszierender anti-human-IgG-Sekundärantikörper visualisiert. Das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen Synapsin in initial als positiv getesteten Seren wurde mittels Western Blot überprüft. Für den Western Blot wurde Gehirngewebe von Wildtypmäusen und Synapsin-Knockout-Mäusen verwendet. Weiterhin wurden positive Seren mittels fixierter und permeabilisierter Hippocampusneuronenkulturen und zellbasierter Essays, in welchen HEK293-Zellen mittels Transfektion zur Expression von humanem Synapsin Ia und Ib angeregt wurden, verifiziert.

Ergebnisse: In 23 (6,1%) von 375 Patientenseren konnten IgG-Autoantikörper gegen mit Ratten-Synapsin transfizierte Zellen identifiziert werden. In keinem der 97 Kontrollseren wurden entsprechende IgG-Antikörper gefunden ($p = 0,007$). Der mediane Titer betrug 1:1000 bei einem Gesamtbereich von 1:320-1:100.000. Zwölf dieser 23 als positiv befundenen Seren reagierten im Western Blot des Gehirngewebes von Wildtypmäusen mit einem Protein des Molekulargewichts von Synapsin, nicht aber im Western Blot des Gehirngewebes von Synapsin-Knockout-Mäusen. Weiterhin wurden von den 23 positiven Seren 19 in weiteren Experimenten überprüft, wobei 13 Seren IgG-Autoantikörper gegen humanes Synapsin Ia und 16 gegen humanes Synapsin Ib in transfizierten HEK293-Zellen aufwiesen. Auch in Hippocampusneuronenkulturen konnte besagte Reaktivität nachgewiesen werden. Die als positiv befundenen Patienten wiesen verschiedene neurologische und

psychiatrische Erkrankungen auf, insbesondere bipolar affektive Störung, Depression, Alkoholabhängigkeit und klinisch isolierte Syndrome (CIS).

Schlussfolgerung: Nach der Identifizierung von intrathekal produzierten Autoantikörpern gegen das präsynaptische Protein Synapsin in einem an limbischer Enzephalitis erkrankten Indexpatienten¹ konnte durch die hier vorgestellte Arbeit nachgewiesen werden, dass Autoantikörper gegen Synapsin auch in weiteren Patienten mit neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen zu finden sind und es sich somit nicht um einen Einzelfall handelte. Die Charakterisierung einer möglichen pathophysiologischen Rolle dieser Autoantikörper bedarf weiterer Forschung.

¹ Piepgras, J., Höltje, M., Otto, C., Harms, H., Satapathy, A., Cesca, F., Benfenati, F., Gitler, D., Pich, A., Zander, J.F., Ahnert-Hilger, G., Ruprecht, K., 2015. Intrathecal immunoglobulin A and G antibodies to synapsin in a patient with limbic encephalitis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2, e169.

2. Abstract (Englisch)

Objective: To identify the prevalence of autoantibodies to the presynaptic protein synapsin in patients with different neurological and psychiatric disorders and to characterize clinical findings in positive tested patients.

Methods: Blood sera of 375 patients with various neurological and psychiatric disorders and sera of 97 healthy controls were initially screened for IgG autoantibodies to synapsin using cell-based assays. HEK293 cells were stimulated by transfection for the expression of rat synapsin Ia, to which autoantibodies could bind. After incubation of the cells with the blood sera at a dilution of 1:320, bound antibodies were visualized by means of fluorescent anti-human IgG secondary antibodies. The presence of specific antibodies to synapsin in sera initially tested positive was further assessed by Western Blot using brain tissue from wildtype mice and synapsin knockout animals. In addition, positive sera were screened by murine hippocampal neuron cell cultures and cell-based essays in which HEK293 cells were transfected with human synapsin Ia and Ib.

Results: In 23 (6.1%) of 375 patient sera, IgG autoantibodies to rat synapsin transfected cells could be identified. No equivalent IgG antibodies were found in any of the 97 control sera ($p = 0,007$). The median titer was 1:1000 with a range titer of 1:320-1:100.000. Out of these 23 positive sera, twelve sera reacted with a protein of the molecular size of synapsin in the Western Blot of brain tissue from wildtype mice, but not in the Western Blot of brain tissue from synapsin knockout mice. 19 of the 23 positive sera were tested in further experiments, with 13 sera showing IgG autoantibodies to human synapsin Ia and 16 to human synapsin Ib in transfected HEK293 cells. Synapsin antibody positive blood sera stained fixed and permeabilized primary mouse hippocampal neurons. The positive patients had heterogenous neurological and psychiatric disorders, in particular bipolar affective disorders, depression, alcohol dependency and clinically isolated syndrome (CIS).

Conclusions: Following the identification of synapsin as autoantigenic target of intrathecally synthesized antibodies in a patient with a clinical phenotype of limbic

encephalitis¹, the key finding of this large screen of sera was the detection of serum IgG to synapsin I in a number of additional patients with neurological and psychiatric disorders. Therefore, the detection of autoantibodies to synapsin in the index patient did not represent an isolated observation confined to a single case. Further investigation into the potential pathophysiological relevance of these antibodies is required.

¹ Piegras, J., Höltje, M., Otto, C., Harms, H., Satapathy, A., Cesca, F., Benfenati, F., Gitler, D., Pich, A., Zander, J.F., Ahnert-Hilger, G., Ruprecht, K., 2015. Intrathecal immunoglobulin A and G antibodies to synapsin in a patient with limbic encephalitis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2, e169.

3. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Robert Mertens, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Prävalenz von Autoantikörpern gegen Synapsin in Patienten mit psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen“ 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. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

4. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Autoren: Höltje M., Mertens R., Kochova E., Schou M.B., Saether S.G., Prüss H., Jarius S., Paul F., Komorowski L., Probst C., Bellmann-Strobl J., Gitler D., Benfenati F., Piepgras J., Ahnert-Hilger G., Ruprecht K.

Titel: Synapsin-antibodies in psychiatric and neurological disorders: Prevalence and clinical findings

Zeitschrift: Brain, Behaviour and Immunity

Erscheinungsdatum: 18. Juli 2017

Beitrag im Einzelnen:

Es handelt sich um eine geteilte Erstautorenschaft von Herrn PD Dr. Markus Höltje und mir. Das Design der Studie stammt von PD Dr. Markus Höltje, um nach der Erstbeschreibung von Synapsin-Autoantikörpern in dem Indexpatienten die Frage zu klären, ob und mit welcher Prävalenz diese Antikörper in weiteren Patienten mit anderen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen zu finden sind. Die Patientenseren wurden durch Herrn PD Dr. Klemens Ruprecht und Dr. M. Brix Schou sowie Dr. S.G. Saether gewonnen, die Kontrollseren durch Herrn PD Dr. Klemens Ruprecht und mich. Nach der methodischen Einarbeitung durch Johannes Piepgras wurden alle in der Publikation dargestellten Experimente, inklusive aller im Abstract genannten Methoden (Transfektion von HEK-Zellkulturen und Verwenden dieser für Cell-Based-Assays in Abbildung 1 und 3, Western Blot in Abbildung 2, Immunhistochemie von Hippocampusneuronenkulturen in Abbildung 4, Vervielfältigung von Plasmiden mittels Bakterienkulturen), von mir durchgeführt. Aus diesen Experimenten stammen die Rohdaten als Basis für die Publikation. Die Interpretation und Auswertung der Ergebnisse wurden von mir in regelmäßiger Rücksprache mit meinen Betreuern durchgeführt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Herrn PD Dr. Klemens Ruprecht und mich. Die Aufnahmen der Zellen für die Abbildungen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden durch Herrn PD Dr. Markus Höltje und mich durchgeführt, ebenso wie die Erstellung der Grafiken 1, 2, 3 und 4. Ich war an allen Schritten der Konzeption und Erstellung des Manuskripts, der Erstellung der Graphiken und Tabellen, des Reviewprozesses bis hin zur entgeltlichen Publikation des Papers maßgeblich beteiligt.

Datum, Unterschrift und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der
betreuenden Hochschullehrerin

Datum, Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

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

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: "NEUROSCIENCES" Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 258 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	36,952	28.880	0.071380
2	NATURE NEUROSCIENCE	54,399	17.839	0.160740
3	Annual Review of Neuroscience	13,211	15.630	0.020660
4	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	23,273	15.402	0.046360
5	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	8,195	14.200	0.010940
6	NEURON	82,253	14.024	0.227070
7	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,163	13.217	0.018020
8	MOLECULAR PSYCHIATRY	17,452	13.204	0.049670
9	ACTA NEUROPATHOLOGICA	16,462	12.213	0.037060
10	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	41,859	11.412	0.067400
11	TRENDS IN NEUROSCIENCES	19,178	11.124	0.029690
12	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	7,278	10.391	0.008040
13	BRAIN	48,061	10.292	0.077590
14	ANNALS OF NEUROLOGY	34,215	9.890	0.057310
15	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	3,516	9.425	0.006600
16	SLEEP MEDICINE REVIEWS	4,980	8.958	0.009730
17	NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS	20,452	8.299	0.047230
18	NEUROSCIENTIST	4,325	7.391	0.009890
19	Molecular Neurodegeneration	2,946	6.780	0.009540
20	CEREBRAL CORTEX	27,496	6.559	0.063240
21	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	23,920	6.403	0.046670
22	NEUROPSYCHOLOGY REVIEW	2,478	6.352	0.004650
23	GLIA	12,781	6.200	0.021920
24	Alzheimers Research & Therapy	1,699	6.196	0.007180
25	MOLECULAR NEUROBIOLOGY	7,338	6.190	0.017440
26	NEURO SIGNALS	653	6.143	0.000670
27	CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY	13,188	6.133	0.036730
28	Brain Stimulation	3,905	6.078	0.013020
29	JOURNAL OF NEUROSCIENCE	171,800	5.988	0.319910
30	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	10,719	5.964	0.026460
31	NEUROIMAGE	85,630	5.835	0.173210
32	PAIN	35,333	5.445	0.044460
33	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,413	5.347	0.006400
34	NEURAL NETWORKS	8,741	5.287	0.010250
35	BRAIN PATHOLOGY	4,580	5.272	0.008450
36	JOURNAL OF NEUROTRAUMA	12,787	5.190	0.021640
37	Neurotherapeutics	3,451	5.166	0.008220
38	JOURNAL OF PSYCHIATRY & NEUROSCIENCE	2,759	5.165	0.004970
39	NEUROBIOLOGY OF AGING	20,010	5.117	0.046250

1

Selected JCR Year: 2016; Selected Categories: "NEUROSCIENCES"

(Accessed February 21, 2018 at
https://intranet.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/sonstige/medbib/Impact_Faktoren_2016/ISI-WEB-Liste-Kategorie-Neurosciences.pdf)

6. Original-Publikation

Höltje M., Mertens R., Kochova E., Schou M.B., Saether S.G., Prüss H., Jarius S., Paul F., Komorowski L., Probst C., Bellmann-Strobl J., Gitler D., Benfenati F., Piepgras J., Ahnert-Hilger G., Ruprecht K.: **Synapsin-antibodies in psychiatric and neurological disorders: Prevalence and clinical findings**. Brain, Behaviour and Immunity 2017; Jul 18. pii: S0889-1591(17)30218-0.

URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.07.011>

7. Lebenslauf

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

8. Publikationsliste

Höltje M.*, Mertens R.*, Kochova E., Schou M.B., Saether S.G., Prüss H., Jarius S., Paul F., Komorowski L., Probst C., Bellmann-Strobl J., Gitler D., Benfenati F., Piepgras J., Ahnert-Hilger G., Ruprecht K. Synapsin-antibodies in psychiatric and neurological disorders: Prevalence and clinical findings. *Brain, Behaviour and Immunity* 2017; Jul 18. pii: S0889-1591(17)30218-0.

*gleichberechtigte Erstautorenschaft

9. Danksagung

Ich danke meinem Erstbetreuer, Herrn PD Dr. Markus Höltje, und meinem Zweitbetreuer, Herrn PD Dr. Klemens Ruprecht, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die ausgezeichnete Betreuung und die Überlassung des interessanten Themas. Ich fühlte mich stets sehr gut begleitet und bin dankbar, dass meine Doktorarbeit in einer spannenden Publikationspromotion mündete.

Ich danke Johannes Piepgras für die exzellente Einführung in die Welt der Laborarbeit und die Einarbeitung in die Methodik.

Ich danke Frau Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Ahnert-Hilger für interessante und lehrreiche Gespräche und Diskussionen.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team der AG Höltje, insbesondere den Technischen Assistentinnen Antje Dräger, Birgit Metze und Marion Möbes für ihre Ratschläge und Unterstützung während meiner Promotion.

Tief verbunden und dankbar bin ich meiner Freundin, Charlotte Kerber, für ihre hilfreiche Unterstützung und ihr Verständnis bei der Durchführung dieser Doktorarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt allerdings meinen Eltern und den Brüdern, deren uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung diese Promotion und meine bisherige Bildung erst ermöglicht haben.