

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

DISSERTATION

Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor GluN1 Serumantikörper
und klinisches Outcome nach ischämischem Schlaganfall

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Pia Sophie Sperber

aus Melle

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
I. Zusammenfassung	8
1.1. Zusammenfassung auf Deutsch	8
1.2. Abstract in English	9
II. Manteltext	10
2.1. Darstellung des Forschungsstandes	10
2.2.1. Studienpopulation	12
2.2.2. Definitionen der klinischen Outcomes	12
2.2.2.1. Funktionelles Outcome	12
2.2.2.2. Kardiovaskuläres Rezidivrisiko	12
2.2.2.3. Verlauf kognitiver Leistung über drei Jahre	13
2.2.3. Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Messung	13
2.2.4. Komparative statistische Analysen der klinischen Outcomes	14
2.2.4.2. Kardiovaskuläres Rezidivrisiko	15
2.2.4.3. Kognitive Leistungen über Zeit	15
2.2.5. Benutze Software und Programmierungssprachen für die Auswertung	17
2.2.6. Stellungnahme zur Ethik	17
2.3.1. Fallzahlen	18
2.3.2. Die Patientenpopulation	18
2.3.3. Ergebnisse aus Analysen der klinischen Outcomes	18
2.3.3.2. Vaskuläres Rezidivrisiko	22
2.3.3.3. Verlauf kognitiver Leistung über Zeit	23
2.4. Wesentliche neue Erkenntnisse, Limitationen und Perspektiven	28
2.5. Literaturverzeichnis	36

III. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	40
IV. Eidesstattliche Versicherung	42
V. Journal Summary List	44
VI. Publikation	46
VII. Zusatzmaterial	54
VIII. Lebenslauf	64
IX. Publikationsliste	66
X. Danksagung	68

Abkürzungsverzeichnis

95%CI	95%iges Konfidenzintervall
ADS	Allgemeine Depressionsskala
HR	Hazard Ratio
Ig	Immunglobulin
IQR	Interquartilbereich
MMST	Mini-Mental-Status-Test
mRS	modified Rankin Scale
MRT	Magnetresonanztomografie
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR1-Aks	Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper
OR	Odds Ratio
PROSCIS-B	PROSpective Cohort with Incident Stroke – Berlin
SD	Standardabweichung
TICS-m	Telephone Interview for Cognitive Status – modified
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1a. Flussdiagramm zum PROSCIS-B Patienten Ein- und Ausschluss
- Abbildung 1b. Flussdiagramm zur Übersicht der TICS-m Erhebungen und der Todesfälle jeweils für die drei Nachbeobachtungszeitpunkte
- Abbildung 2. Ereigniszeitfunktionen des Kaplan-Meier-Schätzer aus PROSCIS-B
- Abbildung 3a. Summenwerte des Telephone Interview for Cognitive Status – modified der PROSCIS-B Kohorte über drei Jahre stratifiziert nach NMDAR1-Aks Serostatus
- Abbildung 3b. Summenwerte des Telephone Interview for Cognitive Status – modified der PROSCIS-B Kohorte über drei Jahre stratifiziert nach NMDAR1 Aks Serostatus mit seropositiven Untergruppen

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1. Charakteristika der PROSCIS-B Patienten bei Einschluss – Gesamt und stratifiziert nach Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Serum Status
- Tabelle 2. Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Serumprävalenz und funktionelles Outcome ein Jahr nach ischämischem Schlaganfall
- Tabelle 3. Odds Ratios für alle binären Vergleiche bei inkrementierendem Cut-Off über Kategorien der modified Rankin Scale
- Tabelle 4. Odds Ratios für funktionelles Outcome in NMDAR1-Aks seropositiven Patienten stratifiziert nach Immunglobulin Isotyp Serumpräsentation
- Tabelle 5. Inzidenzrate eines Sekundärereignisses und Hazard Ratios für Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Seropositivität im Schlaganfall
- Tabelle 6. Inzidenzrate eines Sekundärereignisses und Hazard Ratios für Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Seropositivität im Schlaganfall mit Antikörperstatus stratifiziert nach Immunglobulin Isotyp
- Tabelle 7a. Effekte von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper Seropositivität auf TICS-m über drei Jahre nach Schlaganfall aus gemischten Modellen
- Tabelle 7b. Effektstärken und Varianzen resultierend aus gemischten Modellen zur Untersuchung von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper Seropositivität auf TICS-m über Zeit
- Tabelle 8. Einschlusscharakteristika stratifiziert nach Patienten ohne jegliche TICS-m Messung und mindestens einer TICS-m Messung
- Tabelle 9. Effekte von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper Seropositivität auf TICS-m über drei Jahre nach Schlaganfall aus gemischten Modellen nach Anwendung der Multiple-Imputation-Methode auf Fehlwerte
- Tabelle 10. Anzahl der Patienten aus PROSCIS-B mit einem ADS-Wert ≥ 16
- Tabelle 11. Effekte von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper Seropositivität auf TICS-m über drei Jahre nach Schlaganfall nach Ausschluss potentiell depressiver Patienten in einem Best-Case- und Worst-Case-Szenario

I. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung auf Deutsch

Hintergrund: Serum Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor GluN1 Antikörper (NMDAR1-Aks) wurden bei ~10% der Bevölkerung nachgewiesen. Eine klinische Studie zeigte eine verringerte Infarktvolu-
menexpansion innerhalb von 7 Tagen im MRT bei NMDAR1-Ak seropositiven Schlaganfallpatienten.
Das klinische Outcome NMDAR1-Aks seropositiver Patienten bleibt derweil unklar.

Methoden: Wir rekrutierten Patienten mit erstmaligem Schlaganfall für die PROSpective Cohort
with Incident Stroke–Berlin (PROSCIS-B; NCT01363856) Studie. Serumproben wurden innerhalb
von 7 Tagen nach Einschlussereignis entnommen und NMDAR1-Aks (IgM/IgA/IgG) mit zellbasier-
ten Assays gemessen. Seropositivität definierten wir als Titer $\geq 1:10$, niedrige Titer als $\leq 1:100$ und hohe
Titer als $> 1:100$. Wir berechneten 1.) Odds Ratios (OR) aus partiell proportionalen Odds-Modellen
für funktionelles Outcome, gemessen mit der modified Rankin Scale (mRS) 1 Jahr nach Schlaganfall
2.) kardiovaskuläres Rezidivrisiko definiert als Hazard Ratios (HR) aus Cox-Regressionen für einen
kombinierten Endpunkt (erneuter Schlaganfall/Myokardinfarkt/Tod) bis zu 3 Jahre nach Schlaganfall
3.) β -Effektstärken aus gemischten Modellen für den Verlauf kognitiver Leistung über 3 Jahre, die wir
jährlich mithilfe des Telephone Interview for Cognitive Status–modified (TICS-m) ermittelten. Wir
verglichem seropositive Patienten und anschließend seropositive Subgruppen jeweils mit seronegativen
Patienten in unadjustierten und adjustierten Modellen.

Ergebnisse: Von 621 ischämischen Schlaganfallpatienten (m/w; medianer NIHSS:2; IQR:1 bis 4)
wurden in 583 NMDAR1-Aks gemessen. Von diesen waren 76(13%) seropositiv, 55(9%) mit nied-
rigen und 21(4%) mit hohen Titern. Der mRS unterschied sich nicht zwischen seropositiven und
seronegativen Patienten 1 Jahr nach Schlaganfall ($OR_{\text{Model3}}:1,27$; 95%CI:0,77 bis 2,09). Patienten mit
hohen Titern zeigten verglichen mit Seronegativen ungünstigen mRS ($OR_{\text{Model3}}:3,16$; 95%CI:1,39 bis
7,22). Verglichen mit seronegativen Patienten hatten Seropositive ein erhöhtes kardiovaskuläres Rezi-
divrisiko ($HR_{\text{Model3}}:1,83$; 95%CI:1,10 bis 3,05). Der Verlauf kognitiver Leistung über 3 Jahre war bei
seropositiven und seronegativen Patienten gleichwertig ($\beta_{\text{Model3}}:0,30$; 95%CI:-1,14 bis 1,73). Patienten
mit hohen Titern schienen im Vergleich zu seronegativen Patienten schlechtere kognitive Leistungen
über Zeit zu haben ($\beta_{\text{Model3}}:-2,30$; 95%CI:-4,82 bis 0,21).

Schlussfolgerung: In unserer Patientenkohorte mit erstmaligem mild-bis-moderatem ischämischen
Schlaganfallereignis war NMDAR1-Aks Seropositivität nicht mit funktionellem Outcome und Verlauf
kognitiver Leistung assoziiert, jedoch mit erhöhtem kardiovaskulärem Rezidivrisiko bis zu 3 Jahre.
Patienten mit hohen Titern hatten schlechteres funktionelles Outcome und scheinen im Verlauf
schlechtere kognitive Leistungen zu zeigen. Unsere Ergebnisse suggerieren eine relevante Rolle von
NMDAR1-Aks für schlechtes klinisches Schlaganfall-Outcome, unabhängig von multiplen Störfakto-
ren.

1.2. Abstract in English

Background: Serum anti-N-Methyl-D-Aspartate-receptor GluN1 antibodies (NMDAR1-abs) were observed in ~10% of the population. Seropositivity was associated with smaller infarct lesion growth in MRI within 7 days after ischemic stroke. The clinical outcome of NMDAR1-abs seropositive stroke patients remains unknown.

Methods: We recruited first-ever stroke patients for the PROSpective Cohort with Incident Stroke-Berlin (PROSCIS-B; NCT01363856) study. Blood samples were obtained within 7 days after the index event for NMDAR1-abs (IgM/IgA/IgG) measurement with cell-based assays. Seropositivity was defined as titers $\geq 1:10$, low titers as $\leq 1:100$ and high titers as $> 1:100$. We included patients with mild-to-moderate ischemic stroke events only. We investigated 1.) functional outcome assessed with the modified Rankin Scale (mRS) at 1 year and obtained Odds Ratios (OR) for worse mRS using partial proportional Odds models 2.) vascular recurrent event risk (time to event of either recurrent stroke/myocardial infarction/all-cause mortality) up to 3 years after stroke and 3.) cognitive function over 3 years assessed with an annual Telephone Interview of Cognitive Status – modified (TICS-m) and obtained β effect sizes from linear mixed models. We compared seropositive patients with seronegative patients and subsequently seropositive subgroups with seronegative patients in unadjusted and adjusted analyses.

Results: Out of 621 ischemic stroke patients (m/f, median NIHSS:2; IQR:1 to 4) we measured NMDAR1-abs in 583 patients. Of those, 76(13%) were seropositive, 55(9%) with low titers and 21(4%) with high titers. mRS at 1 year after stroke was not different in seropositive compared to seronegative patients (OR_{Model3} :1.27; 95%CI:0.77 to 2.09). Patients with high titers had worse mRS compared to seronegative patients (OR_{Model3} :-2.91; 95%CI:1.28 to 6.66). Seropositivity was associated with increased recurrent vascular event risk compared to seronegativity (HR_{Model3} :1.83; 95%CI:1.10 to 3.05). Cognitive function over time was similar in seropositive and seronegative patients (β_{Model3} :0.30; 95%CI:-1.14 to 1.73). Patients with high titers seemed to have worse cognitive functioning over time compared to seronegative patients (β_{Model3} :-2.30; 95%CI:-4.82 to 0.21).

Conclusion: In our cohort of first-ever mild-to-moderately affected ischemic stroke patients NMDAR1-abs seropositivity was not associated with functional outcome nor cognitive functioning over time, but was associated with increased vascular recurrent event risk. Patients with high titers had worse functional outcome while cognitive functioning over time seems to be decreased. Our data point towards a relevant role of NMDAR1-abs for unfavorable clinical outcome after stroke, independent of other risk factors.

II. Manteltext

2.1. Darstellung des Forschungsstandes

Schlaganfall ist ein sich schnell entwickelndes und länger als 24 Stunden andauerndes (oder zum Tode führendes) klinisch apparentes zerebral-funktionelles Defizit ausschließlich vaskulärer Ätiologie.¹ Er ist eine häufig auftretende schwere neurologische Erkrankung und ist nach dem Myokardinfarkt die zweithäufigste Todesursache weltweit. 84,4% aller Schlaganfälle sind ischämisch bedingt.² Die therapeutischen Möglichkeiten im akuten ischämischen Schlaganfall sind begrenzt.³ Biomarker haben sich als nützliche prädiktive Marker herausgestellt; sie können außerdem Hinweise auf die zugrunde liegende Pathogenese geben und interventionell modifiziert werden.⁴

N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren sind tetra-heteromere membranständige ionotrope Glutamatrezeptoren, die im ausgesprochenen Maße – jedoch nicht ausschließlich – auf Neuronen des hippocampalen Hirngewebes exprimiert sind. Die Untereinheitskomposition des NMDA-Rezeptors ist variabel, jedoch ist die GluN1 (veraltet auch NR1) Untereinheit für den Aufbau neuronaler NMDA-Rezeptoren obligat.⁵ Ihre Funktionen können vielseitig sein und reichen von neuroprotektiven bis zu zellschädigenden Mechanismen, abhängig von ihrer Lokalisation (synaptisch oder extrasynaptisch) und ihrem Aktivierungsmuster.^{6,7} Im Schlaganfall werden sie für die akut einsetzende Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität verantwortlich gemacht, ein Prozess der zu einem massiven zusätzlichen Gewebsuntergang im Schlaganfall-Sekundärschaden führt.⁸

Tierversuche zeigten vielversprechende therapeutische Effekte beim Einsatz von NMDA-Rezeptor Antagonisten. Interventionsstudien, die diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen wollten, mussten aufgrund unerwünschter Effekte frühzeitig abgebrochen werden.⁹ Erklärungsansätze umfassen die Wahl des antagonisierenden Agens, das schmale therapeutische Zeitfenster und auch die Durchführung der Studien.¹⁰ Eine weitere Erklärung auf pathophysiologischer Ebene könnte sein, dass obgleich NMDA-Rezeptoren Exzitotoxizität in der akuten Phase nach Schlaganfall vermitteln, ihre physiologischen Funktionen wichtig für Regenerationsmechanismen auf lange Sicht sind. Somit könnte eine Blockade neuronaler NMDA-Rezeptoren zu einer behinderten Reorganisation des geschädigten Gehirns nach Schlaganfall führen.¹¹

Über extraneuronale, periphere NMDA-Rezeptoren ist nicht viel bekannt. Hogan-Cann et al. fassen in einem Review zusammen, dass NMDA-Rezeptoren auf einer Vielzahl peripherer Gewebszelltypen außerhalb des zentralen Nervensystems vorkommen und jeweils ebenfalls mit der Untereinheit GluN1 konstituiert sind. Eine Studie von Green et al. zeigte, dass die Aggregation von Thrombozyten durch Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper inhibiert wird.¹² Eine andere Studie zeigte, dass NMDA-Rezeptoren auf zerebralen Endothelzellen exprimiert sind, und legte eine Relevanz dieser für Gefäßadaptionenmechanismen, nahe.¹³ Bis heute fehlt es in diesem Gebiet wesentlich an Grundlagen, daher bleibt die funktionelle Relevanz thrombozytärer und endothelialer NMDA-Rezeptoren und

somit auch ihre Bedeutung im Zusammenhang mit vaskulären Pathologien bis heute unklar.^{14,15}

Endogene Autoantikörper vom Immunglobulin (Ig) Isotyp G, die sich gegen die Untereinheit GluN1 des NMDA-Rezeptors (Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper [NMDAR1-Aks]) richten, wurden erstmalig 2007 im Liquor von Patienten mit autoimmuner Enzephalitis detektiert und als ursächlich für die Pathogenese dieser seltenen schwerwiegenden neuropsychiatrischen Erkrankung befunden.¹⁶ Seither zeigten mehrere Studien eine Serumprävalenz von etwa ~10% von NMDAR1-Aks, vorwiegend der Isotypen IgM und IgA, sowohl in der gesunden Bevölkerung als auch in Patienten mit diversen Erkrankungen, wie zum Beispiel arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus.¹⁷⁻¹⁹ Bisher ist ein klarer Zusammenhang zwischen erhöhtem Alter und Serumprävalenz bekannt,¹⁸ hingegen bleibt die Ursache für Serumprävalenz unklar.

Im Jahre 2000 zeigten Doring et al., dass eine Impfung von Ratten mit NMDAR1-Aks zu verkleinerten Infarkt volumina nach Schlaganfall führte.²⁰ Eine klinische Studie untersuchte 2015, ob die Serumprävalenz endogener NMDAR1-Aks mit positiven Effekten auf Infarktvolumina nach Schlaganfall assoziiert ist. In der Kohorte von 464 ischämischen Schlaganfallpatienten war Seropositivität unter Ausschluss von Patienten mit APOE+ Genotyp mit einer verringerten Infarktvolumenexpansion in der Magnetresonanztomografie (MRT) Bildgebung innerhalb von sieben Tagen assoziiert.²¹ Die hier genannten Studienergebnisse suggerieren positive Effekte von NMDAR1-Aks Seropositivität in der Akutphase des Schlaganfalls. Dem gegenüber steht, dass NMDAR1-Aks Seropositivität in anderen Studien mit kognitiven Beeinträchtigungen assoziiert war.²²⁻²⁴ Die Studienlage zur Funktionalität und somit pathophysiologischen Bedeutung von NMDAR1-Aks des IgM und IgA Isotyps ist kontrovers.^{24,25}

Es bleibt unklar, ob NMDAR1-Aks Seropositivität mit klinischem Outcome nach Schlaganfall assoziiert ist. Daher war es Gegenstand dieser Dissertationsarbeit, das 1.) funktionelle Outcome, das 2.) vaskuläre Rezidivrisiko und den 3.) Verlauf kognitiver Leistung über Zeit von seropositiven Schlaganfallpatienten im Vergleich zu seronegativen Schlaganfallpatienten zu untersuchen.

2.2. Methodik

2.2.1. Studienpopulation

Die PROSpective Cohort with Incident Stroke – Berlin (PROSCIS-B) ist eine longitudinale prospektive Kohortenstudie mit dem Ziel Prädiktionsmodelle für vaskuläres Sekundärrisiko nach Schlaganfall zu explorieren. Für PROSCIS-B wurden männliche sowie weibliche Patienten mit erstmaligem Schlaganfall an drei Stroke-Units der Charité – Universitätsmedizin Berlin rekrutiert und über einen Zeitraum von drei Jahren mit einer jährlichen telefonischen oder – nach Patientenwunsch – postalischen Erhebung klinischer Outcomes nachbeobachtet. Einschlusskriterien waren erstmaliger Schlaganfall nach der WHO Definition, welche zerebrale Ischämien, zerebrale Hämorrhagien und Sinusvenenthrombosen einfasst,²⁶ sowie ein Mindestalter von 18 Jahren und einen Symptomauftritt innerhalb der letzten sieben Tage. Zum Ausschluss aus PROSCIS-B führte ein vorangegangener Schlaganfall. Außerdem wurden Patienten mit Hirntumor oder einer Hirnmetastase eines peripheren Malignoms ausgeschlossen, da dies mit einer stark reduzierten Lebenserwartung einhergeht und es folglich durch Selektionsverzerrung zu einer Fehlschätzung des Sekundärrisikos in der Zielbevölkerung kommen könnte. Für diese Fragestellungen aus PROSCIS-B konzentrierten wir uns auf Patienten mit mildem-bis-mittelschwerem (National Institutes of Health Stroke Scale [NIHSS] 0-15) Schlagfall, um bei nur sechs Patienten mit schweren Ereignissen die Homogenität in der Kohorte zu steigern. Ferner berücksichtigten wir ausschließlich ischämische Schlaganfälle aufgrund der unterschiedlichen zugrunde liegenden Pathologie von primären Hämorrhagien und Sinusvenenthrombosen.

2.2.2. Definitionen der klinischen Outcomes

2.2.2.1. Funktionelles Outcome

Drei klinische Outcomes betrachteten wir als wesentlich im Zusammenhang mit NMDAR1-Aks Seropositivität: Als erstes wählten wir das funktionelle Outcome welches wir telefonisch mit der modified Rankin Scale (mRS) ein Jahr nach dem Einschluss-Schlaganfallereignis erhoben. Die erstmals 1957 von Dr. John Rankin vorgestellte mRS ist eine siebenstufige ordinale Messskala, die für die deutsche Sprache und die telefonische Erhebung validiert ist. Sie ist das am häufigsten gewählte Instrument zur Begutachtung des funktionellen Status nach Schlaganfall.^{27,28}

2.2.2.2. Kardiovaskuläres Rezidivrisiko

Ferner interessierten wir uns für das kardiovaskuläre Rezidivrisiko bis zu drei Jahre nach Schlaganfall, das wir als Zeit bis zum Auftreten eines der Ereignisse eines kombinierten Endpunktes definierten. Hierunter fassten wir erneuten Schlaganfall, Myokardinfarkt oder Tod jeglicher Ursache zusammen.

Die Ereignisse wurden zunächst vom Patienten berichtet und folgend durch Arztbriefe, die wir zu diesem Zwecke vom behandelnden Arzt erhielten, validiert. Über den Vitalstatus gab das Berliner Melderegister Auskunft. Aufgrund gesetzlicher Limitationen konnte jedoch keine Auskunft über die Todesursache eingeholt werden. Ferner wurden Arztbriefe der PROSCIS-B Patienten, die in der elektronischen Datenprozessierungs-Software der Charité – Universitätsmedizin Berlin innerhalb der Beobachtungszeit hinterlegt wurden, herausgefiltert und auf weitere unberichtete Ereignisse unseres kombinierten Endpunktes untersucht. Jedes Ereignis des kombinierten Endpunktes wurde unabhängig von zwei geblindeten Neurologen validiert.

2.2.2.3. Verlauf kognitiver Leistung über drei Jahre

Außerdem interessierten wir uns für den Verlauf kognitiver Leistung von NMDAR1-Aks seropositiven Patienten über drei Jahre nach Schlaganfall. Für einen Vergleich NMDAR1-Aks seropositiver und seronegativer Patienten bei Studieneinschluss definierten wir einen Mini-Mental-Status-Test (MMST)-Wert kleiner oder gleich 26 als kognitive Einschränkung. Für den Verlauf kognitiver Leistungen über Zeit erhoben wir kognitive Leistung jährlich mit dem Telephone Interview for Cognitive Status – modified (TICS-m), mit der ersten Erhebung ein Jahr nach Schlaganfall und insgesamt drei möglichen TICS-m Observationen je Patient. TICS-m ist ein Screening-Test für kognitive Beeinträchtigungen, bei dem anhand von 20 Fragen ein Maximum von 50 Punkten erreicht werden kann. Er hat gegenüber dem MMST den Vorteil, dass Testergebnisse von nicht kognitiv eingeschränkten Individuen ebenfalls normalverteilt sind. Die Ergebnisse akkumulieren somit nicht an der Test-Wert Obergrenze, wodurch eine parametrische Auswertung möglich ist.²⁹

2.2.3. Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Messung

Den Patienten aus PROSCIS-B wurden innerhalb der ersten sieben Tage nach dem Schlaganfall-Einlussereignis Serumproben entnommen. NMDAR1-Aks Seropositivität der Isotypen IgM, IgA und IgG wurden mithilfe kommerziell erhältlicher Test-Kits gemessen. Die Test-Kits verwenden NMDA-Rezeptor Untereinheit GluN1 transfizierte fixierte HEK293 (Human Emryonic Kidney 293) Zellen, um Antikörper aus Serum zu binden.^{30,31} NMDAR1-Aks Quantifizierung erfolgte mikroskopisch mithilfe indirekter Immunfluoreszenz.³² Eine Einstiegsverdünnung von 1:10 diente als Trennwert für Seropositivität. Wir definierten Titer von 1:10 bis 1:100 als niedrige Titer und solche höher als 1:100 als hohe Titer, um eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung zu ermitteln.

2.2.4. Komparative statistische Analysen der klinischen Outcomes

2.2.4.1. Funktionelles Outcome

Um den Einfluss von NMDAR1-Aks Seropositivität auf das funktionelle Outcome zu schätzen, berechneten wir Odds Ratios (OR) mit zugehörigem 95%igen Konfidenzintervall (95%CI) für NMDAR1-Aks Seropositivität im Vergleich zu Seronegativität mithilfe partiell proportionaler Odds-Modelle. Bei diesem Verfahren werden binäre Vergleiche für alle möglichen Cut-Offs der mRS-Kategorien berechnet und zu einer OR zusammengefasst. Somit lässt sich ein Informationsverlust durch Dichotomisierung vermeiden.³³ Im Gegensatz zu einer herkömmlichen ordinalen Regression testet dieses Verfahren die Annahme der Proportionalität der Odds Ratios und schwächt diese gegebenenfalls. Sollten einzelne binäre Vergleiche der Kategorien in gegensätzliche Effektgrößen resultieren (d.h. ein komparativer Schritt ergibt eine OR für Seropositivität > 1 und ein anderer Schritt eine OR von < 1) wird keine zusammenfassende OR berechnet, sondern die Effektstärken für die binären Vergleiche einzeln dargestellt. Aufgrund der milden Schlaganfallschwere bei PROSCIS-B Patienten fassten wir für alle Analysen die Kategorien 5 und 6 des mRS zusammen um unsere statistische Aussagekraft und die Präzision unserer Analysen zu erhöhen.

Wir berechneten neben unadjustierten Analysen drei verschiedene Modelle, in denen wir jeweils für multiple potentielle Störfaktoren, die bei Einschluss erhoben wurden, adjustierten. Unser erstes Modell adjustierten wir für Alter (kontinuierlich) und Geschlecht (binär). In einem zweiten Modell adjustierten wir für einen Propensity-Score, den wir anhand multipler kardiovaskulärer Risikofaktoren zzgl. zu Alter und Geschlecht mithilfe einer logistischen Regression berechneten. Unser Propensity-Score gibt die bedingte Wahrscheinlichkeit für NMDAR1-Aks Seropositivität anhand von Alter, Geschlecht, und ferner den folgenden anamnestisch erfassten Variablen an: aktueller Raucherstatus (binär), gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum (binär), vorbestehender arterieller Hypertonus (binär), periphere arterielle Verschlusskrankheit (binär), Diabetes mellitus (binär), Herzinfarkt (binär) und Vorhofflimmern (binär). Für unsere seropositiven Subgruppen berechneten wir jeweils eigene Propensity-Scores. In einem dritten Modell adjustierten wir neben dem Propensity-Score außerdem für NIHSS (binär, milder Schlaganfall: 0-4, moderater Schlaganfall: 5-15) und die Schlaganfallsätiologie kategorisiert nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)-Klassifikation, welche die Ätiologiekategorien 1. makroangiopathisch, 2. kardioembolisch, 3. mikroangiopathisch 4. andere und 5. unbekannt umfasst.³⁴ Wir entschieden uns, diese zwei Variablen in einem separaten Modell einzuschließen, da wir in unserem direktionalen kausalen Modell annahmen, dass NMDAR1-Aks Seropositivität vor Schlaganfall bestand und sich nicht erst aufgrund des Schlaganfalls entwickelte. Daher stellt die Schlaganfallschwere in unserem angenommenen Modell laut Definition keinen Störfaktor dar.³⁵ Ähnlich verhält es sich bei der Schlaganfallsätiologie. Da eine Präexistenz der Antikörper vor Schlaganfall jedoch von uns nicht zu belegen ist, explorierten wir mit dem dritten Modell, ob unsere Effektstärke von diesen zusätzlichen Variablen beeinflusst ist, um eine mögliche Störfaktorverzerrung zu minimieren. Alle potentiellen Störfaktoren wurden a priori definiert, um eine ergebnisgelenkte Auswahl zu vermeiden.

In einer Subanalyse untersuchten wir, ob die beobachteten Effektstärken einem bestimmten Isotyp zuzuordnen sind. Hierzu berechneten wir Effektstärken für IgM und IgA einzeln nach dem oben beschriebenen Vorgehen, nicht jedoch für IgG aufgrund der unzureichenden Anzahl IgG seropositiver Patienten.

2.2.4.2. Kardiovaskuläres Rezidivrisiko

Visuell explorierten wir kardiovaskuläres Rezidivrisiko NMDAR1-Aks seropositiver und seronegativer Patienten mit dem Kaplan-Meier-Schätzer. Das erstmals 1958 von Kaplan und Meier vorgestellte Verfahren berechnet Ereigniszeitfunktionen für die zeitpunkt-abhängigen spezifischen Risiken einer Population in einem Beobachtungszeitraum. Hierbei wird berücksichtigt, dass sich das kumulative Risiko über einen Zeitraum in einer prädefinierten Beobachtungsgruppe verändern kann, sobald sich die Anzahl der unter Beobachtung stehenden Individuen reduziert. Dies passiert zum Beispiel, wenn Individuen bereits das Zielereignis erfahren haben und somit nicht mehr unter Risiko für dieses stehen. Wichtig ist, dass außerdem die Zeit unter Beobachtung solcher Individuen berücksichtigt wird, die aus verschiedenen Gründen während des Beobachtungszeitraum ohne Ereignis aus der Studie ausscheiden (Drop-Outs und Lost-to-follow-up).

In unserer Studie war das Zielereignis ein kombinierter Endpunkt aus erneutem Schlaganfall, Myokardinfarkt und Tod jeglicher Ursache. Die Zeit bis zum ersten Auftreten eines der Ereignisse wurde in Personenjahren gemessen. Mit dem Logrank-Test verglichen wir die unadjustierten Ereigniszeitfunktionen NMDAR1-Aks seropositiver und seronegativer Patienten auf einen statistisch signifikanten Unterschied bei einem zulässigen alpha-Fehler-Level von 5%. Um in einem nächsten Schritt unsere Expositionsgruppen unter Berücksichtigung potentieller Störgrößen zu vergleichen, berechneten wir Hazard Ratios (HR) mit zugehörigem 95%CI mit Cox-Regressionen. Zuzüglich zu der unadjustierten Analyse berechneten wir störfaktoradjustierte Modelle, bei denen wir, wie unter 4.5.1. beschrieben, multiple Kovariablen einschlossen.

Auch bezüglich dieser Fragestellung führten wir eine Subanalyse durch, bei der wir untersuchten, ob sich die beobachteten Effekte einem bestimmten NMDAR-Aks Isotyp zuschreiben lassen. Hierbei analysierten wir die Daten wie zuvor beschrieben, jedoch mit nach IgM und IgA Seropositivität stratifizierten Expositionsgruppen.

2.2.4.3. Kognitive Leistungen über Zeit

Um NMDAR1-Aks seropositive und seronegative Patienten hinsichtlich des Verlaufs kognitiver Leistung über Zeit zu vergleichen, explorierten wir zunächst den Anteil kognitiv eingeschränkter Patienten bei Einschluss. Wir berechneten die Differenz des prozentualen Anteils der Patienten mit einem MMST-Wert von ≤ 26 zwischen seronegativen Patienten und den jeweiligen seropositiven

Subgruppen mit zugehörigem 95%CI und adjustierten jeweils für Alter und Schulbildungsjahre (binär: ≤ 10 Jahre und > 10 Jahre). Für den Verlauf kognitiver Funktionen über Zeit erhoben wir repetitive TICS-m Messungen jährlich einmal und somit bis zu insgesamt drei Mal pro Patient. Diese intraindividuell-repetitiven Messungen führen zur Autokorrelation der Observationen und so zu einer spezifischen Varianzstruktur, die die Annahmen der Unabhängigkeit der Observationen eines einfachen linearen Modells verletzt. Um dieser zugrunde liegenden Struktur gerecht zu werden, berechneten wir gemischte Modelle (Linear Mixed Models) um β -Effektstärken (mit 95%CI) für den Einfluss von NMDAR1-Aks Seropositivität auf TICS m Werte über Zeit zu erhalten. Bei dem von uns gewählten Random-Intercept-Model, einem spezifischen gemischten Modell, wird zuzüglich zu dem Zufallsfehlerterm ein spezifischer Fehlerterm für den Achsenabschnitt inkorporiert. Die berechneten β -Effektstärken reflektieren letztlich die durch NMDAR1-Aks bedingte TICS-m Differenz über Zeit unabhängig von der interindividuellen Varianz, d.h. des individuellen Ausgangsniveaus. In unserer Gleichung brachten wir als erste Variable Zeit und als zweite den NMDAR1-Aks Serostatus ein. Als weitere Variablen für unsere Fragestellung inkorporierten wir Störfaktoren wie unter 4.5.1. beschrieben, jedoch fügten wir bei jedem Modell zusätzlich Schulbildungsjahre hinzu. Dies gilt auch für den wie unter 4.5.1. beschrieben berechneten Propensity-Score.

Wir berechneten außerdem drei Sensitivitätsanalysen: Fehlende Werte in longitudinalen Observationsstudien sind ein häufig beobachtetes Problem, dass zu Ungenauigkeit oder zu Antwortausfallverzerrung führen kann. Fehlwerte zeigten sich auch bei TICS-m Erhebungen in PROSCIS-B. Obgleich wir in der Aufarbeitung keine zugrunde liegende Systematik der Fehlwerte eruieren konnten, erstellten wir eine Übersichtstabelle, in der wir die charakterisierenden Attribute, die bei Einschluss erhoben wurden, danach stratifizierten, ob der Patient mindestens eine oder überhaupt keine TICS-m Erhebung hatte (S1). Dies diente dazu, einem potentiellen Mechanismus hinter dem Fehlen der Werte auf den Grund zu gehen und Hinweise auf eine mögliche Verzerrung durch diese Fehlwerte zu erhalten. Da wir erwartungsgemäß viele fehlende TICS-m Observationen hatten, wendeten wir eine Imputationsmethode an, bei der Fehlwerte ersetzt wurden, um die Ausschöpferquote unserer Stichprobe gegenüber dem primär angewandten Eliminierungsverfahren zu erhöhen (S2). Mit dieser Imputationsmethode generierten wir mithilfe multipler aneinander geketteter Gleichungen und einer Zahl an Prädiktor-Variablen zehn vollständige Datensätze. Dadurch imputierten wir die Fehlwerte unter Berücksichtigung der Varianzstruktur. Wir entschieden, dass folgende Variablen prädiktiv für den TICS-m Wert sind: Zeit, Alter, Geschlecht, Schulbildungsjahre, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt, Vorhofflimmern, NIHSS, TOAST-Klassifikation, mRS bei Einschluss und MMST-Wert bei Einschluss. Für das Imputieren unserer kontinuierlichen TICS-m Outcome-Variable sowie für die Fehlwerte kontinuierlicher Kovariablen wählten wir Predictive Mean Matching, für binäre Kovariablen wählten wir logistische Regressionen und für ordinale Kovariablen ordinale logistische Regressionen. Fehlwerte aufgrund von Tod schlossen wir aus dem Imputationsverfahren aus. Nach Erlangen zehn vollständiger Datensätze wandten wir auf diese erneut ein gemischtes Modell

zur Schätzung der Effektstärke von NMDAR1-Aks Seropositivität auf den Verlauf kognitiver Leistungen über Zeit nach Schlaganfall an. Die resultierenden zehn Effektstärken bündelten wir mithilfe der Regel nach Rubin zu einem einzigen zusammenfassenden Schätzer.³⁶

In einer dritten Sensitivitätsanalyse explorierten wir ob sich unsere Effektstärken änderten, wenn wir Patienten, die durch Depression bedingt potentiell eine Pseudodemenz haben könnten, ausschlossen (S3). Ob eine Depression in den Patienten vorlag, erhoben wir mit der erstmals 1977 von L.S. Radloff vorgestellten Allgemeinen Depressionsskala (ADS). Dieser liegt ein Fragebogen zugrunde, der anhand von 20 Fragen vom Likert-Typ auf Depression screenet. Ein ADS Summenwert von mehr oder gleich 16 von maximal 60 Punkten wurde von uns als das Vorliegen einer Depression betrachtet.³⁷ Da wir hier abermals viele Fehlwerte bei den Beobachtungszeitpunkten ein, zwei und drei Jahre nach Schlaganfall verzeichneten, imputierten wir Fehlwerte aus dem ADS mit der „Best-Case“-Szenario- und „Worst-Case“-Szenario-Einzelimputationsmethode, wobei wir im „Best-Case“-Szenario Fehlwerte mit null Punkten ersetzten, was in der geringstmöglichen Anzahl potentieller Depressionen resultierte und im „Worst-Case“-Szenario die maximal Punktzahl von drei Punkten pro Frage vergaben, was in der größtmöglichen Anzahl depressiver Patienten resultierte. Folgend wurden entsprechen weniger oder mehr Patienten aus der Analyse ausgeschlossen, bevor wir erneut, wie oben beschrieben, gemischte Modelle berechneten.

2.2.5. Benutze Software und Programmierungssprachen für die Auswertung

Für Reproduzierbarkeit der vorliegenden Ergebnisse benutzten wir für die zentrale Datenpräparation die Software IBM SPSS Statistics, Version 24 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA), für die deskriptive und analytische Statistik sowie einen Teil der Grafiken STATA, Version 14.2 (Stata Corp., College Station, TX, USA). Alle weiteren Datenvisualisierung wurden mit R (R i386 3.5.1, the R foundation) unter Anwendung des ‚ggplot2‘-Pakets erstellt.

2.2.6. Stellungnahme zur Ethik

Alle Patienten unterzeichneten schriftlich das Einverständnis zur Studienteilnahme und explizit die Einwilligung für Blut-Biomarker-Analysen. Die PROSCIS-B Studie besitzt ein Ethikvotum des Ethik-Komitees der Charité – Universitätsmedizin Berlin (EA1/218/09) und folgt ethischen Prinzipien der Deklaration von Helsinki.

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Fallzahlen

Das Flussdiagramm in Abbildung 1a. zeigt, wie wir letztendlich mit 583 Patienten mit NMDAR1-Aks Messung resultierten. Der Mediantag, an dem die Serumproben bei seronegativen sowie seropositiven Patienten entnommen wurden, lag bei Tag 4 (Interquartil-Bereich [IQR]: 3 bis 5), bei seropositiven Patienten mit niedrigen Titern bei Tag 4 (IQR: 3 bis 6) und bei Patienten mit hohen Titern ebenfalls bei Tag 4 (IQR: 3 bis 5). Der telefonische mRS ein Jahr nach Schlaganfall konnte bei 485 Patienten erhoben werden. Das Flussdiagramm aus Abbildung 1b. zeigt, bei wie vielen Patienten wir zu jedem Follow-Up Zeitpunkt jeweils TICS-m Werte erheben konnten. Mindestens eine TICS-m Erhebung hatten 451 (77% der Patienten mit NMDAR1-Aks Messung) und 132 Patienten (23% der Patienten mit NMDAR1-Aks Messung) hatten keine einzige TICS-m Erhebung.

2.3.2. Die Patientenpopulation

PROSCIS-B Patienten mit ischämischem Schlaganfall (n=621) hatten bei Einschluss ein mittleres Alter von 67 Jahren (Standard Abweichung [SD]: 13 Jahre), 39% waren weiblich, die Medianpunktzahl des NIHSS lag bei 2 (IQR: 1 bis 4 Punkte), der mediane mRS bei 2 (IQR: 1 bis 3) und die Medianpunktzahl des MMST lag bei 28 Punkten (IQR: 26 bis 30 Punkte). Von den 583 gemessenen Serumproben waren 76 (13%) NMDAR1-Aks positiv mit Titern $\geq 1:10$. Unter diesen zeigten 55 Patienten hohe Titer (72% der seropositiven Patienten) und 21 Patienten niedrige Titer (23% der seropositiven Patienten). IgM-Antikörper wurden in 49 Patienten (8%) und IgA in 43 Patienten (7%) gemessen. Sechzehn (3%) Patienten waren simultan IgM und IgA seropositiv. IgG-Antikörper konnten wir in nur zwei von allen Serumproben (0,4%) nachweisen. Demografische Parameter und klinische Charakteristika unterschieden sich nicht maßgeblich zwischen den NMDAR1-Aks Expositionsgruppen, wie aus Tabelle 1. ersichtlich.

2.3.3. Ergebnisse aus Analysen der klinischen Outcomes

2.3.3.1. Funktionelles Outcome

Ein Jahr nach Schlaganfall verzeichneten wir einen medianen mRS von 1 (IQR: 0 bis 2) in der gesamten Kohorte und stratifiziert nach Expositionsgruppe. Aus unadjustierten und adjustierten partiell proportionalen Odds Modellen ergab sich kein Anhalt für einen klinisch relevanten Unterschied im mRS zwischen NMDAR1-Aks seropositiven und seronegativen Patienten (unadjustierte OR: 1,34; 95%CI: 0,83 bis 2,17; adjustierte OR_{Model3} :1,27; 95%CI: 0,77 bis 2,09). Bei unseren seropositiven Subgruppen zeigte sich kein Unterschied im mRS zwischen Patienten mit niedrigen NMDAR1-Aks Titern und seronegativen Patienten (unadjustierte OR: 0,87; 95%CI: 0,49 bis 1,54; adjustierte OR_{Model3} :1,27;

Abbildung 1a. Flussdiagramm zum PROSCIS-B Patienten Ein- und Ausschluss.³⁸

Grafik adaptiert aus Sperber et al. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B), Stroke, 2019

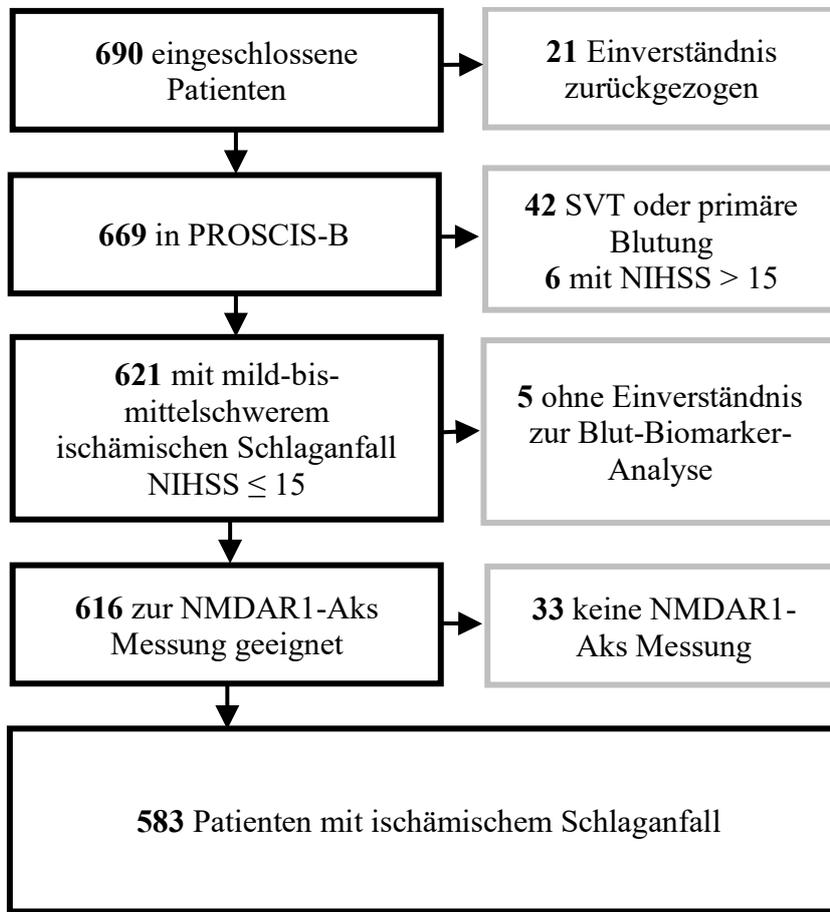
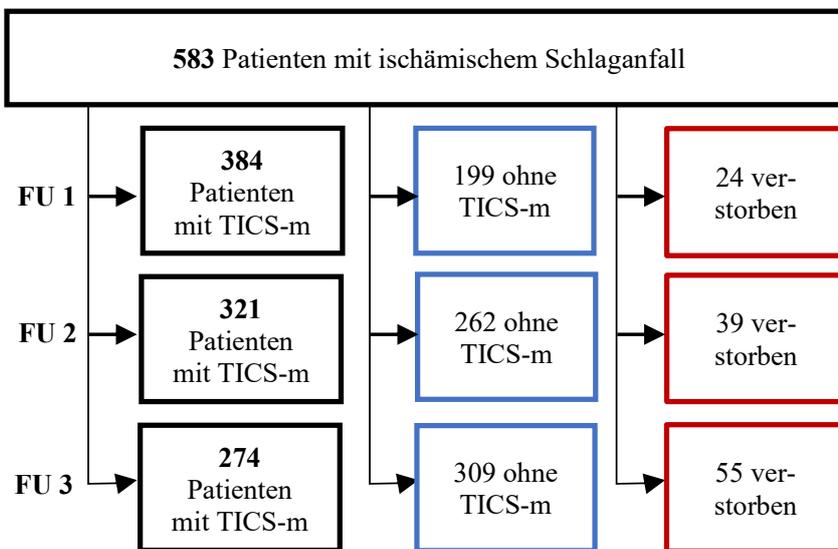


Abbildung 1b. Flussdiagramm zur Übersicht der TICS-m Erhebungen und der Todesfälle jeweils für die drei Nachbeobachtungszeitpunkte.



Patienten, Patienten aus PROSCIS-B; TICS-m, Telephone Interview for Cognitive Status – modified; SVT, Sinusvenenthrombosen; NMDAR-Aks, Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale

Tabelle 1. Charakteristika der PROSCIS-B Patienten bei Einschluss – Gesamt und stratifiziert nach Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Serum Status³⁸

Tabelle adaptiert aus Sperber et al. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B), *Stroke*, 2019

	PROSCIS – B	Stratifiziert nach Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Serum Status			
	Total	seronegativ	seropositiv	Titer ≤ 1:100	Titer >1:100
PROSCIS-B Teilnehmer^a n (%)	621 (100)	507 (82)	76 (13 ^b)	55 (9 ^b)	21 (4 ^b)
Anti-NMDAR GluN1 IgM Antikörper	49 (8 ^b)	–	49 (8 ^b)	34 (6 ^b)	15 (3 ^b)
Anti-NMDAR GluN1 IgA Antikörper	43 (7 ^b)	–	43 (7 ^b)	31 (5 ^b)	12 (2 ^b)
Anti-NMDAR GluN1 IgG Antikörper	2 (>0 ^b)	–	2 (>0 ^b)	2 (>0 ^b)	0
Alter (Jahre) mean (SD)	67 (13)	67(13)	66 (14)	65 (14)	71 (10)
Alter (Jahre) median (IQR)	69 (58 – 76)	69 (59 – 76)	67 (56 – 77)	63 (51 – 77)	69 (66 – 78)
Biologisch weibliches Geschlecht n (%)	242 (39)	204 (40)	22 (29)	17 (40)	5 (24)
Systolischer Blutdruck (mmHg) mean (SD)	139 (22)	139 (22)	139 (24)	139 (22)	140 (28)
Diastolischer Blutdruck (mmHg) mean (SD)	77 (14)	77 (15)	78 (13)	80 (12)	73 (14)
Vorerkrankt an Bluthochdruck n (%)	406 (65)	336 (66)	46 (61)	30 (55)	16 (76)
BMI (kg/m²) median (IQR)	27 (24 – 30)	27 (24 – 29)	28 (24 – 31)	27 (24 – 30)	30 (26 – 34)
gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum n (%)	217 (35)	179 (36)	23 (31)	15 (27)	8 (38)
Raucher n (%)	171 (28)	139 (28)	22 (30)	17 (31)	5 (24)
Gesamtcholesterin (mg/dl)^c mean (SD)	198 (48)	199 (48)	198 (50)	204 (51)	180 (42)
HDL (mg/dl)^d mean (SD)	51 (16)	52 (16)	49 (17)	50 (18)	47 (13)
LDL (mg/dl)^e mean (SD)	122 (41)	122 (41)	124 (43)	128 (43)	112 (40)
Triglyceride (mg/dl)^f mean (SD)	139 (80)	136 (80)	152 (80)	152 (80)	152 (81)
Vorerkrankt an Diabetes mellitus n (%)	137 (22)	107 (21)	21 (28)	13 (24)	8 (38)
pAVK n (%)	42 (7)	34 (7)	6 (8)	3 (6)	3 (14)
KHK n (%)	99 (16)	80 (16)	16 (21)	10 (18)	6 (29)
Vorerkrankt an Vorhofflimmern n (%)	132 (21)	106 (21)	18 (24)	11 (20)	7 (33)
Geschätzte GFR (ml/min) mean (SD)	77 (21)	77 (21)	79 (22)	83 (21)	70 (22)
NIHSS median (IQR)	2 (1 – 4)	2 (1 – 4)	3 (1 – 5)	2 (1 – 5)	3 (2 – 5)
NIHSS: 0 – 4 n (%)	470 (76)	386 (76)	54 (71)	40 (73)	14 (67)
NIHSS: 5 – 15 n (%)	151 (24)	121 (24)	22 (29)	15 (27)	7 (33)
TOAST Makroangiopathisch n (%)	167 (27)	128 (25)	25 (33)	17 (31)	8 (38)
TOAST Kardoembolisch n (%)	145 (23)	121 (24)	18 (24)	12 (22)	6 (29)
TOAST Mikroangiopathisch n (%)	96 (15)	87 (17)	6 (8)	4 (7)	2 (10)
TOAST Andere n (%)	22 (4)	15 (3)	2 (3)	2 (4)	0
TOAST Unbekannt n (%)	191 (31)	156 (31)	25 (33)	20 (36)	5 (24)
mRS bei Einschluss median (IQR)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)
≤ 10 Schuljahre n (%)	421 (68)	345 (72)	51 (68)	34 (63)	17 (81)
> 10 Schuljahre n (%)	171 (28)	136 (28)	24 (32)	20 (37)	4 (19)
MMST median (IQR)^g	28 (26 – 30)	28 (26 – 30)	29 (27 – 30)	29 (27,5 – 30)	27 (24 – 29)
Kognitiv eingeschränkte Patienten^h n (%)	130 (21)	107 (21)	13 (17)	6 (11)	7 (33)

Tabelle 1. Legende. Mean, Mittelwert; median, Median; SD, Standard Abweichung; IQR, Interquartil-Bereich; BMI, Body Mass Index; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; pAVK, periphere arterielle Verschlusskrankheit; KHK, Koronare Herzkrankheit; GFR, glomeruläre Filtrationsrate berechnet mit der Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) Formel; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; TOAST, stroke etiology according to Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment Klassifikation; mRS, modified Rankin Scale; MMST, Mini Mental Status Test; ^a38 Teilnehmer mit Fehlwerten zum Antikörper Serostatus; ^bProzentsatz bezieht sich auf 583 Patienten mit Antikörpermessung; Fehlwerte waren kleiner als 10% in allen Charakteristika. Relativ hohe Fehlwerte beobachteten wir bei ‘Gesamtcholesterin’ fehlend: n = 57, ^d‘HDL’ und ‘LDL’ fehlend: n = 38, ^f‘Triglyceride’ fehlend: n = 49; ^g‘MMST’ fehlend: n = 16; ^hkognitiv eingeschränkt bei einem MMST ≤ 26; Aufgrund von Rundungen summieren sich Anteile bestimmter Variablen nicht auf 100%

95%CI: 0,77 bis 2,09). Hingegen zeigte sich bei seropositiven Patienten mit hohen NMDAR1-Aks Titern im Vergleich zu seronegativen Patienten eine Verschlechterung im mRS in unadjustierten und störfaktor-adjustierten Modellen (unadjustierte OR: 3,56; 95%CI: 1,57 bis 8,07; adjustierte OR_{Modell3} : 2,91; 95%CI: 1,28 bis 6,66). Alle resultierenden ORs aus komparativen Analysen in jeweiligen Modellen lassen sich aus Tabelle 2. entnehmen. In unserem unadjustiertem Modell (Crude) und im Modell 1 (Modell 1) konnten wir keine zusammenfassende OR über alle Kategorien des mRS mit partiell proportionalen Odds Modellen berechnen. Für Tabelle 2. erhielten wir diese mit einer forcierten konventionellen ordinalen logistischen Regression, unter Verletzung der Proportionalitätsannahme. Die Effektstärken aus binären Vergleichen für alle möglichen Cut-Offs des mRS im unadjustierten und ersten Modell sind in Tabelle 3. dargestellt. Hier deuten einige dieser auf besseres und andere auf schlechteres Outcome bei Patienten mit niedrigen Titern hin. Keine der Effektstärken suggeriert eine klinische Relevanz. Die Effektstärken für IgM und IgA Seropositivität deuten jeweils an, dass auch die Isotypen einzeln nicht mit mRS assoziiert sind (Tabelle 4.). Auch bei diesen Berechnungen war im ersten Modell (Modell 1) die Annahme der Proportionalität stark verletzt, daher wurden dargestellte Effektstärken abermals mit ordinalen logistischen Regressionen forciert berechnet.

2.3.3.2. Vaskuläres Rezidivrisiko

PROSCIS-B Patienten kamen insgesamt auf 1436 Personenjahre und zeigten 96 Ereignisse des kombinierten Endpunktes. Von diesen waren 43 Ereignisse (7,38% der Patienten mit NMDAR1-Ak Messung) erneute Schlaganfälle, fünf Ereignisse (0,85% der Patienten mit NMDAR1-Ak Messung) Myokardinfarkte und 48 Todesfälle (8,23% der Patienten mit NMDAR1-Ak Messung). Die Differenz von sieben Todesfällen zu der unter 6.1. genannten Anzahl ergibt sich dadurch, dass diese zunächst ein anderes Ereignis des kombinierten Endpunktes hatten (erneuter Schlaganfall / Myokardinfarkt) und daher nicht in die hier genannte Zahl einfließen. In Abbildung 2. sind die Kaplan-Meier-Ereigniszeitfunktionen visualisiert. Aus einem Vergleich der Funktionen mit dem Logrank-Test ergibt sich für unsere Daten eine Wahrscheinlichkeit von 2%, sollte es keine reelle Differenz der Ereigniszeitfunktionen zwischen NMDAR1-Aks seropositiven und seronegativen Patienten von mindestens dieser Größe oder extremer geben (p-Wert). Ferner wird die Parallelität der zugrunde liegenden Funktionen als wichtige Annahme für die Cox-Regressionen ersichtlich. NMDAR1-Aks Seropositivität war in Cox-Regressionen mit erhöhtem vaskulärem Rezidivrisiko assoziiert (unadjustierte HR: 1,80; 95%CI: 1,10 bis 2,95; adjustierte HR_{Modell3} : 1,83; 95%CI: 1,10 bis 3,05). Alle resultierenden Hazard Ratios sind in Tabelle 5. dargestellt. Eine komparative Analyse seropositiver Untergruppen mit seronegativen Patienten konnten wir nicht berechnen, da dafür die Zahl der Ereignisse des Endpunktes in den jeweiligen Gruppen zu gering war. Das von uns beobachtete kardiovaskuläre Rezidivrisiko ließ sich in unserer Subanalyse nicht einem einzelnen Isotyp zuschreiben. Effektstärken dieser Kalkulationen sind in Tabelle 6. dargestellt.

Tabelle 2. Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Serumprävalenz und funktionelles Outcome ein Jahr nach ischämischem Schlaganfall³⁸

Tabelle adaptiert aus Sperber et al. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B), *Stroke*, 2019

Serostatus	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c		Model 3 ^d	
	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
seronegativ	1	(ref.)	1	(ref.)	1	(ref.)	1	(ref.)
seropositiv	1,34	0,83 – 2,17	1,42	0,87 – 2,31	1,28	0,78 – 2,11	1,27	0,77 – 2,09
Titer ≤ 1:100	0,87*	0,49 – 1,54*	0,96*	0,54 – 1,70*	0,86	0,48 – 1,55	0,90	0,50 – 1,63
Titer > 1:100	3,56	1,57 – 8,07	3,29	1,46 – 7,40	3,35	1,47 – 7,64	2,91	1,28 – 6,66

Serostatus, Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serostatus nach Titer-Kategorien; OR, Odds Ratios von partiell proportionalen Odds Modellen; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall; ref., Referenzgruppe. ^aCrude, unadjustiert; ^bModel 1, adjustiert für Alter und Geschlecht; ^cModel 2, adjustiert für einen Propensity-Score für Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serumprävalenz und jeweils für seropositive Subgruppen gebildet anhand der Variablen Alter, Geschlecht, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, vorbestehender arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt und Vorhofflimmern; ^dModel 3, adjustiert für den o.g. Propensity-Score und zzgl für Schlaganfallschwere nach dem National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Klassifikation.*ORs mit ordinalen logistischen Regressionen berechnet.

2.3.3.3. Verlauf kognitiver Leistung über Zeit

Der mediane MMST-Wert bei Einschluss lag bei seronegativen Patienten bei 28 Punkten (IQR: 26 bis 30 Punkte) und bei seropositiven Patienten bei 29 Punkten (IQR: 27 bis 30 Punkte). Bei Patienten mit niedrigen Titern lag der mediane MMST-Wert bei 29 Punkten (IQR: 27,5 bis 30 Punkte) und bei Patienten mit hohen Titern lag er bei 27 Punkten (IQR: 24 bis 29 Punkte). Insgesamt waren 28% (158/569) der Patienten mit Antikörpermessung und MMST-Erhebung bei Einschluss kognitiv eingeschränkt mit einem MMST-Wert kleiner oder gleich 26. Unter Seronegativen waren es 29% (142/497 mit MMST) und unter seropositiven Patienten 22% (16/72 mit MMST). Unter Seropositiven mit niedrigen Titern waren es 15% (8/52 mit MMST) und unter Patienten mit hohen Titern waren es 40% (8/20 mit MMST). Die unadjustierte Prozentdifferenz zwischen Seropositiven und Seronegativen war -6% (95%CI: -16% bis 4%) und für Alter und Schulbildungsjahre adjustiert -3% (95%CI: -18% bis 12%). Die unadjustierte Prozentdifferenz zwischen Patienten mit niedrigen Titern und seronegativen Patienten war -13% (95%CI: -24% bis -2%) und für Alter und Schulbildungsjahre adjustiert -8% (95%CI: -26% bis 8%). Zwischen Patienten mit hohen Titern und seronegativen Patienten lag die unadjustierte Prozentdifferenz bei 11% (95%CI: -11% bis 34%) und Alter und Schulbildungsjahre adjustiert bei 7% (95%CI: -20% bis 33%). Alle Werte sind gerundet und summieren sich daher zum Teil nicht auf.

Der Verlauf kognitiver Leistung über drei Jahre nach Schlaganfall unterschied sich nicht zwischen seropositiven und seronegativen Patienten (unadjustiertes β : 0,38; 95%CI: -1,00 bis 1,76, adjustiertes $\beta_{\text{Model 3}}$: 0,30; 95%CI: -1,14 bis 1,73), wie in Tabelle 7a. und 7b. gezeigt. TICS-m Messwerte aus PROSCIS-B sind in Abbildung 3. für die jeweiligen Nachbeobachtungszeitpunkte visualisiert. Hieraus geht die Normalverteilung der TICS-m Ergebnisse hervor und daher ist auch die Normalverteilung der

Tabelle 3. Odds Ratios für alle binären Vergleiche bei inkrementierendem Cut-Off über Kategorien der modified Rankin Scale³⁸

Tabelle adaptiert aus Sperber et al. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B), *Stroke*, 2019

Serostatus	mRS Cut-Off	Crude ^a		Model 1 ^b	
		OR	95% CI	OR	95% CI
seronegativ		1	(ref.)	1	(ref.)
Titer ≤ 1:100	mRS: 0 vs. 1–6	0,68	0,36 – 1,28	0,70	0,37 – 1,31
	mRS: 0–1 vs. 2–6	1,12	0,60 – 2,09	1,18	0,63 – 2,22
	mRS: 0–2 vs. 3–6	0,86	0,34 – 1,92	1,14	0,51 – 2,54
	mRS: 0–3 vs. 4–6	1,22	0,49 – 3,02	1,60	0,64 – 4,02
	mRS: 0–4 vs. 5–6	2,23	0,81 – 6,17	2,95	1,05 – 8,26

Serostatus, Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serostatus; mRS, modified Rankin Scale für funktionelles Outcome; ^aCrude, unadjustiert; ^bModel 1, adjustiert für Alter und Geschlecht; OR, Odds Ratio berechnet mit logistischen Regressionen bei inkrementeller mRS Dichotomisierung; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall; ref., Referenzgruppe; vs., versus.

Tabelle 4. Odds Ratios für funktionelles Outcome in NMDAR1-Aks seropositiven Patienten stratifiziert nach Immunglobulin Isotyp Serumpräsentation³⁸

Tabelle adaptiert aus Sperber et al. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B), *Stroke*, 2019

Serostatus	n	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c		Model 3 ^d	
		OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI	OR	95% CI
seronegativ	507	1	(ref.)	1	(ref.)	1	(ref.)	1	(ref.)
nur IgM	32	1,44	0,68 – 3,03	1,51*	0,72 – 3,17*	1,46	0,67 – 3,18	1,45	0,68 – 3,10
nur IgA	26	1,55	0,72 – 3,33	1,69*	0,79 – 3,64*	1,48	0,66 – 3,35	1,35	0,60 – 3,04
IgM & IgA	16	1,03	0,39 – 2,77	1,11*	0,42 – 2,99*	1,00	0,37 – 2,71	1,05	0,38 – 2,89

Serostatus, Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper nach Immunglobulin-Isotyp; n, Anzahl; OR, Odds Ratios von partiell proportionalen Odds Modellen; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall. ref., Referenzgruppe. ^aCrude, unadjustiert; ^bModel 1, adjustiert für Alter und Geschlecht; ^cModel 2, adjustiert für einen Propensity-Score für Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serumpräsentation und jeweils für seropositive Subgruppen gebildet anhand der Variablen Alter, Geschlecht, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, vorbestehender arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt und Vorhofflimmern; ^dModel 3, adjustiert für den o.g. Propensity-Score und zzgl. für Schlaganfallschwere nach dem National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Klassifikation.*mit ordinalen logistischen Regressionen berechnet.

Abbildung 2. Ereigniszeitfunktionen des Kaplan-Meier-Schätzer aus PROSCIS-B³⁸

Grafik adaptiert von Sperber et al. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B), *Stroke*, 2019

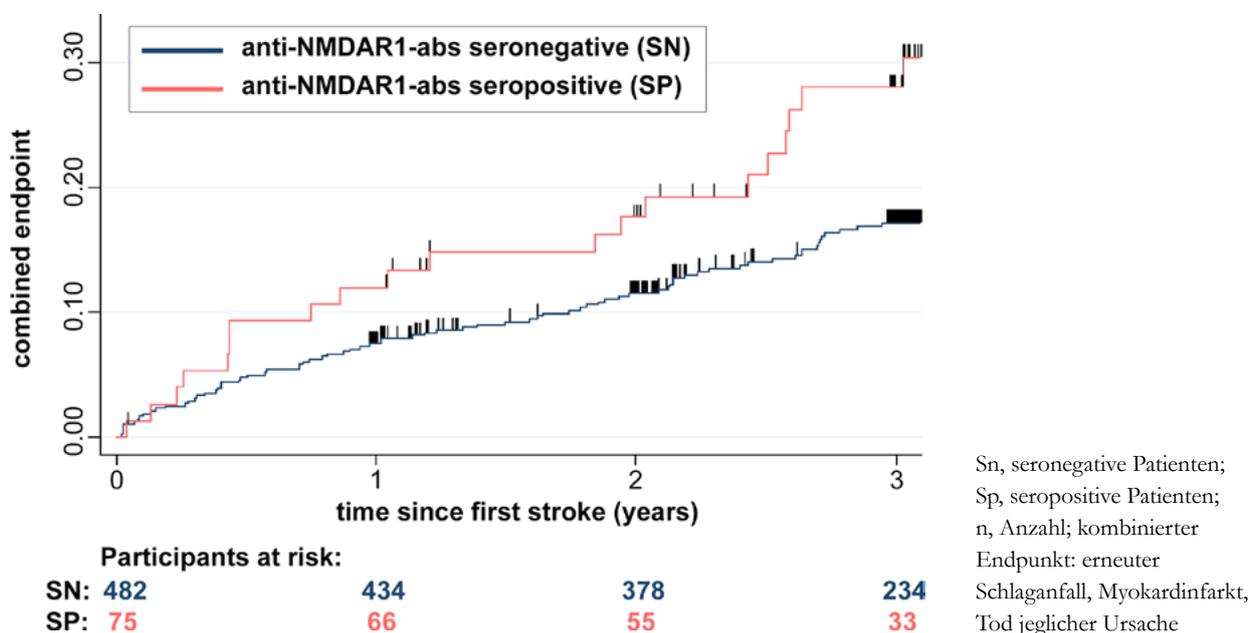


Tabelle 5. Inzidenzrate eines Sekundäreignisses und Hazard Ratios für Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Seropositivität im Schlaganfall³⁸

Tabelle adaptiert aus Sperber et al. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B), *Stroke*, 2019

Status	n	Erg.	IR	95 % CI	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c		Model 3 ^d	
					HR	95% CI	HR	95% CI	HR	95% CI	HR	95% CI
Sn	507	76	0,06	0,05 – 0,08	1	(ref.)	1	(ref.)	1	(ref.)	1	(ref.)
Sp	76	20	0,11	0,09 – 0,12	1,80	1,10 – 2,95	1,86	1,13 – 3,06	1,81	1,09 – 2,99	1,83	1,10 – 3,05

Status, Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serostatus; Sn, seronegative Patienten; Sp, seropositive Patienten; n, Anzahl; Erg., Alle Ereignisse des kombinierten Endpunkt innerhalb von drei Jahren (erneuter Schlaganfall, Myokardinfarkt, Tod jeglicher Ursache); IR, Inzidenzrate; HR, Hazard Ratio für kardiovaskuläres Rezidivrisiko bis zu drei Jahre nach Schlaganfall im Vergleich zur Referenzgruppe berechnet mit Cox-Regressionen; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall; ref., Referenzgruppe; ^aCrude, unadjustiert; ^bModel 1, adjustiert für Alter und Geschlecht; ^cModel 2, adjustiert für einen Propensity-Score für Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serumpräsenz und jeweils für seropositive Subgruppen gebildet anhand der Variablen Alter, Geschlecht, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, vorbestehender arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt und Vorhofflimmern; ^dModel 3 adjustiert für den o.g. Propensity-Score und zzgl. für Schlaganfallschwere nach dem National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Klassifikation.

Residuen als Bedingung für die Berechnung eines gemischtes Modells gegeben. Tabelle 7a. zeigt die Effektstärken von NMDAR1-Aks Seropositivität und der jeweiligen Subgruppen auf TICS-m über Zeit im Vergleich zu seronegativen Patienten. Der β -Schätzer deutet auf keinen Unterschied zwischen Patienten mit niedrigen Titern im Vergleich zu seronegativen Patienten hin (unadjustiertes β : 1,53; 95%CI: -0,06 bis 3,11, adjustiertes β_{Model3} : 1,42; 95%CI: -0,23 bis 3,08). Bei Patienten mit hohen Titern scheint es, als würden über Zeit betrachtete kognitive Leistungen schlechter sein im Vergleich zu seronegativen Patienten (unadjustiertes β : -2,54; 95%CI: -4,99 bis -0,08, adjustiertes β_{Model3} : -2,30; 95%CI: -4,82 bis 0,21). Wir erachten die für hohe Titer beobachteten β -Effektstärken von mehr als zwei TICS-m Punkten als klinisch relevant, da sie unabhängig von anderen Faktoren eine vergleichbare Reduktion kognitiver Leistung über Zeit signalisieren wie beispielsweise eine höhere Schlaganfall-schwere auf TICS-m Ergebnisse über Zeit in unserer Kohorte (unadjustiertes β für NIHSS, 5-15 im Vergleich zur Referenz NIHSS, 0-4: -2,12; 95%CI: -3,19 bis -1,05).

Tabelle 7b. zeigt alle β -Effektstärken für die einzelnen Kovariablen aus verschiedenen Modellen und die über unseren Fehlerterm für die individuellen Ausgangsleistungen erklärte Varianz in jedem Modell. Aus der unadjustierten Analyse ergab sich ein präziser, jedoch schwacher positiver Effekt für Zeit auf TICS-m (β_{Model3} für Zeit: 0,70; 95%CI: 0,44 bis 0,95), der zwar klinisch nicht als bedeutend eingestuft werden kann, jedoch auf einen Lerneffekt im TICS-m bei repetitiven Messungen hindeutet. Abgesehen von der Effektstärke für Zeit zeigen sich die übrigen Effektstärken der Kovariablen in unseren Modellen erwartungsgemäß (Tabelle 7b.), so zeigt beispielsweise eine höhere Schulbildung einen positiven Effekt auf TICS-m über Zeit mit +3,57 Punkten im ersten Modell (Modell 1).

In unserer Sensitivitätsanalyse (S1) explorierten wir, ob sich Patienten ohne eine einzige TICS-m Erhebung von Patienten mit mindestens einer TICS-m Erhebung anhand ihrer Einschlusscharakteristika unterschieden. Tabelle 8. deutet darauf hin, dass dies zumindest für die von uns beobachteten und hierfür als relevant eingestuften Faktoren nicht der Fall war. Bei der Annahme, dass keine outcome-bezogene Systematik hinter den Fehlwerten lag (Missing at Random [MAR]), wandten wir in (S2) die Multiple-Imputation-Methode zum Ersetzen der Fehlwerte an. Die sich hieraus ergebenden gebündelten Effektstärken sind in Tabelle 9. dargestellt und zeigen sich abgeschwächt im Vergleich zu den Effektstärken aus Tabelle 7a. Für unsere dritte Sensitivitätsanalyse schlossen wir jeweils in einem „Best-Case“-Szenario und „Worst-Case“-Szenario Patienten mit Depression aus der Analyse aus. Die Anzahl der ausgeschlossenen Patienten für jede Expositionsgruppe je Follow-Up-Zeitpunkt lässt sich der Tabelle 10. entnehmen. Hier ist zu beobachten, dass wir einen großen Anteil der Patienten mit hohen Titern sowohl im „Best-Case“-Szenario als auch im „Worst-Case“-Szenario ausgeschlossen haben, was auf einen möglichen Zusammenhang von NMDAR1-Aks Seropositivität mit hohen Titern und Depression nach Schlaganfall in unserer Kohorte hindeutet. Effektstärken der gemischten Modelle nach Ausschluss potentiell depressiver Patienten sind in der Tabelle 11. dargestellt. Die zuvor dargestellten Effektstärken für Patienten mit hohen Titern im Vergleich zu seronegativen Patienten zeigten sich stark abgeschwächt bis gar nicht, was wir auf den Ausschluss eines Großteils der hohen Titer-Gruppe zurückführen. Die Ergebnisse erlauben dementsprechend keine valide Aussage.

Tabelle 6. Inzidenzrate eines Sekundärereignisses und Hazard Ratios für Anti-NMDAR GluN1 Antikörper Seropositivität im Schlaganfall mit Antikörperstatus stratifiziert nach Immunglobulin Isotyp³⁸

Tabelle adaptiert aus Sperber et al. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B), *Stroke*, 2019

Status					Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c		Model 3 ^d	
	n	Erg.	IR	95 % CI	HR	95 % CI	HR	95 % CI	HR	95 % CI	HR	95 % CI
Sn	507	76	0,06	0,05 – 0,08	1	(ref.)	1	(ref.)	1	(ref.)	1	(ref.)
IgM	32	10	0,12	0,07 – 0,23	2,05	1,06 – 3,96	2,02	1,04 – 3,91	2,02	1,03 – 3,99	2,03	1,02 – 4,00
IgA	26	7	0,12	0,06 – 0,25	1,98	0,91 – 4,30	2,22	1,02 – 4,84	2,19	0,99 – 4,84	2,20	0,99 – 4,91
IgM & IgA	16	3	0,08	0,02 – 0,24	1,27	0,40 – 4,03	1,21	0,38 – 3,86	1,23	0,38 – 3,94	1,36	0,42 – 4,40

Status, Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serostatus nach Immunglobulin (Ig)-Isotyp; Sn, seronegative Patienten; IgM, Patienten mit nur IgM; IgA, Patienten mit nur IgA; IgM&IgA, Patienten mit simultan IgM und IgA; n, Anzahl; Erg, Alle Ereignisse des kombinierten Endpunkt innerhalb von drei Jahren (erneuter Schlaganfall, Myokardinfarkt, Tod jeglicher Ursache); IR, Inzidenzrate; HR, Hazard Ratio für kardiovaskuläres Rezidivrisiko bis zu drei Jahre nach Schlaganfall im Vergleich zur Referenzgruppe berechnet mit Cox-Regressionen; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall; ref., Referenzgruppe; ^aCrude, unadjustiert; ^bModel 1, adjustiert für Alter und Geschlecht; ^cModel 2, adjustiert für einen Propensity-Score für Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serumpräsenz und jeweils für seropositive Subgruppen gebildet anhand der Variablen Alter, Geschlecht, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, vorbestehender arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt und Vorhofflimmern; ^dModel 3 adjustiert für den o.g. Propensity-Score und zzgl. für Schlaganfallschwere nach dem National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Klassifikation.

2.4. Wesentliche neue Erkenntnisse, Limitationen und Perspektiven

Die wesentlichen Erkenntnisse unserer Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen: Bei Patienten mit erstmaligem mildem oder moderatem ischämischem Schlaganfall ist die allgemeine Serumprävalenz von NMDAR1-Aks ab einem Titer von 1:10 und vornehmlich des IgM und IgA-Isotyps

- 1.) nicht mit funktionellem Outcome nach einem Jahr assoziiert. Patienten mit hohen Titern hingegen, ab einem Cut-off von 1:320, zeigen schlechtes funktionelles Outcome im Vergleich zu seronegativen Patienten.
- 2.) NMDAR1-Aks Serumprävalenz ist mit kardiovaskulärem Rezidivrisiko bis zu drei Jahre nach erstmaligem mildem oder moderatem ischämischem Schlaganfall assoziiert.
- 3.) Wir sehen keine Unterschiede im Verlauf kognitiver Leistung zwischen NMDAR1-Aks seropositiven und seronegativen Patienten bis zu drei Jahre nach erstmaligem mildem oder moderatem ischämischem Schlaganfall. Unsere Daten zeigen keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich des Verlaufs kognitiver Leistung von Patienten mit hohen NMDAR1-Aks Serumtitern über drei Jahre nach Schlaganfall im Vergleich zu seronegativen Patienten. Die beobachteten Effektstärken suggerieren jedoch, dass Patienten mit hohem Titer im Verlauf schlechtere kognitive Leistungen haben.

Wir bestätigen die zuvor berichtete hohe NMDAR1-Aks Serumprävalenz vornehmlich des IgM und IgA Isotyps unabhängig der Krankheitsentität.^{17,18,21,24,25} Die von uns beobachtete Serumprävalenz gibt ferner Hinweise darauf, dass NMDAR1-Aks vor dem Schlaganfallereignis bestanden, da in der gesunden Bevölkerung eine gleichwertige Serumprävalenz beobachtet wurde.^{18,19} Eine nähere Untersuchung bezüglich der Titer-Stabilität in der akuten Phase des Schlaganfalls mit repetitiven Messungen innerhalb schmalere standardisierter Zeitfenster wird zukünftig der Frage nach Präexistenz von NMDAR1-Aks Seropositivität vor dem Schlaganfall näherkommen. Aus unseren Ergebnissen sticht vor allem das erhöhte kardiovaskuläre Rezidivrisiko hervor. Dies sollte in anderen externen Kohorten validiert werden, und es muss geprüft werden, ob sich unsere Ergebnisse auch auf klinische Outcomes schwer betroffener Schlaganfallpatienten übertragen lassen. Ein weiterer Schritt wäre es, den Wert von Serum NMDAR1-Aks als prädiktiven Biomarker für vaskuläres Sekundärrisiko in einem Prädiktionsmodell zu untersuchen, zum Beispiel anhand einer Operationscharakteristik (ROC-Kurve). Weitere Bestrebungen sollten auch hinsichtlich der prädiktiven Relevanz von NMDAR1-Aks Seropositivität für funktionelles und kognitives Outcome nach Schlaganfall stattfinden. Zusammenhänge zwischen NMDAR1-Aks und diesen Outcomes können sich bei schwer betroffenen Schlaganfallpatienten ausgeprägter zeigen. Ferner gibt es bislang wenige Biomarker, die auf den häufig beobachteten schlechten Verlauf kognitiver Leistung bei Schlaganfallpatienten schließen lassen.³⁹ Unsere Daten

Tabelle 7a. Effekte von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper Seropositivität auf TICS-m über drei Jahre nach Schlaganfall aus gemischten Modellen

Serostatus	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c		Model 3 ^d	
	β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI
seronegativ	0	(ref.)	0	(ref.)	0	(ref.)	0	(ref.)
seropositiv	0,38	-1,00 – 1,76	0,15	-1,08 – 1,38	0,42	-1,05 – 1,88	0,30	-1,14 – 1,73
Titer \leq 1:100	1,53	-0,06 – 3,11	0,88	-0,55 – 2,32	1,69	0,02 – 3,37	1,42	-0,23 – 3,08
Titer $>$ 1:100	-2,54	-4,99 – -0,08	-1,63	-3,82 – 0,55	-2,59	-5,14 – -0,04	-2,30	-4,82 – 0,21

Serostatus, Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Anti-körper Serostatus nach Titer-Kategorien; β , Effektstärke: Telephone Interview for Cognitive Status-modified (TICS-m) Differenz über Zeit in Relation zur Referenzgruppe; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall; ref., Referenzgruppe; ^aCrude, unadjustiert; ^bModel 1, adjustiert für Alter, Geschlecht und Schulbildungsjahre; ^cModel 2, adjustiert für einen Propensity-Score für Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serumpräsenation und jeweils für seropositive Subgruppen gebildet anhand der Variablen Alter, Geschlecht, Schulbildungsjahre, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, vorbestehender arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt und Vorhofflimmern; ^dModel 3 adjustiert für den o.g. Propensity-Score und zzgl. für Schlaganfallschwere nach dem National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Klassifikation.

Tabelle 7b. Effektstärken und Varianzen resultierend aus gemischten Modellen zur Untersuchung von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper Seropositivität auf TICS-m über Zeit

Erklärende Variable	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c		Model 3 ^d	
	β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI
Zeit in Jahren	0,69	0,44 – 0,94	0,69	0,44 – 0,94	0,71	0,45 – 0,96	0,70	0,44 – 0,95
Sp vs. Sn	0,38	-1,00 – 1,76	0,15	-1,08 – 1,38	0,42	-1,05 – 1,88	0,30	-1,14 – 1,73
age	–	–	-0,11	-0,14 – -0,08	–	–	–	–
female vs. male	–	–	0,96	0,09 – 1,83	–	–	–	–
Schuljahre: $>$ 10vs. \leq 10	–	–	3,57	2,67 – 4,47	–	–	–	–
Propensity-Score	–	–	–	–	-1,27	-11,78 – 9,25	0,12	-10,37 – 10,61
NIHSS: 5-15 vs. 0-4	–	–	–	–	–	–	-2,10	-3,25 – -0,96
TOAST:CE vs. LAA	–	–	–	–	–	–	0,09	-1,31 – 1,49
TOAST:SVD vs. LAA	–	–	–	–	–	–	-0,13	-1,66 – 1,40
TOAST:UdE vs. LAA	–	–	–	–	–	–	1,41	-1,21 – 4,03
TOAST:UknE vs. LAA	–	–	–	–	–	–	0,89	-0,38 – 2,15
Interindividuelle σ^2	19,32	16,27 – 22,94	13,90	11,50 – 16,80	19,56	16,36 – 23,38	18,59	15,53 – 22,25
Restliche σ^2	9,53	8,46 – 10,73	9,56	8,48 – 10,78	9,72	8,60 – 10,99	9,70	8,58 – 10,97

β , Effektgröße im Vergleich zur Referenzgruppe Sn, seronegative Patienten; vs., versus; Sp, seropositive Patienten; β , Effektstärke: Telephone Interview for Cognitive Status-modified (TICS-m) Differenz über Zeit für die jeweilige Einschlussvariable in Relation zur Referenzgruppe; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall; ref., Referenzgruppe; ^aCrude, unadjustiert ^bModel 1, adjustiert für Alter, Geschlecht und Schulbildungsjahre; ^cModel 2, adjustiert für einen Propensity-Score für Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serumpräsenation und jeweils für seropositive Subgruppen gebildet anhand der Variablen Alter, Geschlecht, Schulbildungsjahre, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, vorbestehender arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt und Vorhofflimmern; ^dModel 3 adjustiert für den o.g. Propensity-Score und zzgl. für Schlaganfallschwere nach dem National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Klassifikation; σ^2 , Varianz

deuten auf einen Lerneffekt im TICS-m bei repetitiven Messungen hin, wie zuvor beschrieben.⁴⁰ Daher ist fraglich, ob ein anderes Messinstrument kognitive Leistung von Schlaganfallpatienten in Zukunft besser widerspiegelt. In der experimentellen Grundlagenforschung müssen die kontroverse Frage zur Funktionalität der IgM und IgA Antikörper endgültig geklärt werden und mögliche Effekte dieser Isotypen auf periphere Zellen untersucht werden, um einem potentiell kausalen Zusammenhang auf den Grund zu gehen. Diesbezüglich wäre es außerdem sinnvoll, Patienten anhand ihres immunologischen Profils zu charakterisieren, da NMDAR1-Aks Seropositivität ein Epiphänomen eines unter Risiko für schlechtes Schlaganfalloutcome stehenden immunologischen Phänotyps sein könnte.

Unsere Studie zeichnet sich durch ihre Größe, eine detaillierte Charakterisierung unserer Patienten und eine umfassende und strukturierte Aufarbeitung der Daten aus. Dennoch sollten bei der Interpretation unserer Ergebnisse folgende wesentliche Limitationen Berücksichtigung finden: Der Einschluss von nur mild-bis-mittelschwer betroffenen Schlaganfallpatienten schränkt die Generalisierbarkeit unserer Ergebnisse ein. Die einmalige Blutentnahme in der akuten Phase des Schlaganfalls lässt eine Dynamik der Serumtiter offen und könnte zur Fehlklassifizierung seropositiver Subgruppen geführt haben (Missclassification Bias). Durch die inkonsistente und unvollständige bildgebende Diagnostik war eine Auswertung bildmorphologischer Parameter als Ergänzung der klinischen Daten nicht möglich. Da wir nicht unter den Todesursachen für unseren kombinierten Endpunkt unterscheiden konnten, ist fraglich, ob das beobachtete erhöhte Rezidivrisiko in NMDAR1-Aks seropositiven Patienten ätiologisch rein vaskulär bedingt ist. Ferner haben wir gegebenenfalls Sekundärereignisse verpasst, die nicht vom Patienten berichtet wurden und in anderen Krankenhäusern versorgt wurden. Für die Auswertung der kognitiven Leistung ist zu beachten, dass das TICS-m nicht für Schlaganfallpatienten validiert ist und eine detaillierte neuropsychiatrische Testung minimale kognitive Einschränkungen besser differenzieren kann. Wie in jeder Observationsstudie können wir eine Verzerrung unserer Ergebnisse durch unbeobachtete Störfaktoren nicht ausschließen und Voreingenommenheit beim Berichten der eigenen Krankheitsgeschichte (Recall Bias) könnte bei den von uns verwendeten Kovariablen eine Rolle gespielt haben.

Insgesamt weist unsere Studie auf eine ungeahnte Relevanz von NMDAR1-Aks Serumprävalenz, vornehmlich des IgM und IgA Isotyps, für ungünstige klinische Outcomes über Jahre nach Schlaganfall hin und eröffnet neue Perspektiven in der Schlaganfallforschung.

Abbildung 3a. Summenwerte des Telephone Interview for Cognitive Status – modified der PROSCIS-B Kohorte über drei Jahre stratifiziert nach NMDAR1-Aks Serostatus

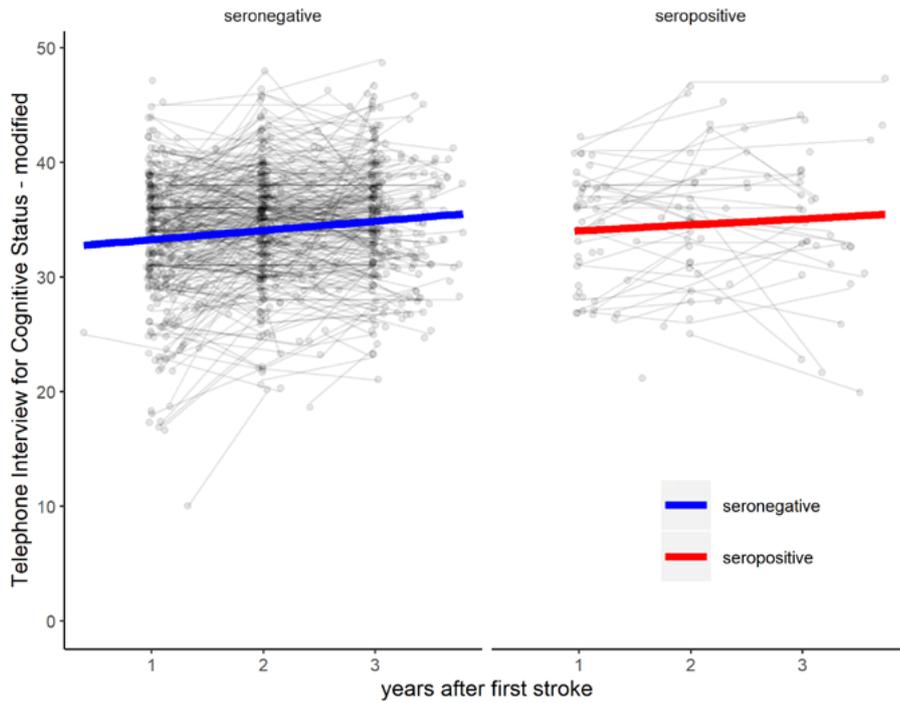


Abbildung 3b. Summenwerte des Telephone Interview for Cognitive Status – modified der PROSCIS-B Kohorte über drei Jahre stratifiziert nach NMDAR1-Aks Serostatus mit seropositiven Untergruppen

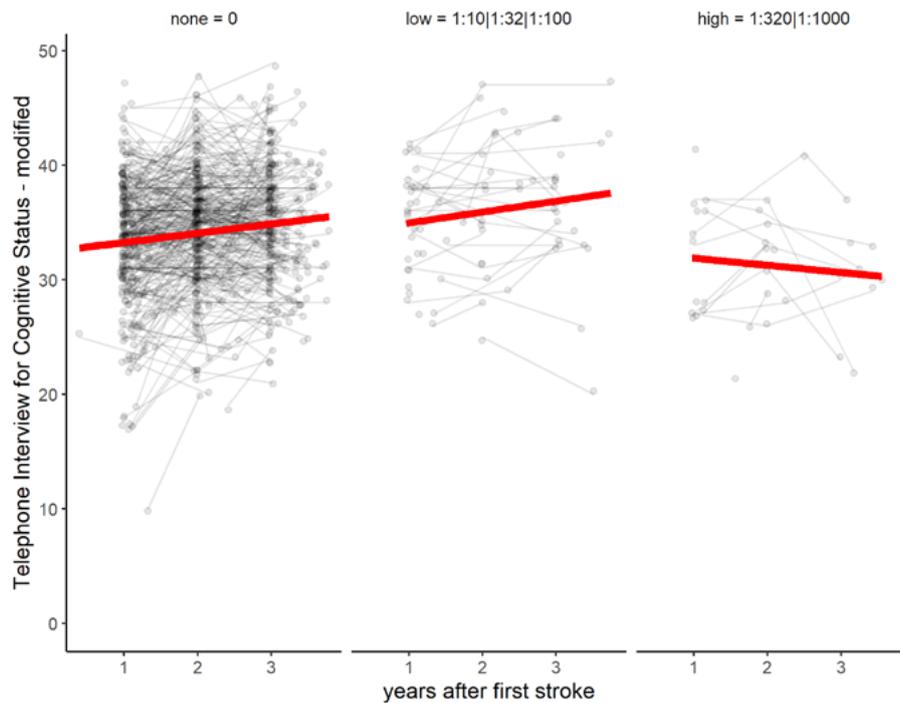


Tabelle 8. Einschlusscharakteristika stratifiziert nach Patienten ohne jegliche TICS-m Messung und mindestens einer TICS-m Messung

	Mind. eine TICS-m Erhebung	Keine einzige TICS-m Erhebung
Teilnehmer <i>n</i> (%)	491 (79)	130 (21)
Anti-NMDAR GluN1 Antikörper seropositive Patienten <i>n</i> (%)	67 (14)	9 (7)
Alter (Jahre) <i>mean</i> (SD)	67 (13)	68 (13)
Alter (Jahre) <i>median</i> (IQR)	69 (58 – 76)	68.5 (56 – 77)
Weiblich <i>n</i> (%)	191 (39)	51 (39)
Systolischer Blutdruck (mmHg) <i>mean</i> (SD)	139 (22)	141 (23)
Diastolischer Blutdruck (mmHg) <i>mean</i> (SD)	77 (14)	77 (16)
History of hypertension <i>n</i> (%)	315 (64)	91 (70)
BMI (kg/m²) <i>median</i> (IQR)	28 (24 bis 30)	27 (25 bis 30)
Gewohnheitsmäßiger Alkoholkonsum <i>n</i> (%)	175 (37)	42 (33)
Raucher <i>n</i> (%)	126 (26)	45 (36)
Gesamtcholesterin (mg/dl) <i>mean</i> (SD)	200 (48)	192 (48)
HDL (mg/dl) <i>mean</i> (SD)	51 (16)	49 (14)
LDL (mg/dl) <i>mean</i> (SD)	124 (41)	116 (39)
Triglyceride (mg/dl) <i>mean</i> (SD)	138 (78)	142 (89)
History of diabetes mellitus <i>n</i> (%)	106 (22)	31 (24)
pAVK <i>n</i> (%)	32 (7)	10 (8)
KHK <i>n</i> (%)	78 (16)	21 (16)
Geschätzte GFR <i>mean</i> (SD)	77 (21)	77 (22)
Vorerkrankt an Vorhofflimmern <i>n</i> (%)	108 (22)	24 (18)
NIHSS <i>median</i> (IQR)	2 (1 – 4)	3 (1 – 5)
NIHSS 0 – 4 <i>n</i> (%)	374 (76)	96 (74)
NIHSS 5 – 16 <i>n</i> (%)	117 (24)	34 (26)
TOAST Makro-angiopathisch <i>n</i> (%)	136 (27)	31 (24)
TOAST Kardioembolisch <i>n</i> (%)	114 (23)	31 (24)
TOAST Mikro-angiopathisch <i>n</i> (%)	73 (15)	23 (16)
TOAST Andere <i>n</i> (%)	21 (4)	1 (1)
TOAST Unbekannt <i>n</i> (%)	147 (30)	44 (34)
mRS bei Einschluss <i>median</i> (IQR)	2 (1 – 3)	2 (1 – 3)
≤ 10 Schuljahre <i>n</i> (%)	421 (68)	51 (67)
> 10 Schuljahre <i>n</i> (%)	171 (28)	24 (32)
MMST <i>median</i> (IQR)	29 (26 – 30)	27 (25 – 29)

Tabelle 8. Legende. Mean, Mittelwert; median, Median; SD, Standard Abweichung; n, Anzahl IQR, Interquartil-Bereich; BMI, Body Mass Index; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; pAVK, periphere arterielle Verschlusskrankheit; KHK, Koronare Herzkrankheit; GFR, glomeruläre Filtrationsrate berechnet mit der Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) Formel; NIHSS, National Institutes of Health Stroke Scale; TOAST, Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment Klassifikation; mRS, modified Rankin Scale; MMST, Mini Mental Status Test.

Tabelle 9. Effekte von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper Seropositivität auf TICS-m über drei Jahre nach Schlaganfall aus gemischten Modellen nach Anwendung der Multiple-Imputation-Methode auf Fehlwerte

Serostatus	Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c		Model 3 ^d	
	β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI
seronegativ	0	(ref.)	0	(ref.)	0	(ref.)	0	(ref.)
seropositiv	0,05	-1,09 – 1,18	-0,10	-1,08 – 0,89	0,06	-1,09 – 1,21	0,14	-0,98 – 1,27
Titer \leq 1:100	0,78	-0,53 – 2,08	0,26	-0,89 – 1,40	0,79	-0,52 – 2,11	0,51	-0,69 – 1,72
Titer $>$ 1:100	-1,89	-3,89 – 0,12	-1,03	-2,76 – 0,71	-1,87	-3,90 – 0,16	-1,58	-3,56 – 0,41

Serostatus, Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serostatus nach Titer-Kategorie; β , Effektstärke: Telephone Interview for Cognitive Status-modified [TICS-m] Differenz über Zeit in Relation zur Referenzgruppe; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall; ref., Referenzgruppe; ^aCrude, unadjustiert; ^bModel 1, adjustiert für Alter, Geschlecht und Schulbildungsjahre; ^cModel 2, adjustiert für einen Propensity-Score für Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serumpräsenz und jeweils für seropositive Subgruppen gebildet anhand der Variablen Alter, Geschlecht, Schulbildungsjahre, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, vorbestehender arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt und Vorhofflimmern; ^dModel 3, adjustiert für den o.g. Propensity-Score und zzgl. für Schlaganfallschwere nach dem National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Klassifikation.

Tabelle 10. Anzahl der Patienten aus PROSCIS-B mit einem ADS-Wert \geq 16

Zeitpunkt	Anzahl Observationen im BC-Szenario n (%)			Anzahl Observationen im WC-Szenario n (%)		
	Sn	Titer \leq 1:100	Titer $>$ 1:100	Sn	Titer \leq 1:100	Titer $>$ 1:100
FU-1	94 (19)	12 (22)	6 (29)	226 (45)	27 (49)	10 (48)
FU-2	88 (17)	12 (22)	4 (19)	266 (53)	28 (51)	12 (57)
FU-3	76 (15)	6 (11)	4 (19)	276 (54)	31 (56)	16 (76)

ADS, Allgemeine Depressionsskala; FU, Follow-Up-Zeitpunkt nach Schlaganfall in Jahren, BC, "Best-Case"-Szenario; WC, "Worst-Case"-Szenario; Sn, Seronegative Patienten; Titer \leq 1:100, Patienten mit niedrigen Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Titern; Titer $>$ 1:100, Patienten mit hohen Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Titern.

Tabelle 11. Effekte von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper Seropositivität auf TICS-m über drei Jahre nach Schlaganfall nach Ausschluss potentiell depressiver Patienten in einem Best-Case und Worst-Case Szenario

Serostatus		Crude ^a		Model 1 ^b		Model 2 ^c		Model 3 ^d	
		β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI	β	95% CI
seronegativ		0	(ref.)	0	(ref.)	0	(ref.)	0	(ref.)
seropositiv	BC	1,00	-0,52 – 2,53	0,72	-0,64 – 2,08	1,22	-0,38 – 2,81	1,11	-0,47 – 2,69
	WC	1,11	-0,40 – 2,61	0,74	-0,58 – 2,06	1,39	-0,19 – 2,96	1,24	-0,32 – 2,80
Titer \leq 1:100	BC	2,09	0,34 – 3,84	1,40	-0,18 – 2,98	2,47	0,65 – 4,28	2,27	0,47 – 4,07
	WC	1,99	0,27 – 3,72	1,18	-0,35 – 2,71	2,40	0,62 – 4,19	2,16	0,39 – 3,93
Titer $>$ 1:100	BC	-1,81	-4,55 – 0,93	-0,97	-3,41 – 1,46	-1,92	-4,80 – 0,96	-1,79	-4,64 – 1,06
	WC	-1,28	-4,02 – 1,47	-0,39	-2,79 – 2,01	-1,29	-4,18 – 1,61	-1,12	-3,99 – 1,74

Serostatus, Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serostatus nach Titer-Kategorien; β , Effektstärke: Telephone Interview for Cognitive Status-modified [TICS-m] Differenz über Zeit in Relation zur Referenzgruppe; 95%CI, 95%iges Konfidenzintervall. ref., Referenzgruppe; ^aCrude, unadjustiert; ^bModel 1, adjustiert für Alter, Geschlecht und Schulbildungsjahre; ^cModel 2, adjustiert für einen Propensity-Score für Anti-NMDA-Rezeptor GluN1 Antikörper Serumpräsenz und jeweils für seropositive Subgruppen gebildet anhand der Variablen Alter, Geschlecht, Schulbildungsjahre, aktueller Raucherstatus, gewohnheitsgemäßer Alkoholkonsum, vorbestehender arterieller Hypertonus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Herzinfarkt und Vorhofflimmern; ^dModel 3, adjustiert für den o.g. Propensity-Score und zzgl. für Schlaganfallschwere nach dem National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) und Schlaganfallsätiologie nach der Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) Klassifikation.

2.5. Literaturverzeichnis

1. Aho K, Harmsen P, Hatano S, Marquardsen J, Smirnov VE, Strasser T. Cerebrovascular disease in the community: results of a WHO collaborative study. *Bull. World Health Organ.* 58, 113–130 (1980).
2. Hankey GJ. Stroke. *Lancet* 389, 641–654 (2017).
3. Zerna C, Thomalla G, Campbell BCV, Rha JH, Hill MD. Current practice and future directions in the diagnosis and acute treatment of ischaemic stroke. *Lancet* 392, 1247–1256 (2018).
4. Katan M, Elkind MS. The potential role of blood biomarkers in patients with ischemic stroke. *Clin. Transl. Neurosci.* 2, 2514183X1876805 (2018).
5. Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2–5 (2009).
6. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400 (2013).
7. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 682–96 (2010).
8. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. 4441. *Trends Neurosci.* 22, 391–397 (1999).
9. Birmingham, K. Future of neuroprotective drugs in doubt. *Nat. Med.* 8, 5 (2002).
10. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 399, 7–14 (1999).
11. Ikonomidou C, Turski L. Personal view Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury ? *Lancet Neurol.* 1, 383–386 (2002).
12. Green TN, Hamilton, J.R. Morel-Kopp M, Zheng Z, Chen TT, Hearn JI, Sun PP, Flanagan JU, Young D, Barber PA, During MJ, Ward CM, Kalev-Zylinska ML. Inhibition of NMDA receptor function with an anti-GluN1-S2 antibody impairs human platelet function and thrombosis. *Platelets* 00, 1–13 (2017).
13. Hogan-Cann AD, Lu P, Anderson CM. Endothelial NMDA receptors mediate activity-dependent brain hemodynamic responses in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201902647 (2019).
14. Hogan-Cann AD, Anderson CM. Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 750–767 (2016).
15. Bozic M, Valdivielso JM. The potential of targeting NMDA receptors outside the CNS. *Expert Opin. Ther. Targets* 19, 399–413 (2015).
16. Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, Baehring JM, Shimazaki H, Koide R, King D, Mason W, Sansing LH, Dichter MA, Rosenfeld MR, Lynch DR. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann. Neurol.* 61, 25–36 (2007).
17. Steiner J, Walter M, Glanz W, Sarnyai Z, Bernstein HG, Vielhaber S, Kästner A, Skalej M,

- Jordan W, Schiltz K, Klingbeil C, Wandinger KP, Bogerts B, Stoecker W. 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 Psych.* 70, 271-278. (2013).
18. Dahm L, Ott C, Steiner J, Stepniak B, Teegen B, Saschenbrecker S, Hammer C, Borowski K, Begemann M, Lemke S, Rentzsch K, Probst C, Martens H, Wienands J, Spalletta G, Weissenborn K, Stöcker W, Ehrenreich H. Seroprevalence of autoantibodies against brain antigens in health and disease. *Ann. Neurol.* 76, 82–94 (2014).
 19. Busse S, Busse M, Brix B, Probst C, Genz A, Bogerts B, Stoecker W, Steiner J. Seroprevalence of n- methyl-d-aspartate glutamate receptor (NMDA-R) autoantibodies in aging subjects without neuropsychiatric disorders and in dementia patients. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 264, 545–550 (2014).
 20. During MJ, Symes CW, lawlor PA, Lin J, Dunning J, Fitzsimons HL, Poulsen D, P. Leone, Xu R, Dicker BL, Lipski J, Young D. An Oral Vaccine Against NMDAR1 with Efficacy in Experimental Stroke and Epilepsie. *Science* (80-.). 2716, (2000).
 21. Zerche M, Weissenborn K, Ott C, Dere E, Asif AR, Worthmann H, Hassouna I, Rentzsch K, Tryc AB, Dahm L, Steiner J, Binder L, Wiltfang J, Sirén AL, Stöcker W, Ehrenreich H. Preexisting Serum Autoantibodies Against the NMDAR Subunit NR1 Modulate Evolution of Lesion Size in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 46, 1180–1186 (2015).
 22. Prüss H, Höltje M, Maier N, Gomez A, Buchert R, Harms L, Ahnert-Hilger G, Schmitz D, Terborg C, Kopp U, Klingbeil C, Probst C, Kohler S, Schwab JM, Stoecker W, Dalmau J, Wandinger KP. IgA NMDA receptor antibodies are markers of synaptic immunity in slow cognitive impairment. *Neurology* 78, 1743–1753 (2012).
 23. Bartels F, Strönisch T, Farmer K, Rentzsch K, Kiecker F, Finke C. Neuronal autoantibodies associated with cognitive impairment in melanoma patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 30, 823–829 (2019).
 24. Castillo-Gómez E, Oliveira B, Tapken D, Bertrand S, Klein-Schmidt C, Pan H, Zafeiriou P, Steiner J, Jurek B, Trippe R, Prüss H, Zimmermann WH, Bertrand D, Ehrenreich H, Hollmann M. All naturally occurring autoantibodies against the NMDA receptor subunit NR1 have pathogenic potential irrespective of epitope and immunoglobulin class. *Mol. Psychiatry* 22, 1776–1784 (2017).
 25. Hara M, Martínez-Hernández E, Ariño H, Armangué T, Spatola M, Petit-Pedrol M, Saiz A, Rosenfeld MR, Graus F, Dalmau J. Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor. *Neurology* 90, E1386–E1394 (2018).
 26. Hatano, S. Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull. World Health Organ.* 54, 541–553 (1976).
 27. Berger, K. Weltermann B, Kolominsky-Rabas P, Meves S, Heuschmann P, Bohner J, Neundorfer B, Hense HW, Buttner T. The reliability of stroke scales: the German version of NIHSS, ESS and Rankin scales. *Fortschr Neurol Psychiatr* 67, 81–93 (1999).
 28. Savio, K, Luca G, Pietra D, Oddone E, Reggiani M, Leone MA. Reliability of the modified Rankin Scale applied by telephone. 5, 6–7 (2013).
 29. Knopman DS, Roberts RO, Geda YE, Pankratz VS, Christianson TJH, Petersen RC, Rocca WA,

- Validation of the telephone interview for cognitive status-modified in subjects with normal cognition, mild cognitive impairment, or dementia. *Neuroepidemiology* 34, 34–42 (2010).
30. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-gordon R, Lynch DR. Anti-NMDA-receptor encephalitic: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 7, 1091–1098 (2008).
 31. Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, Seeholzer SH, Lynch DR. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J. Neurosci.* 32, 11082–11094 (2012).
 32. Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ. Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors. *J. Neurosci.* 25, 3638–3650 (2005).
 33. Ganesh A, Luengo-Fernandez R, Wharton RM, Rothwell PM. Ordinal vs dichotomous analyses of modified Rankin Scale, 5-year outcome, and cost of stroke. *Neurology* 91, e1951–e1960 (2018).
 34. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of Subtype of Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 23, 35–41 (1993).
 35. Greenland, S. Quantifying biases in causal models: classical confounding. *Epidemiology* 14, 300–306 (2003).
 36. Sterne JAC, White IR, Carlin JB, Spratt M, Royston P, Kenward MG, Wood AM, Carpenter JR Multiple imputation for missing data in epidemiological and clinical research: Potential and pitfalls. *BMJ* 339, 157–160 (2009).
 37. Stein J, Luppä M, Mahnke J, Weyerer S, Schomerus G, Riedel-Heller SG. Depressionsscreening am Telefon mittels der Allgemeinen Depressionsskala (ADS): Ergebnisse einer bevölkerungsrepräsentativen Erhebung. *Psychiatr. Prax.* 41, 135–141 (2014).
 38. Sperber PS, Siegerink B, Huo S, Rohmann JL, Piper SK, Prüss H, Heuschmann PU, Endres M, Liman TG. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B). 1–7 (2019).
 39. Pendlebury ST, Rothwell PM. Incidence and prevalence of dementia associated with transient ischaemic attack and stroke: analysis of the population-based Oxford Vascular Study. *Lancet Neurol.* 18, 248–258 (2019).
 40. Katan M, Wright CB, Gardener H, Dong C, Marquez C, DeRosa JT, Cheung K, Sacco RL, Stern Y, Elkind MS. Infectious burden and cognitive performance: The northern Manhattan study. *Stroke* 45, (2013).

III. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

PS Sperber, B Siegerink, S Huo, JL Rohmann, SK Piper, H Prüss, P Heuschmann, M Endres, TG Liman. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B). Stroke, 2019

Für diese Publikation erhob und prozessierte ich Daten, sodass sie plausibel aufbereitet für die Analysen zur Verfügung standen. Ich war wesentlich an Entscheidungen zum Studiendesign dieser Substudie beteiligt und habe die konkreten Fragestellungen aufgestellt. Ich habe die Fallzahlen aufbereitet und den vollständigen Analysenplan unter Supervision konzeptioniert und geschrieben. Die Skripte für jegliche diese Publikation betreffende Datenauswertungen und Analysen wurden von mir mit der jeweiligen Programmiersprache unter Verwendung bestehender Ado-files und Packages geschrieben und ausgeführt. Alle in der Publikation enthaltenden Tabellen und Grafiken und die beinhaltenden Ergebnisse wurden von mir allein erstellt. Ich habe die Ergebnisse interpretiert, das Manuskript geschrieben, überarbeitet und bei der entsprechenden Fachzeitschrift eingereicht.

Datum

Unterschrift

IV. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Pia Sophie Sperber, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema **Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor GluN1 Serumantikörper und klinisches Outcome nach ischämischem Schlaganfall** (englischer Titel: Serum Anti-NMDA-Receptor GluN1 Antibodies and Clinical Outcome after Ischemic Stroke) 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

V. Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **“CLINICAL NEUROLOGY”** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 197 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	LANCET NEUROLOGY	28,671	27.138	0.069040
2	Nature Reviews Neurology	8,095	19.819	0.028090
3	ACTA NEUROPATHOLOGICA	18,783	15.872	0.041490
4	Alzheimers & Dementia	10,423	12.740	0.030040
5	JAMA Neurology	6,885	11.460	0.035270
6	BRAIN	52,061	10.840	0.075170
7	SLEEP MEDICINE REVIEWS	6,080	10.602	0.010720
8	ANNALS OF NEUROLOGY	37,251	10.244	0.053390
9	NEURO-ONCOLOGY	10,930	9.384	0.030350
10	Epilepsy Currents	790	9.333	0.001600
11	MOVEMENT DISORDERS	26,511	8.324	0.037980
12	Translational Stroke Research	2,202	8.266	0.005260
13	NEUROLOGY	88,493	7.609	0.115530
14	NEUROSCIENTIST	4,738	7.461	0.008730
15	JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY AND PSYCHIATRY	29,695	7.144	0.032980
16	STROKE	65,854	6.239	0.088520
17	BRAIN PATHOLOGY	4,952	6.187	0.007750
18	Brain Stimulation	4,263	6.120	0.014510
19	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,654	6.059	0.006350
20	Neurotherapeutics	3,973	5.719	0.008980
21	PAIN	36,132	5.559	0.038000
22	Multiple Sclerosis Journal	10,675	5.280	0.021890
23	SLEEP	20,547	5.135	0.025870
24	EPILEPSIA	26,301	5.067	0.032490
25	Alzheimers Research & Therapy	2,192	5.015	0.008470
26	JOURNAL OF NEUROTRAUMA	14,508	5.002	0.021130
27	JOURNAL OF PAIN	9,264	4.859	0.016890
28	Journal of Stroke	694	4.750	0.002880
28	Therapeutic Advances in Neurological Disorders	1,004	4.750	0.002800
30	JOURNAL OF PSYCHOPHARMACOLOGY	5,808	4.738	0.010900
31	PARKINSONISM & RELATED DISORDERS	8,967	4.721	0.019910
32	NEUROREHABILITATION AND NEURAL REPAIR	5,032	4.711	0.009850
33	Annals of Clinical and Translational Neurology	1,377	4.649	0.006450
34	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY	10,206	4.621	0.019350
35	BIPOLAR DISORDERS	5,070	4.490	0.007870

VI. Publikation

Sperber PS, Siegerink B, Rohmann JL, Huo S, Piper SK, Prüss H, Heuschmann PU, Endres M, Liman TG. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B). *Stroke*. 2019 Nov;50(11):3213-3219.

<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.026100>

VIII. Lebenslauf

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

IX. Publikationsliste

Huo S, Kränkel N, Nave AH, **Sperber PS**, Rohmann JL, Piper SK, Heuschmann P, Landmesser U, Endres M, Siegerink B, Liman TGG. Endothelial and leukocyte-derived microvesicles and cardiovascular risk after stroke-PROSCIS-B. *Neurology*. 2020 Nov 12;10.1212/WNL.00000000000011223.

Rohmann JL, Huo S, **Sperber PS**, Piper SK, Rosendaal FR, Heuschmann PU, Endres M, Liman TG, Siegerink B. Coagulation factor XII, XI, and VIII activity levels and secondary events after first ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2020 Sep 16.

Broersen LHA, Siegerink B, **Sperber PS**, von Rennenberg R, Piper SK, Nolte CH, Heuschmann PU, Endres M, Scheitz JF, Liman TG. High-Sensitivity Cardiac Troponin T and Cognitive Function in Patients With Ischemic Stroke. *Stroke*. 2020 May;51(5):1604-1607

Sperber PS, Prüss H, Siegerink B, Liman TG. Response by Sperber et al to Letter Regarding Article, „Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B)“ *Stroke*. 2020 Feb;51(2):e29.

Sperber PS, Siegerink B, Rohmann JL, Huo S, Piper SK, Prüss H, Heuschmann PU, Endres M, Liman TG. Serum Anti-NMDA (N-Methyl-D-Aspartate)-Receptor Antibodies and Long-Term Clinical Outcome After Stroke (PROSCIS-B). *Stroke*. 2019 Nov;50(11):3213-3219.

X. Danksagung

Die vorliegende Arbeit war nur durch die Unterstützung meiner Familie, Freunde und Kollegen möglich. Ihnen gebühren meine Hochachtung und mein ewiger Dank.

Zunächst möchte ich hier ganz besonders meinen Betreuern Thomas Liman, Bob Siegerink und Matthias Endres herzlich dafür danken, dass sie mich ausgebildet haben, mir zur Seite standen und mich in allen Anliegen jederzeit unterstützt haben. Die Promotion hat mein Interesse an der medizinischen Forschung geweckt und Zukunftsperspektiven für mich eröffnet. Ich bedanke mich auch ganz besonders dafür, dass Achtung und Rücksicht bei unserer Zusammenarbeit immer an erster Stelle standen. Ich empfinde es als großes Glück, dass ich von diesen Menschen betreut wurde.

Shufan Huo, Jessica Rohmann und Sophie Piper möchte ich für den Teamgeist danken, der die Arbeit an der Studie geprägt hat. Besonders hervorzuheben ist hier die entstandene Freundschaft zwischen Shufan und mir, die mich menschlich und fachlich während der Promotion bereichert hat.

Harald Prüß und seiner Arbeitsgruppe danke ich für ihre inhaltliche Unterstützung, Offenheit und stetige Bereitschaft zur Rücksprache und Jane Thümmeler für ihre umfangreiche Unterstützung im Datenmanagement. Außerdem gilt der FAZIT Stiftung – Allgemeine Verlagsgesellschaft mbH ein großer Dank für die finanzielle Unterstützung über das Promotionsstipendium.

Ich bedanke mich privat bei meiner ganzen Familie im Kleinen und Großen dafür, dass ich trotz der Schicksalsschläge immer familiären Zusammenhalt erfahren habe. Meine Familie hat stetig meine Selbstwirksamkeit gestärkt, was der wesentliche Antrieb für die vorliegende Arbeit war. Im Besonderen danke ich hier meinem Vater Gerhard Sperber, der mich und meine Brüder seit dem Tod meiner Mutter allein großgezogen und mich außerordentlich geprägt hat. Ich verdanke ihm so vieles in meinem Leben. Ich danke auch speziell meinem Bruder Ruben Sperber für sein offenes Ohr und Verständnis. Ganz besonders danke ich auch meiner verstorbenen Großmutter Ilse Sperber, die durch ihr großes Herz ein ewiges Vorbild bleibt.

Außerdem möchte ich einen ganz besonderen Dank meinen Freunden aussprechen da ich durch sie immer Rückhalt und Unterstützung erfahren habe. Durch die Diversität meiner Freunde gelingt es mir über Grenzen zu schauen, Möglichkeiten zu erkennen und zu nutzen. An dieser Stelle möchte ich auch nochmal speziell Lasse Güldener danken, da er mir immer eine große Inspiration war, nicht zuletzt im Hinblick auf diese Arbeit. Unser Austausch hat mein Studium und diese Dissertation wesentlich vorangebracht.

Zuletzt möchte ich einen außerordentlichen Dank meinem geliebten Mann Kenn Hartwig aussprechen. Ich bin fasziniert davon, dass ich jedes Detail meines Studiums und dieser Dissertation inhaltlich und strukturell mit ihm besprechen konnte. Er bringt die guten Seiten in mir hervor und kompensiert meine Schwächen und vor allem hat er diese Arbeit durch eine kontinuierliche Entlastung in allen erdenklichen Bereichen und seine beständige emotionale Unterstützung überhaupt erst möglich gemacht.