

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

DISSERTATION

Die Rolle der CD4⁺-T-Zellen an der Pathogenese der Anti-
NMDA-Rezeptor-Enzephalitis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Le Minh Dao

aus Berlin

Datum der Promotion: 03.12.2021

Vorwort

Die hier präsentierten Daten sind Teil einer im Januar 2021 im Journal of Neurology veröffentlichten Publikation:

Dao LM, Machule ML, Bacher P, Hoffmann J, Ly LT, Wegner F, Scheffold A, Prüss H. Decreased inflammatory cytokine production of antigen-specific CD4+ T cells in NMDA receptor encephalitis [published online ahead of print, 2021 Jan 13]. J Neurol. 2021;10.1007/s00415-020-10371-y.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
Abstract	8
1 Einleitung und Fragestellung	10
1.1 N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDAR)	10
1.1.1 Einführung	10
1.1.2 Struktur des NMDAR	10
1.1.3 Struktur der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten	11
1.1.4 Physiologie und Funktion des NMDAR.....	12
1.1.5 NMDAR und neurologische Erkrankungen.....	12
1.2 Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis.....	13
1.2.1 Einführung	13
1.2.2 Klinik der NMDARE	14
1.2.3 Diagnostik.....	15
1.2.4 Therapieansätze.....	16
1.3 Pathogenese der NMDARE	16
1.3.1 Trigger der NMDARE.....	16
1.3.2 Pathophysiologische Relevanz der NMDAR-Antikörper.....	17
1.3.3 Risikofaktoren für NMDAR-Antikörper.....	19
1.3.4 Bindungsdomäne der NMDAR-Antikörper.....	20
1.3.5 Pathophysiologische Relevanz der T-Zellen in der NMDARE.....	20
1.4 Hypothese.....	25
2 Material und Methodik	27
2.1 Labormaterialien	27
2.2 Synthese von extrazellulären Domänen des NMDAR	32
2.2.1 Versuchsaufbau.....	32
2.2.2 Klonierung.....	33
2.2.3 Synthese der Fusionsproteine	35
2.2.4 Proteinnachweis	37
2.3 Studienkohorte.....	39
2.4 Anreicherung antigenreaktiver T-Zellen (ARTE).....	40
2.4.1 Versuchsaufbau.....	40
2.4.2 PBMC-Isolation und Zellzählung	41
2.4.3 Antigenstimulation	42
2.4.4 Magnetische Separation aktivierter Zellen.....	42

2.4.5	Extra- und intrazelluläre Färbung	43
2.4.6	Original-Fraktion (ORI)	44
2.5	Durchflusszytometrie	45
2.5.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie	45
2.5.2	Kompensation	46
2.5.3	Messungen und Gating-Strategie	48
2.6	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Proteinsynthese	52
3.1.1	Agarose-Gelelektrophorese	52
3.1.2	Proteinnachweis	53
3.2	Studienkohorte	56
3.3	Auswertung der Daten aus der Durchflusszytometrie	57
3.3.1	Patienten und Kontrollen zeigen keine Unterschiede in der ORI-Färbung	57
3.3.2	NMDARE-Patienten haben erniedrigte Frequenzen von S1S2- und ATD+S1S2-reaktiven CD154 ⁺ -T-Zellen	58
3.3.3	Verminderte Produktion von inflammatorischen Zytokinen in CD154 ⁺ -T-Zellen von NMDARE-Patienten	61
3.3.4	Verminderte T-Zell-Antwort ist unabhängig von der Immunsuppression	65
4	Diskussion	67
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
4.2	Immunsuppression als Ursache der präsentierten Ergebnisse?	67
4.3	Was bedeutet die verminderte Zytokinproduktion?	68
4.4	Wie verhalten sich CD4 ⁺ -T-Zellen in anderen antikörpervermittelten ZNS-Erkrankungen?	69
4.5	Befinden sich GluN1-reaktive T-Zellen nicht im Blut?	73
4.6	Ist eine CD4 ⁺ -T-Zell-Beteiligung in der Pathogenese der NMDARE nicht notwendig?	73
4.7	Sind NMDA-Antikörper natürlich vorkommende Autoantikörper?	75
4.8	Limitationen und Ausblick	78
4.9	Fazit	79
5	Literaturverzeichnis	81
	Eidesstattliche Versicherung	96
	Lebenslauf	98
	Publikationsliste	100
	Danksagung	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptors und der GluN1	11
Abbildung 2: T-Zell-abhängige Aktivierung der B-Zellen	22
Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Expression von Domänen des GluN1	32
Abbildung 4: Versuchsaufbau zur Anreicherung und Färbung antigenspezifischer CD4 ⁺ -T-Zellen	40
Abbildung 5: Überlappende Emissionsspektren und Kompensation	47
Abbildung 6: Exemplarische Gating-Strategie einer Stimulation mit S1S2	49
Abbildung 7: Exemplarische Gating-Strategie einer ORI-Färbung	50
Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese von Kolonie-PCR-Produkten	52
Abbildung 9: Gelelektrophorese von GST-, ATD- und S1S2-Proteinaufreinigungen	54
Abbildung 10: Dot Blot von Syntheseprodukten und Kontrollen	56
Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der CD4 ⁺ -Zellen in der Original-Fraktion	58
Abbildung 12: CD154-Expression durch CD4 ⁺ -T-Zellen nach Stimulation mit Antigenen	60
Abbildung 13: TNF α -Expression aktivierter CD4 ⁺ -T-Zellen nach Stimulation	63
Abbildung 14: IFN γ -Expression aktivierter CD4 ⁺ -T-Zellen nach Stimulation	64
Abbildung 15: Expression von CD154, IFN γ und TNF α nach Stimulation mit <i>C. albicans</i> -Lysat	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Symptome der NMDARE	15
Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes	34
Tabelle 3: Einstellung des Thermocyclers für die Kolonie-PCR	35
Tabelle 4: Schema zur Herstellung von Sammel- und Trenngelen	38
Tabelle 5: Zusammensetzung des extrazellulären Antikörper-Mixes	43
Tabelle 6: Zusammensetzung des intrazellulären Antikörper-Mixes	44
Tabelle 7: Zusammensetzung des extrazellulären Antikörper-Mixes für die ORI-Färbung	45
Tabelle 8: Laser-, Filter- und Spiegelkonfiguration des FACS Canto II mit Fluorochromen	46
Tabelle 9: Klinische, epidemiologische und therapeutische Informationen der Studienteilnehmer	57

Abkürzungsverzeichnis

Kürzel	Definition
AChR	Acetylcholin-Rezeptor
AK	Antikörper
AMPA	engl. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure
ATD	Aminoternale Domäne
BCA	Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid)
BCR	B-Zell-Rezeptor (engl. B cell receptor)
Bp	Basenpaare
BSA	Serumrinderalbumin (engl. Bovine serum albumine)
C. albicans	Candida albicans
CASPR-2	Contactin assoziiertes Protein 2
CPT	Zellpräparations Röhrchen (engl. Cell Preparation Tube)
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
EAMG	Experimentelle Autoimmun-Myasthenia gravis
ECL	Verbesserte Chemilumineszenz (engl. enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FcR	Fc-Rezeptor
GABA	Gamma-Aminobuttersäure (engl. gamma-Aminobutyric acid)
GAD65	Glutamat-Decarboxylase, Isoform GAD65
GluN1/ NR1	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Untereinheit GluN1
GST	Glutathion-S-Transferase
HCL	TRIS-Hydrochlorid
HEK (cells)	Menschliche embryonale Nierenzellen (engl. Human embryonic kidney cells)
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl. horseradish peroxidase)
HSV	Herpes-Simplex-Virus
hum	human
IFN γ	Interferon γ
IgA, IgM, IgG	Immunglobulin der Klasse A, M oder G
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IVIGs	Intravenöse Immunglobuline
KLH	Schlitzschnecken-Hämocyanin (engl. Keyhole limpet hemocyanin)
LB-Medium	Lysogeny broth - Medium
LGI1	Leucinreiches Gliom inaktiviertes Protein 1
LGI1E	LGI1-Enzephalitis
MACS	Magnetische Zelltrennung (engl. magnetic cell separation)

MG	Myasthenia gravis
mGluR5	Metabotroper Glutamatrezeptor 5
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. Major Histocompatibility Complex)
ms	Maus
NaCl	Natriumchlorid
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NMDARE	Anti-NMDAR-Enzephalitis
NMO	Neuromyelitis optica
ORI	Original-Fraktion
PBMC	Blutmononukleäre Zellen (engl. peripheral mononuclear blood cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PEB	PBS, EDTA, BSA
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOC-Medium	Super Optimal Broth medium with Catabolite repression-Medium
TBE-Puffer	TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer
TBS-Puffer	TRIS-gepufferte Salzlösung
TBST	TRIS-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. T cell receptor)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Treg	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abstract

Ziel: Die anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Enzephalitis (NMDARE) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch pathogene GluN1-spezifische Autoantikörper und deren Bindung an den NMDA-Rezeptor (NMDAR) ausgelöst wird. Eine mögliche T-Zell-Beteiligung an der Pathogenese wurde bisher wenig untersucht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung und Charakterisierung von antigenspezifischen CD4⁺-T-Zellen in NMDARE-Patienten.

Methoden: CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut von 16 Patienten und 23 gesunden Kontrollen gleichen Alters und Geschlechts wurden mit synthetisierten extrazellulären Domänen der GluN1-Untereinheit des NMDAR, dem Schlitzschnecken-Hämocyanin-Neoantigen (KLH) und Lysat von *Candida albicans* (*C. albicans*) stimuliert. Antigen-spezifische CD4⁺-T-Zellen wurden mithilfe des Antigen-reactive T cell enrichment (ARTE) magnetisch angereichert, immunhistologisch gefärbt und im Durchflusszytometer quantifiziert und charakterisiert.

Ergebnisse: NMDARE-Patienten zeigten eine unerwartete Reduktion von GluN1-reaktiven CD154⁺CD4⁺-T-Zell-Frequenzen und eine verminderte Zytokinproduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen nach Stimulation mit *C. albicans* – Lysat und ein nur geringer Unterschied nach Inkubation mit dem Neoantigen KLH, sodass von einer intakten Immunantwort in NMDARE-Patienten ausgegangen werden kann.

Fazit: Die Ergebnisse zeigen eine GluN1-spezifische Reduktion von aktivierten CD4⁺-T-Zellen und Zytokinen in NMDARE-Patienten, was gegen eine Beteiligung von proinflammatorischen NMDAR-reaktiven CD4⁺-T-Zellen an der Genese der Erkrankungen spricht. Diese Befunde sind unabhängig von einer immunsuppressiven Therapie.

Abstract

Objective: The anti-N-methyl-D-aspartate-receptor encephalitis (NMDARE) is an autoimmune disease caused by binding of pathogenic GluN1-specific autoantibodies to the NMDA-receptor (NMDAR). So far there is only limited research on the potential role of T cells in disease development. This study aims to analyse and characterize antigen-specific CD4⁺ T cells in patients with NMDARE.

Methods: CD4⁺ T cells from peripheral blood of 16 patients and 23 healthy age- and sex-matched controls were stimulated with synthesized extracellular domains of the GluN1-subunit of the NMDAR, the neoantigen Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) and lysate of *Candida albicans* (*C. albicans*). Antigen-reactive CD4⁺ T cells were magnetically enriched using Antigen-reactive T cell enrichment (ARTE). After immunohistological staining T cells were analyzed and characterized with flow cytometry.

Results: Patients NMDARE showed an unexpected reduction of GluN1-specific CD154⁺CD4⁺ T cell frequencies and produced less cytokines than controls. There was no difference between both groups after stimulation with *C. albicans* lysate and only a marginal difference after incubation with the neoantigen KLH, suggesting an unaltered immune response in NMDARE patients.

Conclusion: The results show a GluN1-specific reduction of activated CD4⁺ T cells and cytokines in patients with NMDARE which opposes a contribution of proinflammatory NMDAR-reactive CD4⁺ T cell in the pathogenesis of the disease. These findings are independent of immunosuppressive therapies.

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDAR)

1.1.1 Einführung

Die meisten exzitatorischen Synapsen im Gehirn nutzen den Neurotransmitter Glutamat, um elektrische Impulse zwischen Neuronen zu vermitteln. Glutamat aktiviert dabei u.a. den N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor (NMDAR), einen von drei Subtypen der ionotropen Glutamat-Rezeptoren neben den AMPA- (engl. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) und Kainat-Rezeptoren. Der NMDAR kommt vor allem in neuronalen Zellen des Hippocampus und des Großhirns vor und wird auch von nicht-neuronalen Zellen im Gehirn wie Astrozyten, Oligodendrozyten oder Endothelzellen exprimiert (1-3). Er spielt eine Rolle in der Entwicklung vieler neurologischer Krankheiten (s. 1.1.5).

1.1.2 Struktur des NMDAR

Anders als AMPA- und Kainat-Rezeptoren, welche als homotetramere Ionenkanäle durch alleinige Bindung von Glutamat funktionsfähig sind, ist der NMDA-Rezeptor als di-heteromerer Ionenkanal aufgebaut. Dieser besteht typischerweise aus zwei obligatorischen Glycin-bindenden GluN1- in Verbindung mit zwei Glutamat-bindenden GluN2- oder zwei Glycin-bindenden GluN3-Untereinheiten (s. Abbildung 1; A) (4-6). Die NMDAR-Subtypen sind durch die jeweiligen im Rezeptor enthaltenen Untereinheiten definiert, von denen bis heute sieben identifiziert wurden: eine GluN1-, vier GluN2- (A-D) und zwei GluN3- (A, B) Untereinheiten (7-9). Je nach Zusammensetzung besitzen sie individuelle funktionelle Eigenschaften (10). Viele, wenn nicht sogar die meisten NMDAR bestehen aus tri-Heteromeren (z.B. GluN1/GluN2A/GluN2B) im adulten Gehirn, die v.a. im Hippocampus und im Cortex exprimiert werden (11-13). Die Expression der NMDAR-Subtypen ist komplex und variiert z.B. je nach Gehirnregion und ontogenetischer Entwicklungsperiode (14-16) sowie auch zwischen den Neuronen-Typen und auf zellulärer Ebene (7, 16, 17)

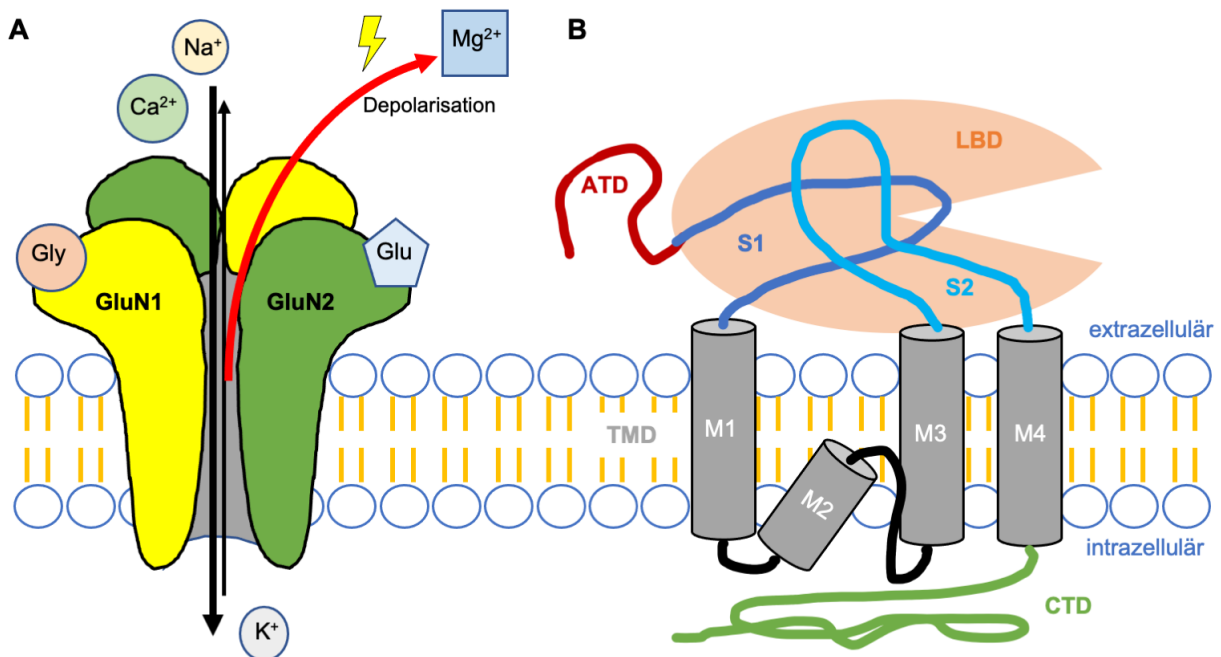


Abbildung 1: Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptors und der GluN1

Ein „klassischer“ NMDA-Rezeptor besteht aus 2 GluN1- (gelb) und 2 GluN2-Untereinheiten (grün). Nach Aufhebung des Magnesiumblocks bei Depolarisation (Mg^{2+} , blaues Quadrat) und Koaktivierung mit Glutamat (Glu, blaues Fünfeck) und Glycin (Gly, oranger Kreis) kommt es zum Einstrom von Calcium (Ca^{2+} , grüner Kreis) und Natrium (Na^{+} , beige Kreis) sowie zum Ausstrom von Kalium (K^{+} , grauer Kreis). Durch den Einfluss von Calcium kommt es zur Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden (A). Ein schematischer Aufbau einer GluN1-Untereinheit ist in (B) dargestellt. Die aminoterminal Domäne (ATD), S1 und S2 sind die extrazellulären Domänen, wobei S1 und S2 zusammen die Liganden-Bindungsdomäne (LBD) bilden. Die transmembrane Domäne (TMD) setzt sich aus den Helices M1, M3 und M4 sowie der Porenschleife M2 zusammen. Nach intrazellulär ragt die C-terminale Domäne (CTD).

1.1.3 Struktur der NMDA-Rezeptor-Untereinheiten

Die tertiäre Struktur der NMDAR-Untereinheiten lässt sich in funktionale Domänen unterteilen (9). Die aminoterminal Domäne (ATD) ist an der Konstruktion der Untereinheit und der Modulation der Ligandenbindungsstelle beteiligt. Glutamat bzw. Glycin interagieren mit dem NMDAR an der extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne bestehend aus den extrazellulären S1- und S2-Regionen. Die transmembrane Domäne besteht aus 3 transmembranen Helices (M1, M3 und M4) und einer wiedereintretenden Porenschleife „p-loop“ (oder M2). Sie fungiert als Ionenkanal und Ionenselektivitätsfilter. Für den Rezeptortransport, die Befestigung und intrazelluläre Signalkaskade ist die intrazelluläre C-terminalen Domäne verantwortlich (s. Abbildung 1; B).

1.1.4 Physiologie und Funktion des NMDAR

Der NMDAR spielt eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität, womit er an Lernprozessen und Gedächtnisbildung beteiligt ist. Die Aktivierung des NMDARE benötigt die gleichzeitige Bindung von Glutamat und Glycin (oder D-Serin) (18, 19) sowie die Aufhebung des Magnesiumblockes durch AMPAR-vermittelte Depolarisation (20). Als Folge kommt es zu einer Öffnung des Ionenkanals mit Einstrom von Calcium, welches intrazelluläre Signalkaskaden anstößt (s. Abbildung 1; A). Ein Beispiel ist die intrazelluläre Aktivierung der Calcium-Calmodulin-Kinase II durch Calcium, welches AMPAR phosphoryliert und somit durch Sensitivitätssteigerung des Rezeptors für Glutamat die postsynaptische Antwort verstärkt (21). Somit ist der NMDAR ein wesentlicher Bestandteil der grundlegenden Funktionsweise von Neuronen, weshalb er für die Langzeitpotenzierung unabdingbar ist. Daneben sind NMDAR auch an der Gehirnentwicklung (14, 16, 22), Verhaltensbildung (23), dem neuronalen Überleben (24) und anderen Formen der Gedächtnisbildung wie z.B. räumliches Lernen beteiligt (25). Die genannten Mechanismen wurden hauptsächlich an GluN2A- oder GluN2B-haltigen Subtypen untersucht. Bei unterschiedlicher Zusammensetzung zeigen die NMDAR-Subtypen abweichende Eigenschaften. Als Heterotrimer GluN1/GluN2/GluN3 zeigt der Rezeptor z.B. eine deutlich verminderte Ca^{2+} -Permeabilität (26-28) und bildet als GluN1/GluN3-Heterodimer einen Glutamat-unabhängigen exzitatorischen Glycin-Rezeptor (6).

1.1.5 NMDAR und neurologische Erkrankungen

Demgegenüber stehen Dysfunktionen des NMDAR, die mit einer Vielzahl an neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Schizophrenie oder NMDARE assoziiert werden. In der Schlaganfallforschung wurde die zentrale Rolle der Exzitotoxizität von NMDAR beschrieben. Nach zerebraler Ischämie kommt es zu einer Steigerung der Glutamat-Konzentrationen im Gehirn mit übermäßiger Aktivierung von NMDAR, die zu neuronalem Zelluntergang führt (29, 30). Passend zu diesen Arbeiten zeigten NMDAR-Antagonisten eine neuroprotektive Wirkung im Tiermodell (29). Auch in der Alzheimer-Forschung wird von einem Zusammenhang mit NMDAR ausgegangen. Untersuchungen konnten einen Zusammenhang zwischen GluN2B-haltigen NMDAR und einer schädigenden Wirkung durch β -Amyloid feststellen (31). Die Therapie der Alzheimer-Demenz erfolgt u.a. mit Memantin, einem NMDAR-

Antagonisten (32). In Tiermodellen des M. Parkinson konnte eine verstärkte synaptische Expression von GluN2A- sowie eine Umverteilung von GluN2B-Untereinheiten von synaptisch nach extrasynaptisch festgestellt werden (33). Schizophrenie-ähnliche Symptome werden u.a. von NMDAR-Antagonisten verursacht (34) und in Tiermodellen mit reduzierter NMDAR-Expression (35) bzw. mit Deletion von NMDAR aus bestimmten GABAergen Interneuronen (36) beobachtet.

1.2 Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis

1.2.1 Einführung

Im Jahr 2007 fielen 12 Frauen zwischen 14 und 44 Jahren aufgrund ihrer prominenten psychiatrischen Symptome, kognitiven Defizite, Dyskinesien, autonomen Dysfunktionen und qualitativen Bewusstseinsstörungen auf, weil sie alle Antikörper gegen den NMDAR mit im Serum und Liquor besaßen. Damit wurde 2007 die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis (NMDARE) erstbeschrieben (37). Ihre anfängliche Relevanz ließ sich nur schwer einschätzen. Sie ist nach der akuten disseminierten Enzephalomyelitis womöglich die zweithäufigste und mit am besten charakterisierte Autoimmunenzephalitis (38), dessen Inzidenz einzelner viral bedingter Enzephalitiden übertrifft (39, 40). In einer retrospektiven Studie repräsentierte die NMDARE 1% aller Aufnahmen junger Patienten zwischen 18 und 35 Jahren auf der Intensivstation (39).

Dabei ist das Konzept von Autoimmunität durch Effektoren wie Antikörper oder zytotoxischen T-Zellen in der Neurologie nicht neu. Bereits 1965 (41) bzw. 1968 (42) wurden frühe Fälle von paraneoplastischen „Enzephalomyelitiden“ oder „limbischen Enzephalitiden“ in Fallserien beschrieben. Schon vor diesen Fallserien wurde 1961 im Zusammenhang mit Enzephalomyelitis und karzinomatöser Neuropathie die Möglichkeit einer immunvermittelten Genese diskutiert (43). Daraus folgte die Beschreibung einer Reihe von Enzephalitiden mit Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene, wie z.B. die anti-Hu assoziierte Enzephalitis 1985 (44) oder die Anti-Yo assoziierte Enzephalitis (45). Bei diesen Formen mehren sich jedoch die Hinweise auf eine T-Zell-vermittelte zytotoxische Genese (46, 47), sodass die Antikörper in diesen Fällen eher als Epiphänomen zu werten sind. Aber auch Fälle von antikörpervermittelten neurologischen Störungen sind schon länger bekannt. So konnte beispielsweise dem Acetylcholin-Rezeptor (AChR)-Antikörper bei Myasthenia gravis bereits 1976 eine pathologische Rolle in der Störung des

neuromuskulären Übergangs nachgewiesen werden (48). Die NMDARE verblieb nicht die einzige durch Antikörper vermittelte Enzephalitis. Seither wurden immer mehr autoimmune Enzephalitiden neu beschrieben, die u.a. mit Antikörpern gegen AMPA-Rezeptoren (49), GABA_A-Rezeptoren, GABA_B-Rezeptoren (50, 51), Dopamin-2-Rezeptoren (52), mGluR5 (53), LGI1 (54, 55), CASPR-2 (55) oder GAD65 (56) assoziiert sind. Die Entdeckung dieser autoimmunen Enzephalitiden betrifft viele Felder der Medizin und führte auch zu einem Paradigmenwechsel in der Diagnostik neuropsychiatrischer Störungen (57).

1.2.2 Klinik der NMDARE

Demographie

Insgesamt sind ungefähr 80% der NMDARE-Patienten Frauen. Das mediane Alter bei Krankheitsbeginn beträgt 21 Jahre, dabei waren ca. 40% der Patienten jünger als 18 Jahre (58). Die Erkrankung kann aber auch Kinder (58, 59) oder Patienten älter als 45 Jahre betreffen. Bei älteren Patienten verläuft sie meist milder, führt jedoch häufig zu komplizierteren Verläufen (60). Bei fast 40% der Patienten lassen sich Tumore feststellen, die meisten davon sind Frauen mit Ovarialteratomen (58). Zudem wird die NMDARE auch mit anderen Neoplasien wie z.B. neuroendokrinen Tumoren (61, 62) und Lungenkarzinomen (kleinzellige Lungenkarzinome und Adenokarzinome) (63, 64) assoziiert.

Symptomatik

Klinisch wird die NMDARE mit einer typischen Symptomatik bei Erwachsenen (37, 57, 58, 65-70) und einem phasenweisem Verlauf assoziiert, die in der Spätphase zu einer intensivmedizinischen Behandlung führen kann. Dabei kommt es am Anfang der Krankheit zu altersbedingten Unterschieden. Während Kinder häufig durch Symptome wie epileptische Anfälle, Dyskinesien und Insomnie auffällig werden, leiden Erwachsene anfangs meist an Verhaltensstörungen und Psychosen. Innerhalb von vier Wochen entwickeln die meist ein ähnliches Spektrum an Symptomen unabhängig vom Alter. Nur ungefähr 1% der Erkrankten verbleibt monosymptomatisch (58). Vereinzelt wurden auch andere Symptome beschrieben (s. Tabelle 1).

Zeitraum Typische Symptomatik

In Anlehnung an Abbildung 1 aus Kayser, 2011 (68)

~1 Woche	<ul style="list-style-type: none">• Prodromalphase: Fieber, Kopfschmerzen, Myalgien, Übelkeit/Erbrechen, Diarrhoe, Erkältungssymptome
Tage bis Wochen	<ul style="list-style-type: none">• Psychiatrische Symptome: Ängstlichkeit, Agitiertheit, Verhaltensänderungen (Verhaltenslabilität, Aggressivität), Halluzinationen, Wahnvorstellungen, paranoide Gedanken, desorganisiertes Denken, Sprachstörungen, mnestiche Störungen• Epileptische Anfälle
Wochen bis Monate	<ul style="list-style-type: none">• neurologische Symptome: (orofaziale) Dyskinesien, epileptische Anfälle• autonome Instabilität: Hyperthermie, Blutdruckschwankungen, Herzrhythmusstörungen (Tachy-, Bradykardie, kardiale Pausen), zentrale Hypoventilation• quantitative Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma
Monate bis Jahre	<ul style="list-style-type: none">• prolongierte Defizite: Störungen der Kognition und des Verhaltens (z.B. Impulsivität und Desinhibition), Schlafstörungen

Untypische Symptome

Insomnie (71), Late-onset Autismus (72), Fieber unklaren Ursprungs (73), Status epilepticus (74), Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (75, 76), Anorexia nervosa (77)

Tabelle 1: Symptome der NMDARE

1.2.3 Diagnostik

Die Erkrankung sollte im Allgemeinen bei Patienten vermutet werden, die mehrere der oben genannte Symptome in kurzer Zeit entwickeln (57). Ein wichtiger Teil der Diagnostik besteht im Nachweis von NMDAR-Antikörper im Serum oder Liquor, wobei ein positiver Nachweis von IgG-GluN1-Antikörper im Liquor die Diagnose der NMDARE bestätigt (57, 78-83). Generell sind intrathekale NMDAR-Antikörper-Titer intraindividuelle Biomarker, die mit der Symptomatik und der klinischen Remission korrelieren (66, 78). Häufig finden sich weitere Veränderungen im Liquor (67), in der Elektroenzephalographie (66) und in der Bildgebung (59, 66). Zudem wird eine Suche nach Ovarialteratomen oder anderer Tumore empfohlen (59, 66, 67). Die Schwierigkeiten in der Diagnose der Autoimmunenzephalitiden haben 2016 zu der Entwicklung von diagnostischen Kriterien durch eine Gruppe von Experten geführt (57, 84).

1.2.4 Therapieansätze

Es existieren bisher keine prospektiv-randomisierten Studien zur Therapie der NMDARE, weshalb die Therapieentscheidung individuell an Patientenalter, -situation und Begleiterkrankungen angepasst werden sollte. Unter der Prämisse einer immunvermittelten Genese der Erkrankung wird sie meist mit immunsuppressiven/-modulierenden Medikamenten behandelt und ggf. vorliegende Tumore reseziert (58, 59, 85, 86). Die größte dazu publizierte Arbeit wurde 2013 als retrospektive Studie mit 501 Patienten veröffentlicht, deren Therapie und Therapieerfolg analysiert werden konnte (58). 94% der NMDARE-Patienten erhielten eine immunsuppressive Primärtherapie (Glucocorticoide, intravenöse Immunglobuline, Plasmapherese) oder eine Tumorresektion, welche innerhalb von 4 Wochen zu einer Verbesserung für mehr als die Hälfte der Patienten führte. Bei ausbleibendem Therapieerfolg profitierten die Meisten von einer Zweitlinienimmuntherapie mit Rituximab oder Cyclophosphamid (58, 87). 75-80% der Patienten erholen sich vollständig oder verbleiben mit nur milden neurologischen Defiziten (58, 66). Patienten können eine intensivmedizinische Behandlung über mehrere Wochen oder Monate benötigen (58, 66). Bis zu 7% der NMDARE-Patienten versterben (66, 88).

1.3 Pathogenese der NMDARE

1.3.1 Trigger der NMDARE

Schon die Erstbeschreibung der NMDARE legte eine autoimmune Genese nahe, bei der eine Immunreaktion gegen Tumore zu einer Bildung von spezifischen NMDAR-Antikörpern führt, welche mit neuropsychiatrischen Symptomen einhergingen (37). So wurde früh vermutet, dass der ektop exprimierte NMDA-Rezeptor durch seine Kollokalisierung z.B. in Ovarialteratomen im Rahmen der Immunreaktion zur Bildung von NMDAR-spezifischen Antikörper führte. Unterstützung findet die Hypothese u.a. in der Beobachtung, dass in Teratomen von NMDARE-Patienten anders als in Kontrollen atypische Neurone gefunden wurden, in deren Nähe sich zudem inflammatorisches Infiltrat befand (89).

Es stellte sich jedoch früh heraus, dass die NMDARE auch ohne vorliegende Neoplasie bzw. als nicht-paraneoplastisches Geschehen vorkommen kann (66, 90). Vor allem bei Kindern unter zwölf Jahren und männlichen Patienten lassen sich seltener Tumore

nachweisen (58). In folgenden Publikationen wurde zudem die Herpes-Simplex-Virus (HSV)-Enzephalitis als Auslöser der NMDARE bestätigt (91, 92). In einer prospektiven Beobachtungsstudie mit 51 eingeschlossenen an HSV-Enzephalitis-Patienten entwickelten mehr als ein Viertel zwei bis 16 Wochen später eine Autoimmunenzephalitis, 64% davon eine NMDARE (93). Unterstützt werden diese Beobachtung von einem Mausmodell der NMDARE, die durch eine HSV-1-Enzephalitis induziert wird (94). Insbesondere bei Kindern werden ferner Virusinfektionen z.B. mit Varizella-Zoster-Virus (95), Parvovirus B19 (96), Masernvirus (97), Densovirus (98) und Japanische-Enzephalitis-Virus (99) als Trigger der NMDARE diskutiert, sodass die Möglichkeit einer polyspezifischen B-Zellaktivierung bei genereller Inflammation des zentralen Nervensystems (ZNS) in Betracht gezogen werden kann. Ähnliche Beobachtungen wurden auch schon bei anderen Arten der ZNS-Inflammation gemacht. Bei der Multiplen Sklerose wird beispielsweise in ca. 90% der Patienten eine „MRZ-Reaktion“ mit intrathekalen Synthesen von Antikörpern gegen Masern, Röteln, Varizella-Zoster-Virus und HSV beobachtet (100). Auch das beobachtete saisonale Auftreten der pädiatrischen NMDARE deutet auf eine virale Ursache hin (101).

1.3.2 Pathophysiologische Relevanz der NMDAR-Antikörper

Die Rolle der NMDAR-Antikörper wurde zeitgleich mit der Entdeckung der NMDARE als ätiopathologische Ursache diskutiert, da die Symptome der Patienten mit Antikörpertitern korrelierten und IgG-Ablagerungen im Hippocampus und in der Amygdala gefunden wurden (37). Ein weiteres Argument für antikörpervermittelte Prozesse war das relativ gute Ansprechen der Patienten auf eine immunsuppressive Therapie wie Plasmapherese oder IVIGs. „Klassische“ paraneoplastische limbische Enzephalitiden wie die anti-Hu und anti-Yo assoziierte Enzephalitis mit T-Zellvermitteltem neuronalem Schaden sprechen meist gar nicht oder nur minimal auf eine immunsuppressive Therapie an (102, 103).

Im Laufe der Jahre mehrten sich die Anzeichen für eine antikörpervermittelte Pathogenese. Erste Hinweise ergaben sich durch im Liquor befindliche oligoklonale Banden und erhöhte Proteine (66) sowie das Vorfinden von antikörperproduzierenden Zellen im Gehirn (104, 105), was eine intrathekale Synthese der Antikörper suggeriert (66, 106). Zudem zeigte sich eine Korrelation zwischen dem NMDAR-Antikörper-Titer und der Schwere der Symptomatik (67, 78, 107).

Im Jahr 2010 konnte eine vom Antikörper-Titer abhängige selektive und reversible Internalisierung synaptischer und extrasynaptischer NMDAR nach Bindung von anti-NMDAR-IgG nachgewiesen werden, ohne dass es zu einer Veränderung der Synapsenzahl, der Dendritenstruktur oder zum Zelluntergang kommt (108). Auch ein Komplement-vermittelter Mechanismus konnte ausgeschlossen werden (104), weshalb von einem direkten pathologischen Effekt durch Antikörper ausgegangen werden konnte. Tierexperimente unterstützen die pathophysiologische Rolle der NMDAR-Antikörper. So führte die Behandlung von Nagetierneuronen mit Patientenliquor über extrazelluläre domänenabhängige Mechanismen zur Reduktion von synaptischen NMDAR, welche mit einer Blockierung der Langzeitpotenzierung einherging (109). Mäuse, die eine intraventrikuläre Infusion von Patienten-Antikörper erhielten, zeigten reversible mnestiche Defizite, anhedonische und depressive Verhaltensänderungen mit parallelem Nachweis von NMDAR-Antikörpern im Gehirn der Tiere (110). 2016 gelang die Generierung von monoklonalen GluN1-Antikörpern aus Gedächtnis-B-Zellen im Patientenliquor. Eine Bindung dieser Antikörper an ATD des NMDAR war ausreichend, um morphologische und elektrophysiologische Veränderungen durch Herunterregulation von NMDAR herbeizuführen (111), ohne dass andere Faktoren wie z.B. anti-neuronalen Antikörpern oder eine Komplementaktivierung notwendig waren. Interessanterweise wiesen aus Patientenliquor gewonnene GluN1-Antikörper nur wenige bis keine somatische Hypermutation auf, die in etablierten in-vitro Assays pathogen waren (112). Ein weiterer Hinweis für die pathophysiologische Relevanz der NMDAR-Antikörper wird aus Beobachtungen eines transplazentaren Transfers von NMDAR-Antikörpern von schwangeren Patientinnen auf das Embryo ersichtlich (113, 114). In einem systematischen Review mit 13 schwangeren NMDARE-Patientinnen wiesen 10 Neugeborene neurologische Defizite auf (115). Zwei der Patientinnen hatten Fehlgeburten unklarer Ursache und eine Patientin musste aufgrund der bilateral vorliegenden Teratome die Schwangerschaft abbrechen. Unterstützt werden die Beobachtungen durch Tierstudien, in denen monoklonale NMDAR-Antikörper aus Patienten schwangeren Mäusen injiziert wurden. Der Nachwuchs präsentierte sich mit einer erhöhten postnatalen Mortalität, zeigten Verhaltensänderungen und wiesen verminderte Hirnvolumina auf (116).

Lange Zeit galt daher das Paradigma, dass IgG-NMDAR-Antikörper pathognomisch für die NMDARE sind. Überraschenderweise wurden in den letzten Jahren Arbeiten veröffentlicht, die diesen Ansatz zumindest teilweise relativieren. In insgesamt mehr als

5000 gesunden und kranken Individuen wurde eine altersabhängige GluN1-spezifische Antikörper Seroprävalenz für IgM, IgA und IgG von bis zu mehr als 20% beobachtet (117). Untersucht wurden Proben von Patienten die an neuropsychiatrischen (z.B. Schizophrenie, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, Schlaganfall, etc.) oder auch an häufigen Erkrankungen wie z.B. arterieller Hypertonie oder Diabetes mellitus litten (117-121). Unabhängig der Vorerkrankungen haben 10% der 40-Jährigen und 20% der 80-Jährigen NMDAR-Antikörper im Serum. Es zeigten sich unabhängig von Vorerkrankungen mit Gesunden vergleichbare Antikörpertiter und Verteilungen der Immunglobulinklassen (117). Eine Auswahl isolierter Serum-Antikörper, auch die von Gesunden und unabhängig der Immunglobulinklasse, bewirkte in in-vitro-Experimenten eine Internalisierung von NMDAR und folglich messbare elektrophysiologische Veränderungen (117). Die klinische Relevanz von IgA NMDAR-Antikörper im Serum wurde schon 2012 diskutiert, als in Patienten mit progressiver Dysfunktion unklarer Ätiologie IgA-Antikörper gefunden wurden (122). Relativiert werden diese Beobachtungen von einer 2018 veröffentlichten Studie mit 300 neuropsychiatrisch erkrankten Individuen (darunter auch Patienten mit NMDARE), in denen IgA- und IgM-NMDAR-Antikörper nur selten und unspezifisch im Serum beobachtet wurden (83). Es bleibt weiterhin offen, welche Rolle NMDAR-Antikörper in Gesunden besitzen.

1.3.3 Risikofaktoren für NMDAR-Antikörper

Es stellt sich die Frage, welche Faktoren für die Bildung von NMDAR-Antikörper prädisponieren. Mit der Entdeckung der NMDARE bestand die Vermutung einer pathognomonischen Relevanz von NMDAR-Antikörper im Rahmen eines paraneoplastischen Geschehens (37). Wie jedoch bereits oben beschrieben wurden weitere Trigger der Erkrankung, v.a. Tumorerkrankungen und virale Infektionen diskutiert. Unabhängig von der Enzephalitis wurden z.B. die Influenza A- oder B- Infektionen (121), zunehmendes Alter (117) und genetische Komponenten als Risikofaktoren für eine erhöhte Seroprävalenz von NMDAR-Antikörpern identifiziert. In einer genomweiten Assoziationsstudie konnte die Variante rs524991, relevant in der NMDAR-Biologie, mit NMDAR-Antikörpern assoziiert werden (121).

1.3.4 Bindungsdomäne der NMDAR-Antikörper

Ein weiterer Aspekt, der sich mit der Erforschung der NMDARE stellt, ist das Epitop der Antikörper. Als eine Bindungsstelle der Autoantikörper wurde früh die GluN1-Untereinheit des NMDAR vermutet, da schon in der Erstbeschreibung eine Kolokalisation von NMDAR beobachtet wurde, von der zugleich der Name der Erkrankung abgeleitet wurde (37). In späteren Jahren veröffentlichte Arbeiten stellten fest, dass die extrazelluläre aminoterminal Domäne der GluN1-Untereinheit des NMDAR als Epitop notwendig und ausreichend für die Bindung von NMDAR-Antikörpern aus NMDARE-Patienten ist und dabei die Region N368/G369 eine entscheidende Rolle einnimmt (111, 123).

Neue Publikationen mit NMDAR-Antikörpern aus Seren von gesunden und kranken Individuen beobachten jedoch auch weitere Bindungsdomänen. Dazu gehören Epitope der extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne und ATD, aber auch der intrazellulären C-terminalen Domäne sowie der extra große Porendomäne (M1, M2, M3). NMDAR-Antikörper Seropositivität war in der Hälfte der untersuchten Seren polyklonal/polyspezifisch und wahrscheinlich mono- oder oligoklonal in der anderen Hälfte. Es konnte kein krankheitsspezifisches Muster gefunden werden. Auch waren die Epitope innerhalb der untersuchten Gruppen (erkrankt und gesund) vergleichbar (117).

1.3.5 Pathophysiologische Relevanz der T-Zellen in der NMDARE

Die Rolle der T-Zellen im Immunsystem

Welche Rolle spielen T-Zellen bei der Pathogenese der NMDARE? Dazu muss die Rolle der T-Zellen im Immunsystem betrachtet werden. Das Immunsystem reagiert gegen ein fremdes Antigen typischerweise mit einem zweizeitigen Verlauf. Beim Erstkontakt mit einem fremden Antigen kommt es initial zu einer unspezifischen z.B. durch Makrophagen- oder das Komplementsystem-vermittelten Immunreaktion, welche in eine hochspezifische adaptive Immunantwort übergeht. In der adaptiven Immunantwort nehmen B- und T-Zellen eine zentrale Rolle ein. B-Zellen sind in der Lage zu Plasmazellen zu differenzieren und Antikörper zu sezernieren. Deren Beteiligung an der Pathogenese der NMDARE wurde bereits erörtert (s. 1.3.2). T-Zellen werden in zwei Hauptpopulationen eingeteilt: die CD4-exprimierenden T-Helferzellen (T_H-Zellen) und die CD8-exprimierenden zytotoxischen T-Zellen, welche mit ihrem T-Zell-Rezeptor ihr spezifisches Antigen auf Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Molekülen erkennen. TCR entstehen durch die zufällige somatische Rekombination von V-, D- und J-

Gensegmenten, wodurch jeder individuelle TCR eine einzigartige Antigenpezifität besitzt. Reife CD8⁺-T-Zellen erkennen mit ihrem TCR Peptide von fremden Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen, welche von körpereigenen Zellen präsentiert werden, und sind darin spezialisiert, infizierte Zellen zu eliminieren. Sie gehören zur adaptiven zellulären Immunantwort. Für die adaptive humorale Immunantwort sind CD4⁺-T-Zellen unabdingbar. Sie aktivieren B-Zellen und führen zu einer Produktion von antigenspezifischen hochaffinen Antikörpern: Antigenpräsentierende Zellen (z.B. dendritische Zellen und B-Zellen) nehmen Antigene auf und präsentieren Peptidfragmente dieser Antigene über das MHC-II-Molekül auf der Zelloberfläche (124). Die TCR-Bindung mit dem MHC-II/Peptid-Komplex aktiviert antigenspezifische CD4⁺-T-Zellen, welche darauf u.a. den CD40-Liganden (CD40L, auch CD154) auf der Zelloberfläche exprimieren (125). Durch die darauffolgende Sekretion von Zytokinen und die Bindung von CD154 mit CD40 auf der B-Zelloberfläche kommt es zur B-Zell-Aktivierung mit Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen (s. Abbildung 2) (126). Intrazellulär führt die Aktivierung zu einem Isotypenklassenwechsel der Immunglobuline und zu somatischen Hypermutationen in den hypervariablen Bereichen der Antikörper. Als Folge werden antigenspezifische hochaffine IgA, IgE oder IgG gebildet, während in der primären Immunantwort hauptsächlich weniger affine IgM-Antikörper gebildet wurden (127). Die Notwendigkeit der CD40-CD154-Interaktion wird durch Tierexperimente verdeutlicht, bei denen der Isotypenklassenwechsel in CD40- (128) oder CD154-defizienten Mäusen (129) ausblieb.

CD4⁺-Zellen sind aber auch an der Regulierung anderer Immunzellen wie z.B. Makrophagen, CD8⁺-T-Zellen und neutrophilen Granulozyten beteiligt und können die Immunreaktionen auch supprimieren. Um dieses weite Aufgabenspektrum zu erfüllen, sezernieren CD4⁺-T-Zellen unterschiedliche Zytokine, anhand derer T_H-Zellen in unterschiedliche Untergruppen eingeteilt werden. T_H1-Zellen mit den Leitzytokinen Interferon- γ (IFN γ) und Interleukin (IL)-2, T_H2-Zellen mit ihrem Leitzytokin IL4 und regulatorische T-Zellen (Treg) gehören zu den am besten untersuchten CD4⁺-T-Zellen. T_H1-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Immunreaktion gegen intrazelluläre Krankheitserreger und führen zu einer verstärkten zellulären Immunantwort und zum Klassenswitch zu IgG. Die T_H2-Zell-Antwort richtet sich meist gegen extrazelluläre Krankheitserreger und geht mit einer starken humoralen Immunantwort mit Klassenswitch zu IgE einher (130). Neben diesen eher proinflammatorischen T-Zellen existieren auch IL-10- und TGF β -produzierende Tregs, die die Immunreaktion

supprimieren (131). Immunzellen und Zytokine vermitteln dabei nicht immer entweder pro- oder anti-inflammatorische Immunreaktionen. Während Zytokine wie z.B. $\text{TNF}\alpha$, IL-17 und $\text{IFN}\gamma$ eine eher proinflammatorische Wirkung besitzen (130, 132), führt die Kombination des eigentlich antiinflammatorischen $\text{TGF}\beta$ mit IL-6 zu einer Differenzierung naiver T-Zellen zu pro-inflammatorischen $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen (133). Die Richtung der Immunantwort ist von der Summe der beteiligten Immunzellen und Zytokine abhängig. In der adaptiven Immunantwort kommt es neben der Bildung von den beschriebenen Effektor-T-Zellen, die die Immunreaktion akut mediiieren, auch zur Ausbildung eines Immungedächtnisses in Form von Gedächtnis-B- und T-Zellen. Bei erneutem Antigenkontakt lassen sich diese Gedächtniszellen leichter und schneller aktivieren, wodurch ein Schutz auch noch Jahre nach dem ersten Kontakt gewährleistet wird (134). Gedächtnis-T-Zellen lassen sich u.a. über die CD45RO-Expression von naiven CD45RA^+ -T-Zellen unterscheiden (135).

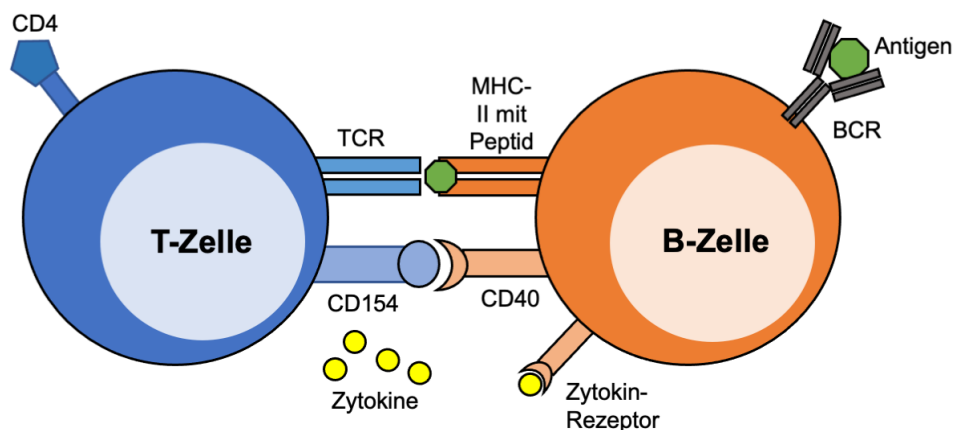


Abbildung 2: T-Zell-abhängige Aktivierung der B-Zellen

Die CD4-exprimierende T_H -Zelle bindet mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) das auf dem MHC-Klasse-II-Molekül präsentierte Peptid eines Antigens. Dieses wurde vorher von dem B-Zell-Rezeptor (BCR) der B-Zelle erkannt und zu Peptiden verarbeitet. Durch die Erkennung des Antigens durch den TCR wird die T-Zelle aktiviert und exprimiert CD154 auf seiner Zelloberfläche. Dieses bindet CD40 auf der B-Zelloberfläche. Durch diesen Zell-Zell-Kontakt und durch die von der T-Zelle sezernierten Zytokine, welche von den jeweiligen Zytokin-Rezeptoren der B-Zelle erkannt werden, wird die B-Zelle aktiviert. Angelehnt an Abbildung 6.3 aus (136)

Aktueller Stand der Forschung bezüglich der Beteiligung von T-Zellen in der NMDARE

Wie oben beschrieben findet die Erforschung der NMDAR-Antikörper und ihre Rolle in der NMDARE viel Aufmerksamkeit. Das Auffinden von pathologischen Keimbahn-GluN1-Antikörpern könnte auf eine Pathogenese ohne notwendigen Einfluss von CD4⁺-T-Zellen hinweisen (112). Direkte Analysen von T-Zellen in Patienten mit NMDARE sind in der Literatur bisher nicht zu finden. Es existieren jedoch vereinzelt Befunde in der Diagnostik und Forschungsergebnisse aus näherer Vergangenheit, die eine T-Zell-Beteiligung suggerieren. Erste Hinweise ergeben sich in der Liquordiagnostik, wo die ersten sechs Monate der Erkrankung mit neuropsychiatrischen Symptomen häufig von einer moderaten Pleozytose im Liquor begleitet werden (68). Untersuchungen des Liquors aus dem akuten/ subakutem Krankheitsstadium ergaben außerdem erhöhte IL17-, IL6- oder CSCL10-Werte, die auf eine T-Zell-Beteiligung von T-Zellen hinweisen (137, 138). Parallel ergaben Auswertungen von Hirnbiopsien und Autopsien dazu passende Infiltrate von B-Zellen, Plasmazellen, CD4⁺-T-Zellen sowie Mikrogliaaktivierung. CD8⁺-Zellen und neuronale Schäden waren seltener vorzufinden (37, 104, 139-141). Das deckt sich mit Beobachtungen in CD8⁺-T-Zellvermittelte Enzephalitiden, die durch ausgedehnten neuronalen Schaden charakterisiert sind (102, 103, 139).

Es existiert zudem ein Tiermodell mit aktiver Immunisierung von Mäusen mit konformationsstabilisiertem GluN1/GluN2B-Heteromeren des NMDARE. Mäuse entwickelten eine fulminante Enzephalitis, deren Symptome vergleichbar mit der Ausprägung der NMDARE im Menschen waren. Begleitet wurde das neuroinflammatorische Geschehen mit Infiltraten von B-Zellen, Plasmazellen, Mikrogliaaktivierung, CD4⁺-T-Zellen, polyklonaler Antikörperproduktion gegen mehrere Epitope der GluN1- und GluN2-Untereinheit und wenig neuronalem Schaden sowie wenig/keinem CD8⁺-T-Zellinfiltrat (142). Im gleichen Versuchsaufbau mit Knockout-Mäusen ohne reife B-Zellen produzierten diese wie vermutet nach aktiver Immunisierung keine Antikörper und entwickelten keine Verhaltensstörungen. Aber auch Mäuse ohne reife T-Zellen (CD4- und CD8-Knockout) präsentierten keine Symptome, zeigten histopathologisch keine Hinweise auf eine Inflammation und bildeten keine NMDAR-Antikörper. Überraschenderweise zeigen Tierversuche mit passiv immunisierten Mäusen keine Bewegungsstörungen oder epileptische Anfälle (110, 143, 144), wie es bei diesem Tiermodell der aktiven Immunisierung der Fall war. Aktiv Immunisierte ähneln in ihrer Symptomatik daher eher menschlichen Patienten in der akuten (inflammatorischen)

Phase der NMDARE, während passiv immunisierte Tiere sich eher Patienten in der späteren Phase ähneln. Dieses Tiermodell stärkt die Vermutung einer CD4⁺-T-Zellbeteiligung in der Pathogenese der NMDARE (142).

Analyse von antigenspezifischen T-Zellen

Wie können nun T-Zellen analysiert werden, die an der NMDARE beteiligt sind? Es ist hierbei wichtig T-Zellen, die für das Antigen spezifisch sind, zu untersuchen und vom Großteil der anderen im Blut befindlichen T-Zellen abzugrenzen. Dabei stellen die Frequenzen, insbesondere die der autoantigenspezifische T-Zellen eine große Hürde in ihrer Untersuchung dar. Während die Frequenz von antigenspezifischen CD4⁺-T-Zellen gegen Viren zwischen 1 Zelle in 10² - 10⁶ liegt, werden die Frequenzen von autoantigenspezifischen und naiven T-Zellen auf 1 Zelle in 10⁴ - 10⁷ geschätzt (145-148). Antigen-spezifische T-Zellen konnten daher für lange Zeit nur in Kultur nach antigenspezifischer Proliferation analysiert werden. Die Isolation dieser Zellen wurde 1996 mit der Entwicklung der Tetramer-Technologie ermöglicht, bei der T-Zellen lösliche Peptide des Zielantigens an MHC-Tetramer-Molekülen binden und mit der Durchflusszytometrie nachgewiesen konnten (149). Zur Analyse müssen jedoch noch folgende Punkte beachtet werden: 1) Für die Nutzung von MHC-Tetrameren muss das Zielantigen im Detail charakterisiert sein, da nur Peptide mit einer Länge von acht bis 25 Aminosäuren (AS) von MHC-Molekülen präsentiert werden können (150). 2) Eine funktionelle Analyse der T-Zell-Antwort benötigt die vorherige Stimulation der T-Zellen mit ihrem spezifischen Antigen und eine nachfolgende immunhistologische Färbung zur Detektion der funktionellen Parameter. 3) Die niedrige Frequenz der Zielzellen stellt auch für die Durchflusszytometrie ein Problem dar. Für die Detektion von sehr niedrigen Zellfrequenzen (<0.1%) ist aufgrund des Hintergrundsignals nach immunhistologischer Färbung und der besseren Auflösung in der anschließenden Analyse eine Voranreicherung der Zellen notwendig (145, 151). Mit der Methode des Antigen-reactive T-cell enrichment (ARTE) konnten die genannten Probleme wirksam adressiert werden, indem die Methode die für die T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung essentielle CD40-154-Interaktion ausnutzt (s.o). Mononukleäre Zellen (PBMCs) aus dem Blut werden mit dem Antigen/ den Antigenen inkubiert, wodurch enthaltene antigenpräsentierende Zellen das Antigen/ die Antigene verarbeiten und entsprechende MHC-II/Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentieren. Dadurch ist die genaue Charakterisierung des Zielantigens nicht notwendig und gleichzeitig eine Aktivierung der Zielzellen möglich. CD4⁺-T-Zellen

erkennen antigenspezifisch über ihren TCR ihr Antigen und exprimieren als Reaktion CD154 (125, 152), anhand derer eine magnetische Markierung stattfindet. Aktivierte T-Zellen werden anschließend über magnetische Säulen angereichert, immunhistologisch gefärbt und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert (s. 2.4.1).

1.4 Hypothese

GluN1-Antikörper sind ein kennzeichnendes Merkmal der NMDARE, deren pathologische Relevanz bereits nachgewiesen werden konnte. Ausgehend von der Prämisse einer adaptiven humoralen Immunantwort mit Bildung von autoreaktiven Antikörpern nach Kontakt mit dem NMDAR in ektop exprimiertem Gewebe (z.B. in Teratomen) oder im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens (z.B. im Rahmen einer HSV-Enzephalitis) erfolgt diese typischerweise unter Beteiligung von CD4⁺-T-Zellen. Nach wechselseitiger Aktivierung von B- und CD4⁺-T-Zellen über die CD154-CD40-Interaktion kommt es neben der Sekretion von Antikörper durch Plasmazellen auch zur Bildung eines humoralen Gedächtnisses in Form von B- und T-Gedächtnis-Zellen. Daten aus Liquoruntersuchungen, Gehirnbiopsien und -autopsien in NMDARE-Patienten unterstützen die Hypothese einer CD4⁺-T-Zell-Beteiligung. Jedoch existieren auch widersprüchliche Befunde wie z.B. die Existenz von Keimbahn-GluN1-Antikörper, welche auf eine mögliche CD4⁺-T-Zellunabhängige Genese hinweisen.

In dieser Arbeit werden extrazelluläre Domänen der GluN1-Untereinheit synthetisiert und zur Stimulation von T-Zellen mit Hilfe des Antigen-reactive T cell enrichment – Protokolls (148) genutzt. Dadurch können mithilfe der Durchflusszytometrie die seltenen GluN1-reaktiven CD4⁺-T_H-Zellen quantifiziert und charakterisiert werden. Mit den Ergebnissen soll die Frage einer möglichen CD4⁺-T-Zell-Beteiligung an der Pathogenese der NMDARE beantwortet werden.

Um die CD4⁺-T-Zell-Beteiligung an der NMDARE nachzuweisen, sollen folgende Hypothesen mit den dahinter aufgelisteten Schritten getestet werden:

Hypothese 1: Die CD154-CD40-Interaktion zwischen T- und B-Zellen spielt eine zentrale Rolle in der Synthese von hochaffinen IgG-Antikörpern, wie sie auch in Patienten mit NMDARE gefunden werden. Daher lässt sich in NMDARE-Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine erhöhte Frequenz von GluN1-spezifischen CD154⁺CD4⁺-T-Zellen finden.

- Synthese und Aufreinigung der extrazellulären Domänen ATD und S1-S2 der GluN1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors
- Stimulation von T-Zellen mit krankheitsspezifischen Antigenen
- Magnetische Isolation, immunhistologische Färbung und Analyse von GluN1-spezifischen CD154⁺CD4⁺-T-Zellen von NMDARE-Patienten und gesunden Kontrollen im Durchflusszytometer

Hypothese 2: GluN1-spezifische CD154⁺CD4⁺-T-Zellen in NMDARE-Patienten zeigen eine verstärkte Produktion von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF α und IFN γ).

- Messung der TNF α - und IFN γ -Expression innerhalb der GluN1-spezifischen CD154⁺CD4⁺-T-Zellen

Hypothese 3: Gesunde Kontrollen und Patienten zeigen nach Stimulation mit Negativ- und Positiv-Kontrollen keine Unterschiede in der Frequenz von antigenspezifischen CD154⁺CD4⁺-T-Zellen oder in der Expression von TNF α und IFN γ . Die Unterschiede in der T-Zell-Antwort sind daher nicht auf eine immunsuppressive Therapie von NMDARE-Patienten zurückzuführen.

- Stimulation von NMDARE-Patienten und gesunden Kontrollen mit einem Neoantigen KLH und mit dem Lysat von *Candida albicans* (*C. albicans*)
- Magnetische Isolation, immunhistologische Färbung und Messung der KLH- und *C. albicans*-reaktiven CD154-, TNF α - und IFN γ -Expression durch CD4⁺-T-Zellen von NMDARE-Patienten und gesunden Kontrollen im Durchflusszytometer

Hypothese 4: Die Frequenzen der CD4⁺-T-Zellen innerhalb der peripheren blutmononukleären Zellen (PBMCs) zeigen zwischen NMDARE-Patienten und gesunden Kontrollen keine Unterschiede. Unterschiede in Frequenz der CD154-, TNF α - und IFN γ -Expression durch CD4⁺-T-Zellen sind daher nicht auf eine Abweichung der T-Zell-Verteilung innerhalb PBMCs zurückzuführen

- Messung von unstimulierten PBMCs jedes Probanden im Durchflusszytometer und Bestimmung des CD4⁺-T-Zell-Anteils innerhalb der PBMCs

2 Material und Methodik

2.1 Labormaterialien

Für die unten aufgeführten Experimente wurden die folgenden Labormaterialien genutzt.

Puffer	Zusammensetzung
4x SDS-Probenpuffer	160 mM TRIS, 40% Glycerol, 9.8% SDS, 300 mM Dithiothreitol, 14 mM Bromphenolblau
FACS-Puffer	PBS, 2% Fetales Kälberserum
Lauf-Puffer	192 mM Glycine, 25 mM TRIS, 0.1% SDS, pH 8.3
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄
PEB Puffer	PBS, 2 mM EDTA, 0.5% BSA
Sammelgelpuffer	0.5 M Tris/HCl, 0.4% SDS, pH 6.8
TBE-Puffer	89 mM TRIS, 0.89 mM Borsäure, 2mM EDTA
TBS-Puffer	20 mM TRIS, 150 mM NaCl
TBST	TBS-Puffer, 0.1% Tween-20
Trenngelpuffer	1.5M Tris/HCL, 0.4% SDS, pH 8.8

Erstantikörper	Antigen	Wirt	Hersteller	Artikelnr.
Anti-GST-Antikörper	GST	Ziege	GE Healthcare	27457701
Anti-GluN1-Antikörper	AS 660-811 des GluN1 (Ratte, UniProt Id: P35439)	Maus	Synaptic Systems	114011
Anti-GluN1-Antikörper	AS 35-53 des GluN1 (Ratte, UniProt Id: P35439)	Kaninchen	Synaptic Systems	114003

Zweitantikörper	Wirt	Spezies	Hersteller	Artikelnr.
Esel α-Ziege-IgG-Meerrettich Peroxidase (HRP)	Esel	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	Sc-2020
Ziege α-Kaninchen-IgG-HRP	Ziege	Kaninchen	Vector Laboratories	PI-1000-1
Ziege α-Maus IgG-HRP	Ziege	Maus	Dianova	115-035-003

Fluorochrom-gekoppelte Antikörper	Wirt	Spezies	Hersteller	Artikelnr.
α-CD4-APC-Vio770	ms	hum	Miltenyi Biotec	130-096-652
α-CD8-APC	ms	hum	Miltenyi Biotec	130-091-076
α-CD14-FITC	ms	hum	Miltenyi Biotec	130-098-063
α-CD20-FITC	ms	hum	Miltenyi Biotec	130-091-108

α -CD45RA- VioGreen	ms	hum	Miltenyi Biotec	130-096-921
α -CD45RO-VioBlue	ms	hum	Miltenyi Biotec	130-099-044
α -CD154- PerCP-Vio700	recomb. Hum	hum	Miltenyi Biotec	130-109-474
α -IFN γ -PE	recomb. Hum	hum	Miltenyi Biotec	130-109-233
α -TNF α - PE-Vio770	hum	hum	Miltenyi Biotec	130-096-755

Kits und Zellfärbung	Hersteller	Artikelnr.
CD154 Microbead KIT (α -CD154-Biotin; α -Biotin-MicroBeads), human	Miltenyi Biotec	130-092-658
FcR Blocking Reagenz	Miltenyi Biotec	130-059-901
Inside Stain KIT (Inside Fix mit 3.7% Formaldehyde; Inside Perm Puffer mit Detergens und 0.05% Natriumazid)	Miltenyi Biotec	130-090-477
MACS [®] Comp Bead Kit, anti-human Igk (MACS [®] Comp Beads – anti-human, MACS [®] Comp Beads – blank)	Miltenyi Biotec	130-103-187
MACS [®] Comp Bead Kit, anti-mouse Igk (MACS [®] Comp Beads – anti-mouse, MACS [®] Comp Beads – blank)	Miltenyi Biotec	130-097-900
Viability [™] 488/520 Fixable Dye	Miltenyi Biotec	130-109-812
α -CD40 (Pure-functional grade)	Miltenyi Biotec	130-094-133

Geräte	Hersteller	Artikelnr.
BG-SYS Vari-gel Maxi Gel Electrophoresis System	Scie Plas VG-SYS	15845561
Branson Digital Sonifier [®] Model S-250D	Branson Digital	101-063-589
Branson Ultrasonics [™] Sonifier [™] Disruptorhorn	Branson Digital	101-147-037
Branson Ultrasonics [™] Sonifier [™] Microtip 1/8" Microtip	Branson Digital	101-148-062
Digitaler Taumelrollenmischer	Stuart [®]	SRT6D
Eppendorf [®] Thermomixer Compact	Eppendorf	5384000020
Fisherbrand [™] Miniröhrchen-Rotator	Fisher Scientific	15534080
Fluorescence-activated cell sorter (FACS) Canto II	BD	338962
ImageQuant [™] LAS 4000	GE Healthcare	28955810
Inkubations-Kreisschüttler, Professional 3500	vwr	444-7084
Labcycler	SensoQuest	012-103
Mini-PROTEAN Tetra Cell (inkl. Probenkämmen, Glasplatten, Gießständen, Gießrahmen, Elektrophorese-Halterung)	Bio-Rad	1658000EDU
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad	1645050
RH Basic – Magnetrührer mit Heizplatte	IKA	0005019700
Thermo Scientific [™] Heraeus [™] Fresco [™] 21 Mikrozentrifuge	Thermo Scientific [™]	75002425
Thermo Scientific [™] Heraeus [™] Megafuge 16R Universalzentrifuge	Thermo Scientific [™]	75004270
Thermo Scientific [™] Multiskan [™] GO Mikrotiterplatten-Spektrophotometer	Thermo Scientific [™]	51119300

Laborutensilien	Hersteller	Artikelnr.
BD FACSTFlow™ Trägerflüssigkeit	BD	342003
BD Vacutainer® CPT™ -Röhrchen	BD	362782
Bio-Spin Disposable chromatography columns	Biorad	723-6008
Corning® Thermowell™ GOLD Polypropylene PCR-Röhrchen, 0.2 mL	Fisher Scientific	10163872
Dialyseschlauch	Carl Roth	1780
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5 mL, Eppendorf Quality™, farblos	Eppendorf	0030120086
Eppendorf Tubes® 5.0 mL mit Schnappdeckel, Eppendorf Quality™, farblos	Eppendorf	0030119401
Falcon® 12-well clear flat bottom not treated multiwell cell culture plate	BD	351143
Falcon® 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube	BD	352008
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Fisher Scientific	352096
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Fisher Scientific	352070
Fisherbrand™ Paddel für 50 mL-Röhrchen	Fisher Scientific	15564140
MACS® Columns (inkl. sterilem Kolben je Säule)	Miltenyi Biotec	130-042-201
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec	130-042-303
OctoMACS® Separator	Miltenyi Biotec	130-042-108
Petrischale	Sarstedt	82.1473.001
Reaktionsgefäß ROTILABO® 1.5 mL schwarz	Carl Roth	AA80
ThermoFisher Scientific™ Pierce™ 96-Well-Mikrotiterplatten	Thermo Scientific	15041
Transfermembran ROTI® PVDF 0.45, 375x26.5cm	Carl Roth	T.830
Zählkammer Neubauer-Improved (0100 mm Tiefe)	Laboroptik	

PCR-Materialien	Hersteller	Artikelnr.
2-Log DNA Ladder	NEB	N3200L
Desoxynukleotidtriphosphat-Mix, je 25 mM	Invitrogen	10297018
Gel Loading Dye, Orange (6X)	NEB	B7022S
HotStarTaq DNA Polymerase mit ThermoPol® Puffer	NEB	M0267X
Midori Green Advance	NIPPON Genetics	MG04
Nuklease-freies Wasser	NEB	B1500S
pGEX Vorwärtsprimer	eurofins	
pGEX Rückwärtsprimer	eurofins	
pGEX-6P-1 Vektor	GE Healthcare	28-9546-48

Bakterienstamm	Hersteller	Artikelnr.
E. coli – Stamm BL21 (DE3)	NEB	C25271

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller	Artikelnr.
1,4-Dithiotreitol	Carl Roth	6908
2-Mercaptoethanol (55 mM)	Gibco	21985023
Agarose Broad Range	Carl Roth	T846
Albumin Fraktion V, proteasefrei (BSA)	Carl Roth	T844
Ammoniumperoxidsulfat	Carl Roth	9592
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth	K029
Brefeldin A	Sigma-Aldrich	B6542
Bromphenolblau	AppliChem	APA2331
C. albicans Lysat	Stallergenes Greer	XPM15D3A5
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	216.27
DNase I	Roche	10104159001
Ethanol	Carl Roth	K928
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich	03690
Glutathione Sepharose™ 4B	GE Healthcare	52-2303-00
Glycerol	Carl Roth	3783
Harnstoff	Carl Roth	X999
Isopropanolol	Carl Roth	6752
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Invitrogen	15529019
Keyhole limpet hemocyanin (4 mg/ mL)	Stellar Biotechnologies	KLH-05NR
Lysogeny broth - Medium (Luria/Miller)	Carl Roth	6673
Lysozym from chicken egg white	Sigma	L6876
Methanol	Carl Roth	0082
Milch	Carl Roth	T145
Natriumchlorid	Carl Roth	P029
Natriumdodecylsulfat	Sigma	75746
PageRuler™ vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Scientific	26617
Pierce™ BCA™ Protein-Assay (inkl. BCA Reagenz A mit Bicinchoninsäure und BCA Reagenz B mit Kupfersulfat)	Thermo Scientific	23225
Pierce™ PageBlue™ Proteinfärbelösung	Thermo Scientific	24620
ROTIPHORESE®NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30	Carl Roth	A124
SOC-Medium	Sigma-Aldrich	S1797
SuperSignal™ West Femto (inkl. Luminol/Enhancer und stabiler Peroxidpuffer)	Thermo Scientific™	34094
Tetramethylethylendiamin	Bio-Rad	1610801
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth	9090
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth	4855
Triton® X-100	Th.Geyer	8013
Tween-20	AppliChem	A4974

Software	Entwickler
FlowJo™ v10.5.3	BD
GraphPad Prism v7.5	GraphPad Software
ImageQuant TL 7.0	GE Healthcare
Microsoft Office	Microsoft
Skantl Software 3.2.1.4 RE for Multiskan GO	Thermo Scientific

Zellkultur	Hersteller	Artikelnr.
Fetales Kälberserum, superior	Biochrome	S0615
Humanes AB-Serum	Sigma-Aldrich	H4522
HEK293T-Zellen		
Phosphatgepufferte Salzlösung	Gibco™	10010023
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium	Gibco™	11875093
Trypan Blue Solution Cell Culture tested	Sigma	T8154

2.2 Synthese von extrazellulären Domänen des NMDAR

2.2.1 Versuchsaufbau

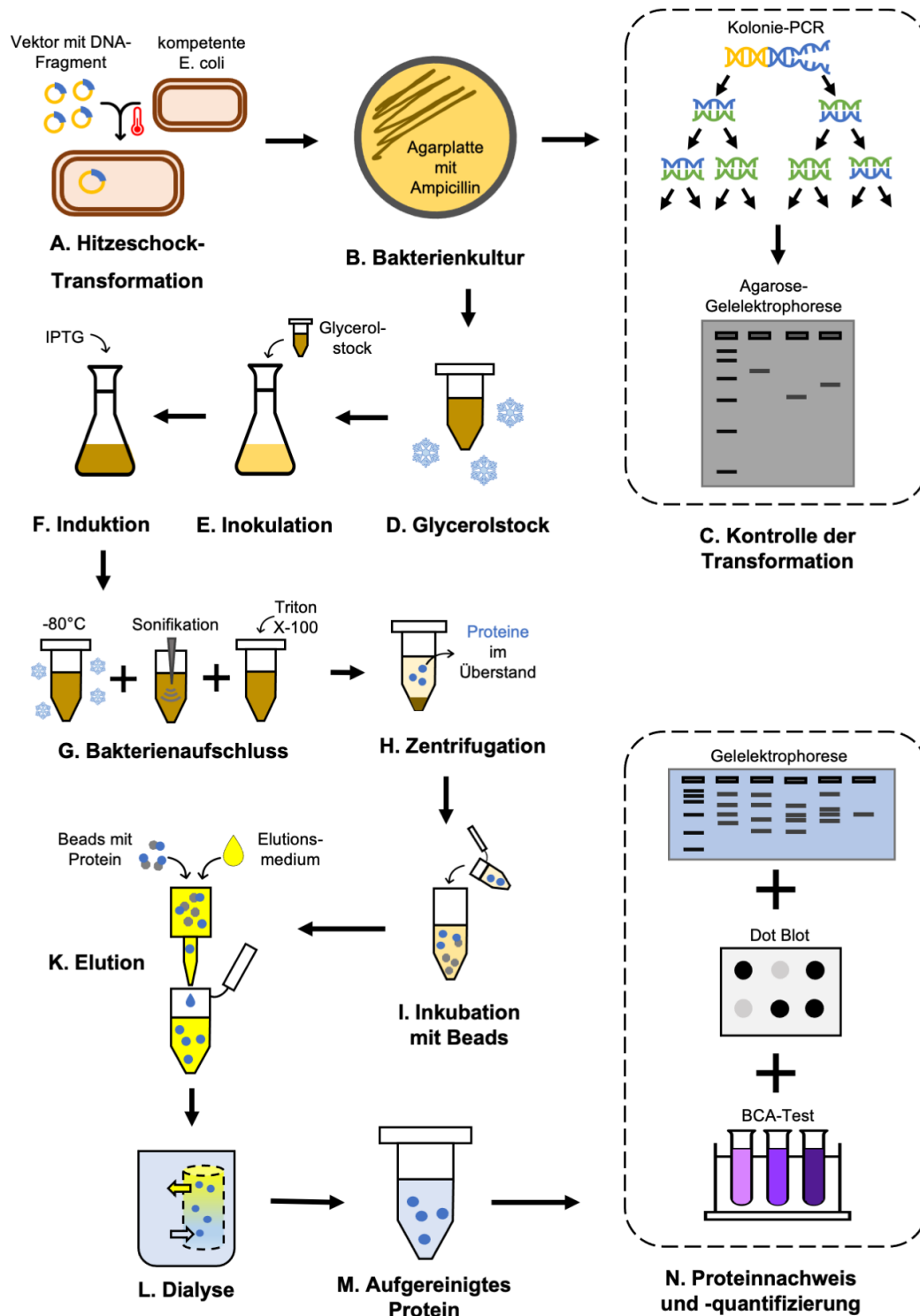


Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Expression von Domänen des GluN1

DNA-Abschnitte im pGEX-6p-1-Vektor wurden in kompetenten *E. coli* mit Hitzeschock transformiert (A). Nach Ausstreichen auf Agarplatten mit Ampicillin-versetzten Nährmedium wuchsen nur *E. coli*, die die Ampicillin-Resistenz mit dem Plasmid aufgenommen hatten (B). Nach zusätzlicher Kontrolle der erfolgten

Transformation mit Hilfe von Kolonie-PCR und Agarose-Gelelektrophorese (C) wurde von diesen E. coli ein Glycerolstock erstellt (D), mit dem im weiteren Verlauf Nährmedium inokuliert wurden (E). Wachsende E. coli in Kultur wurden mit IPTG induziert und somit zur Proteinexpression angeregt (F). Nach Bakterienaufschluss durch Einfrieren, Sonifikation und Zugabe von Triton X-100 (G) erfolgte die Zentrifugation, wodurch sich die Zielproteine im Überstand des Lysats befanden (H). Diese GST-getaggten Fusionsproteine wurden mit Affinitäts-Beads inkubiert (I) und gebundene Proteine anschließend über Chromatographiesäulen mithilfe des Elutionsmediums von den Beads eluiert (K). Es erfolgte eine Dialyse gegen PBS (L), womit aufgereinigtes Protein gewonnen wurde (M). Durch Gelelektrophorese, Dot Blots und Proteinbestimmung nach Bradford mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Test wurden Qualität und Quantität der Proteine bestimmt (N).

2.2.2 Klonierung

Plasmid

Die Plasmide zur Expression der GluN1-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors wurden freundlicherweise von Kollegen bereitgestellt. Die DNA-Sequenzen für ATD und S1-S2 wurden jeweils in einen pGEX-6p-1-Vektor mit enthaltenem Ampicillin-Resistenzgen kloniert. In der von ihnen durchgeführten Sequenzierung konnte die korrekte Ausrichtung und Ligation bestätigt und keine wesentlichen Mutationen festgestellt werden. Das DNA-Fragment von ATD bestand aus 1179 bp und von S1-S2 aus 873 bp. In anschließend transformierten E. coli konnten dadurch N-terminal getaggte GST-Fusionsproteine ATD-GST und S1S2-GST exprimiert werden. Die Größe des GST-Tags liegt bei 633 bp.

Hitzeschock-Transformation

Die Plasmid-DNA mit den Konstrukten GST, ATD-GST und S1S2-GST wurden in kompetente E. coli Zellen vom Stamm BL21 (DE3) transformiert. Die bei -80°C gelagerten DNA-Plasmide und die kompetenten E. coli tauten auf Eis auf. Für jedes Konstrukt wurde 1 µL Plasmid zu 100 µL kompetenten Zellen zugegeben und resuspendiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C im Thermomixer. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wurden 500 µL des auf 37°C vorgewärmten SOC-Mediums hinzugegeben. Anschließend wurden die Bakterien bei 37°C und 300 rpm für eine Stunde im Thermomixer geschüttelt. 50 µL je Ansatz wurden auf 37°C warmen LB-Agar-Platten (mit 100 µg/ mL Ampicillin) verteilt. Die Kulturplatten verblieben über Nacht bei 37°C im Inkubator. Bakterien, welche das Plasmid mit aufgenommen haben, konnten aufgrund der darin codierten Ampicillin-Resistenz Kolonien bilden.

Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

PCR: Zur Vorbereitung der PCR wurden alle Agenzien in einem Master-Mix mit dem Vorwärtsprimer (5'[GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG]3') sowie dem Rückwärtsprimer (3'[CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG]5') zu einem PCR-Master-Mix auf Eis zusammengemischt (s. Tabelle 2, Taq-Polymerase zuletzt). 50 µL Mix wurde je Ansatz in ein 200 µL Reaktionsgefäß gegeben. Die ausgewählten mit Plasmiden transformierten Bakterienkolonien wurden mit je einer Pipettenspitze abgetragen und sortiert auf eine neue LB-Agar-Platte übertragen. Anschließend wurden die an der gleichen Pipettenspitze verbliebenen anhaftenden Bakterien in einem separaten Reaktionsgefäß mit dem PCR-Master-Mix resuspendiert. Die neue LB-Agar-Platte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank und 5% CO₂ inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden in einen PCR-Thermocycler (Labcyler – SensoQuest) mit einem voreingestellten Programm gestellt und prozessiert (s. Tabelle 3).

Agarose-Gelelektrophorese: Die entstandenen PCR-Produkte wurden zur Kontrolle der ungefähren Basenpaarlänge mit der Agarose-Gelelektrophorese nach Größe getrennt. Dazu wurde ein 1% Agarose in TBE-Gel mit 1:10000 Midori Green bei 600W für 3.5 Minuten erhitzt und in eine Form mit Probenkämme zum Trocknen gegossen. 1 µL Orange Loading Dye (6X) wurde in einer 1:6 Verdünnung mit dem jeweiligen PCR-Produkt (5 µL) bzw. mit 1 µL 2-Log DNA Ladder und 4 µL destilliertes Wasser (dH₂O) zur Quantifizierung der DNA-Länge vermischt. Die Proben wurden in separate Probenaschen pipettiert und das Gel in einem horizontalem Gel-Elektrophorese-System für 20 Minuten bei 130 V angeschlossen. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

Agenzien	Stock-konzentration	Volumen/Ansatz [µL]	Beispiel mit 10 Ansätzen (+10 % Überschuss) [µL]
Taq-DNA-Polymerase	5 units/ µL	0.15	1.65
Desoxynukleotidtriphosphat-Mix	25 mM	0.25	2.75
pGEX Vorwärtsprimer	50 µM	0.2	2.2
pGEX Rückwärtsprimer	50 µM	0.2	2.2
PCR-Puffer	10x Puffer	2.5	27.5
H ₂ O (PCR-Grad, steril)		21.7	238.7
Gesamtvolumen		25	275

Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes

Schritt	Temperatur	Zeit	
1.	95°C	5 Minuten	
2.	95°C	30 Sekunden	Wiederholung der Schritte 2-4 werden für 35 Zyklen
3.	58°C	30 Sekunden	
4.	68°C	1 Minute	
5.	68°C	10 Minuten	
6.	4°C	Bis zur Elektrophorese	

Tabelle 3: Einstellung des Thermocyclers für die Kolonie-PCR

Glycerolstock

Je Konstrukt wurde eine einzelne Bakterien-Kolonie von der LB-Agar-Platte mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in je 8 mL LB-Medium (mit 100 µg/ mL Ampicillin inokuliert. Diese verblieben über Nacht (ca. 17 Stunden) in einem Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator bei 37°C und 300 rpm. Zur Herstellung des Glycerolstocks wurden je 500 µL Kultur mit 500 µL sterilfiltriertem Glycerol (40% in dH₂O) in 1.5 mL Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

2.2.3 Synthese der Fusionsproteine

Expression des Fusionsproteins

Vorkultur: Im Folgenden wird das Vorgehen für die Synthese eines Fusionsproteins beschrieben. Die Aufreinigung für GST, ATD-GST und S1S2-GST erfolgte in separaten Ansätzen. 250 mL LB Medium versetzt mit 100 µg/ mL Ampicillin wurden mit einem Pipettenspitzenabstrich aus dem Glycerolstock inokuliert und über Nacht bei 37°C und 270 rpm im Inkubations-Kreisschüttler geschüttelt.

Hauptkultur: Mittels Hilfe des Spektrophotometers wurde die optische Dichte des sterilen LB-Mediums mit Ampicillin bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) ermittelt. Dieser Wert diente als Leerwert für spätere Messungen. Anschließend wurde Vorkultur im Verhältnis von 1:10 zum Medium gegeben, bis die OD₆₀₀ ungefähr 2.2 betrug. Diese Hauptkultur wurde für 90 Minuten bei 37°C und 270 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.8, in der Phase des exponentiellen Bakterienwachstums, wurde die Kultur für 30 Minuten bis zum Erreichen der Raumtemperatur auf Eis runtergekühlt. Für den späteren Proteinnachweis wurden 2 mL Kultur als Probe „nicht induziert“ entnommen. Zur Induktion der Proteinexpression wurde IPTG als künstlicher Induktor des lac-Operons auf dem Plasmid in einer Konzentration von 0.01 mM zugegeben. Nach 90 Minuten

Inkubation bei Raumtemperatur bei 270 rpm wurde 2 mL Kultur für die Kontrolle „induziert“ entnommen. Die Kultur wurde auf 50 mL Falcons aufgeteilt und für je 15 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in PBS mit PIC im Verhältnis von 1:50 (PBS+PIC: Hauptkultur) resuspendiert, in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Proteinaufreinigung

Vorbereitung der Glutathion-Sepharose 4B Affinitätsmatrix: Vor Gebrauch der Affinitätsmatrix wurde diese gründlich resuspendiert. Es wurden 250 µL Matrix in ein 50 mL Falcon übertragen und die Matrix 2 Mal mit je 20 mL PBS bei 4°C und 500 g auf einem Rotator (Fisherbrand™ Rotator mit Paddel für 50 mL-Röhrchen) gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen.

Proteinbindung an Affinitätsmatrix: Die Bakteriensuspension wurde in einem warmen Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort auf Eis gelagert, um Proteinabbau zu verlangsamen. Es erfolgte die Zugabe von je einer Spatelspitze Lysozym und DNase. Anschließend wurden die Zellen mit dem Ultraschallgerät (Branson Digital Sonifier® mit Disruptorhorn und Microtip) für 2 Mal je 5 Minuten bei einer Amplitude von 30% und 2 Schlägen/Sekunde zum Zellaufschluss sonifiziert. Die Bakteriensuspension wurde dabei auf Eis gekühlt und regelmäßig geschwenkt. Nach Zugabe von 10%igem Triton X-100 1:10 (Endkonzentration 1% Triton X-100) wurde die Suspension bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Das Lysat wurde anschließend auf 2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 14800 g bei 4°C für 15 Minuten in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Ein 2 mL Reaktionsgefäß mit Zellpellet (Probe „Pellet“) wurde in 300 µL dH₂O resuspendiert sowie 50 µL des Zelllysats (Probe „Lysat“) wurden für die Kontrolle entnommen. Beide wurden bei -20°C gelagert. Der Überstand wurde zur gewaschenen Affinitätsmatrix gegeben und für 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Dabei kommt es zur Bindung der GST-markierten Proteine an die Glutathion-Sepharose 4B Affinitätsmatrix.

Proteinelution und Dialyse: Die Affinitätsmatrix und der Überstand wurden bei 4°C und 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 µL als Probe „ungebunden“ entnommen und bei -20°C gelagert. Der restliche Überstand wurde verworfen. Nachdem die Matrix 3 Mal mit je 20 mL PBS bei 4°C und 500 g gewaschen und in 5 mL PBS resuspendiert wurde, wurde sie auf eine Chromatographiesäule transferiert werden. Je nach Volumen der Hauptkultur erfolgte die Elution, indem 3 Mal 166-333 µL Harnstofflösung 8 M auf die Chromatographiesäule mit Affinitätsmatrix gegeben und das

Eluat in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß gesammelt wurde. Das Eluat wurde in einen Dialyseschlauch übertragen und drei Mal gegen 3.3 L PBS bei 4°C über Nacht auf einem Magnetrührer dialysiert. Nach der letzten Dialyse wurden 50 µL als Probe „Eluat“ entnommen und bei -20°C gelagert. Das gereinigte Protein wurde in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Proteinnachweis

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vorbereitung der Gele: Zur Einordnung der Molekülgröße der synthetisierten Fusionsproteine wurde die SDS-PAGE verwendet. Zur Vorbereitung von 75 mm dicken Polyacrylamid-Gelen wurden die Agenzien nach Tabelle 4 im jeweiligen 15 mL/ 50 mL Falcon-Tube gemischt. Die Zugabe von TEMED zur Polymerisation erfolgte jeweils kurz vor dem Gießen. Die Trenngel-Lösung wurde in die Gelvorlage gegossen und zur Verhinderung von Blasenbildung am Meniskus mit Isopropanolol abgedeckt. Nach abgeschlossener Polymerisation nach ungefähr einer Stunde wurde Isopropanolol abgekippt, die Sammelgel-Lösung zugegossen und ein Probenkamm zur Formierung von Probenaschen eingesetzt. Kurz vor Beladen des Gels wird der Probenkamm entfernt.

Vorbereitung der Proben: Die Proben „nicht induziert“ und „induziert“ wurden für 5 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Zellpellets wurden in 25 µL 4x SDS-Probenpuffer und 75 µL dH₂O resuspendiert und wurden bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gekühlt. Die Proben „Lysat“, „ungebunden“, „Pellet“ und „Eluat“ wurden im Verhältnis von 1:4 mit 4x SDS-Probenpuffer vermischt. Alle Proben wurden für 5 Minuten im Thermomixer bei 95°C aufgekocht und direkt danach auf 4°C auf Eis runtergekühlt. 5 µL der Proteinleiter sowie je 30 µL der Proben wurden in separate Probenaschen pipettiert. Leere Probenaschen wurden mit 30 µL SDS-Probenpuffer befüllt. Die Gele wurden in die Halterung in der Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean Tetra cell) befestigt und die Kammer mit Lauf-Puffer aufgefüllt.

Gelelektrophorese: Initial wurde eine elektrische Spannung von 70 V für 10 Minuten angelegt. Nach abgeschlossener Migration der Proben vom Sammelgel in das Trenngel wurde zur Auftrennung nach Proteingröße für 90 Minuten 130 V angelegt.

Coomassie-Färbung: Die Gele wurden drei Mal für je 10 Minuten mit dH₂O gewaschen und anschließend mit Proteinfärbelösung im Dunkeln über Nacht bei Raumtemperatur

und 50 rpm inkubiert. Nach weiteren drei Waschsritten mit dH₂O wurden die Gele fotografiert.

Agenzien	2 x Sammelgele	2 x Trenngel
dH ₂ O	3.7 mL	2 mL
Puffer	1.5 mL Sammelgel-Puffer	2 mL Trenngel-Puffer
Acrylamid	1 mL	3 mL
TEMED	30 µL	30 µL
Ammoniumperoxidsulfat	30 µL	30 µL

Tabelle 4: Schema zur Herstellung von Sammel- und Trenngelen

Dot Blot

Präparation der PVDF-Membran: Dot Blots dienen dem qualitativen Nachweis der Proteine. Als Positiv-/ Negativkontrollen dienen sonifizierte GluN1-transfizierte HEK-Zellen, welche von Kollegen bereitgestellt wurden, und GST. Je Erstantikörper wurde eine PVDF Membran in einer Petri-Schale vorbereitet und markiert. Mithilfe von je 2 µL 100%igem Methanol wurde die hydrophobe PVDF Membran an den markierten Stellen aktiviert bevor je 2 µL des aufgereinigten Fusionsproteins (ATD-GST oder S1S2-GST) sowie der Kontrollen appliziert wurden. Nach einer Stunde Trocknen wurden sie in 50 mL Falcons übertragen und mit jeweils 12 mL 5% Milch/TBST für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 50 rpm auf einem Taumelrollenmischer geblockt.

Immundetektion: Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:1000 (Kaninchen anti-GluN1- und Maus anti-GluN1-Antikörper) bzw. 1:5000 (Ziege anti-GST-Antikörper) in 6 mL 5% Milch/TBST bei 4°C und 50 rpm. Am Folgetag wurden die Membranen 3 Mal für 10 Minuten in TBST gewaschen und der Zweitantikörper appliziert. Die HRP-konjugierten Ziege-α-Kaninchen-, Ziege-α-Maus- bzw. Esel-α-Ziege-Antikörper wurden jeweils 1:6000 in 12 mL 5% Milch/TBST verdünnt. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur und 50 rpm wurden die Membranen erneut drei Mal in 10 mL TBST gewaschen. Zur Entwicklung wurde ECL-Lösung SuperSignal™ West Femto vorbereitet indem Luminol/Enhancer und stabiler Peroxidpuffer 1:2 vermischt wurden. Die Membran wurde mit einem ImageQuant und dem Programm ImageQuant TL entwickelt, nachdem je Membran 500 µL ECL-Lösung appliziert und anschließend mit Plastikfolie bedeckt wurde. Im Abstand von 15 Sekunden wurden mit zunehmender Belichtungszeit Bilder sukzessive aufgezeichnet bis eine Färbung deutlich sichtbar wurde.

Proteinbestimmung nach Bradford mit dem BCA-Test

Vorbereitung der Standards und der BCA-Arbeitsreagenz: Zur quantitativen Proteinbestimmung kam der BCA-Test zum Einsatz. Aus einem 2 mg/ mL BSA-Bestand wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA-Endkonzentration von 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 und 0 µg/ mL erstellt. Die BCA-Arbeitsreagenz setzte sich aus BCA Reagenz A (mit Bicinchoninsäure) und B im Verhältnis 50:1, Reagenz A:B zusammen. Je Standard und zu messende Probe wurde 200 µL der Arbeitsreagenz plus 200 µL Überstand angesetzt.

Proteinbestimmung: Jede Probe/Standard wurde jeweils 2 Mal im gleichen Durchlauf gemessen. Dazu wurden je 25 µL der Probe/ des Standards zusammen mit 200 µL Arbeitsreagenz in einzelne Nöpfchen einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Nach 30 Sekunden gründlichen Schüttelns im Mikroplatten-Lesegerät wurde die Platte bei 37°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde im gleichen Gerät die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert. In der integrierten SkanIt Software des Mikroplatten-Lesegerätes wurde der Mittelwert der Leerwerte aus Standard I von jeder anderen Messung subtrahiert. Eine Standardkurve wurde anhand der 9 BSA-Verdünnungsproben generiert und mithilfe einer Vier-Parameter-Logistik angepasst. Anhand dieser konnte die Konzentration der Proteine abhängig von ihrer photometrischen Absorption bestimmt werden, wenn der Korrelations-Koeffizient R² größer als 0.99 war.

2.3 Studienkohorte

Alle klinischen Untersuchungen wurden gemäß den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Für die Untersuchungen liegt die Zustimmung von der Ethikkommission der Charité vor. Von allen Probanden wurde eine schriftliche, informierte Einverständniserklärung am Zentrum für Autoimmunenzephalitis, Abteilung für Neurologie, Charité- Universitätsmedizin Berlin, eingeholt.

Zwischen Januar 2017 und Juli 2018 wurden 16 Patienten mit NMDARE und 22 alters- und geschlechtsspezifisch abgestimmte Kontrollen in die Studie aufgenommen. Die Patienten wurden aufgrund der NMDARE an der Charité versorgt oder befanden sich in der Nachversorgung. Alle NMDARE-Patienten erfüllten die diagnostischen Kriterien der NMDARE, u.a. ein charakteristisches klinisches Erscheinungsbild zusammen mit hochtitrigen NMDAR-Autoantikörpern im Liquor.

2.4 Anreicherung antigenreaktiver T-Zellen (ARTE)

2.4.1 Versuchsaufbau

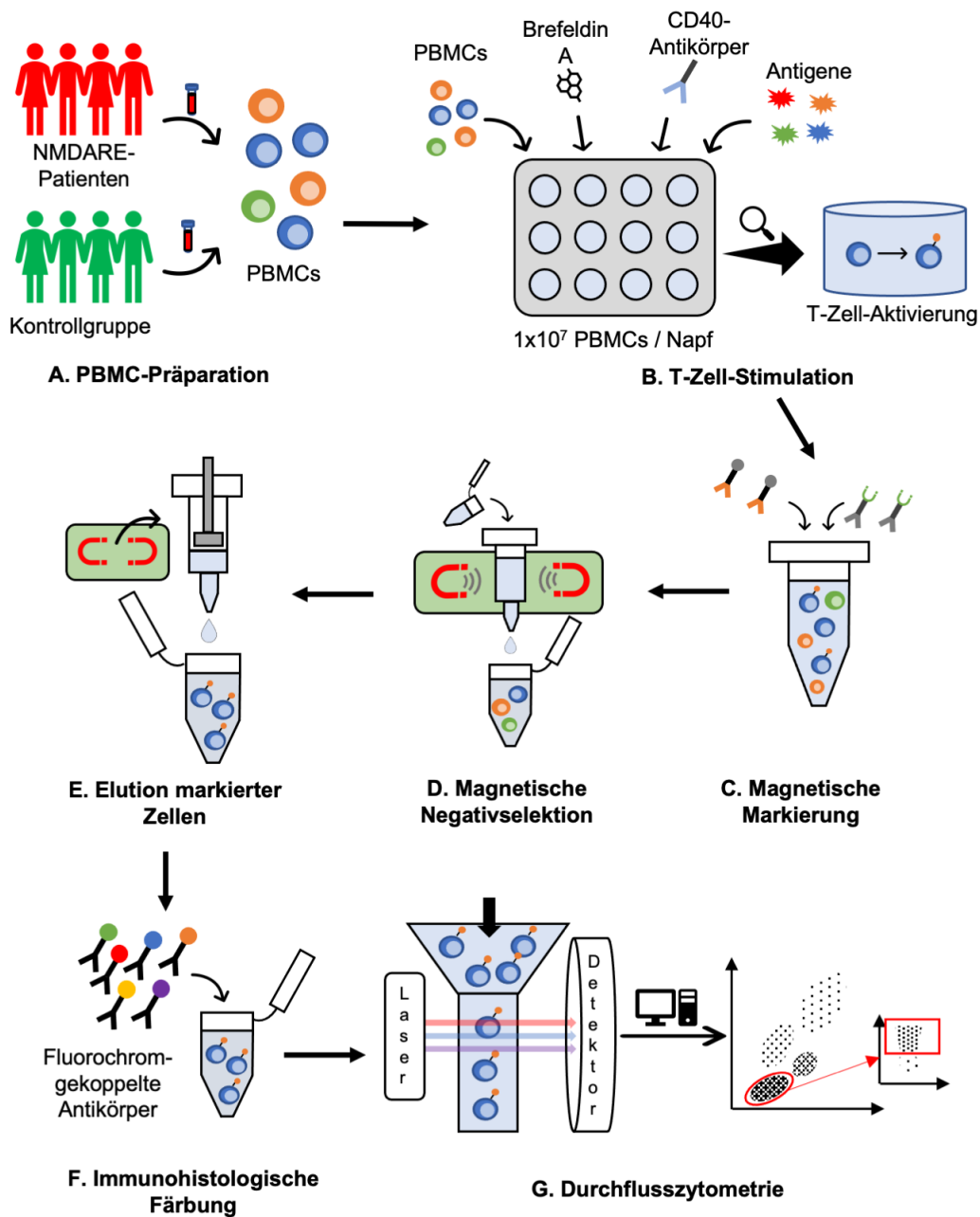


Abbildung 4: Versuchsaufbau zur Anreicherung und Färbung antigen-spezifischer CD4⁺-T-Zellen

Die Anreicherung erfolgte durch magnetische Markierung der Zielzellen und deren anschließender Isolation sowie Charakterisierung nach dem etablierten Antigen-reactive T-cell enrichment – Protokoll (148). Aus NMDARE-Patienten und Kontrollen wurde venöses Blut entnommen und die PBMCs isoliert (A). Zur T-Zell-Stimulation wurden zu jedem Napf mit 1×10^7 PBMCs in einer 12-Well-Platte ein Antigen zugegeben, wodurch aktivierte antigen-spezifische T-Zellen CD154 exprimierten. Um die anschließende Herunterregulation von CD154 durch CD40 auf antigen-präsentierenden Zellen zu verhindern dienten funktionelle CD40-Antikörper zur Blockierung der Rezeptor-Liganden-Bindung. Durch Hinzufügen von

Brefeldin A konnte den Proteintransport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum unterbrochen werden, wodurch die Sezernierung von Zytokinen wie Interferon- γ und TNF- α unterbunden wurde. Als Folge kam es zur intrazellulären Akkumulation von Zytokinen (B). Aktivierte T-Zellen wurden magnetisch markiert, indem sie α -CD154-Biotin- und α -Biotin-magnetische Beads inkubiert wurden (C). Nicht-markierte Zellen wurden über Säulen im magnetischen Feld negativ-selektiert und verworfen (D). Die Säulen wurden anschließend aus dem Magneten entfernt und markierte Zellen eluiert (E). Durch Zugabe von immunofluoreszierenden Antikörpern wurden Zellen auf der Oberfläche, nach Fixierung und Permeabilisierung auch intrazellulär markiert (F). Die Zielzellen wurden im Durchflusszytometer quantifiziert und charakterisiert (G).

2.4.2 PBMC-Isolation und Zellzählung

PBMC-Aufbereitung

PBMCs beinhalten u.a. Lymphozyten und Monozyten, die für die Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Zur Isolierung von PBMCs erfolgte eine venöse Blutabnahme beim Probanden mittels spezieller CPT-Röhrchen mit integriertem FICOLL™-Gradienten. Die Blutproben wurden innerhalb von 2 Stunden bei Raumtemperatur (21°C) bei 1600 g für 25 Minuten zentrifugiert, wodurch sich das venöse Vollblut in Schichten aufteilte. Die Röhrchen wurden unter einer sterilen Arbeitsbank eröffnet und die oberen 2 mL des Plasmas verworfen. Nach vorsichtiger Resuspension der PBMCs mit dem verbliebenen Plasma wurden sie in 50 mL Falcons transferiert. Die einzelnen Röhrchen wurden je 2 Mal mit jeweils 1 mL PBS gespült und die gespülte Flüssigkeit in das 50 mL Falcon gegeben. Die Falcons wurde mit PBS auf 50 mL aufgefüllt, verschlossen und bei 4°C bei 300 g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Falcons wurden abgekippt und das Zellpellet durch Pipettieren in 10 mL PBS resuspendiert. Daraus wurden 100 μ L für die Zellzählung entnommen. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS (50 mL PBS, 4°C, 15 Minuten) wurden die PBMCs in einer Konzentration von 1×10^7 PBMC in 1 mL RPMI/5% humanes AB-Serum resuspendiert, in 12-Well-Kulturplatten ausgesät und über Nacht (~12 Stunden) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Je ein Nöpfchen mit 1×10^7 PBMCs wurde zur Stimulation mit einem Antigen benötigt.

Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer – Improved und berechnete sich mit folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = n (\text{Mittelwert}) * 10 (\text{Verdünnungsfaktor}) * 10^4$$

Von den 100 μL der während der PBMC-Präparation entnommenen Zellsuspension wurden 10 μL mit 90 μL PBS/0.4% Trypanblau vermisch (Verdünnungsfaktor 1:10) und 10 μL in die Zählkammer gegeben. Trypanblau diente der Markierung toter Zellen. Durch die Zählung der vier 4x4 Felder ergab sich ein Mittelwert (n) aus dem sich die Zellzahl je mL errechnen ließ.

2.4.3 Antigenstimulation

Zu jedem Stimulationsansatz wurde 10 μL CD40 Antikörper (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugegeben, sodass die Endkonzentration 1 μg CD40-Antikörper/ mL betrug. Diese Antikörper blockieren CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen, weshalb die Internalisierung von exprimierten CD154 auf aktivierten CD4⁺-T-Zellen verhindert wird. Je Proband wurde ein individuelles Nöpfchen mit 1×10^7 PBMCs mit einem Antigen für 7 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ stimuliert. Als Antigene fungierten die synthetisierten Fusionsproteine ATD-GST (10 μg), S1-S2-GST (10 μg), GluN1 (ATD-GST und S1-S2-GST, jeweils 10 μg), das Neoantigen KLH (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Negativ- (100 μL PBS) und Positivkontrollen (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C. albicans – Lysat). Ein Ansatz pro Proband verblieb unstimuliert zur Berechnung der Original (ORI)-Fraktion der PBMCs, aus der sich die CD154⁺-CD4⁺-T-Zellfrequenz herleiten ließ. Nach 5 Stunden Inkubation erfolgte die Zugabe von 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Brefeldin A, welches durch Inhibition des intrazellulären Proteintransports die Sekretion von Zytokinen wie Interferon- γ und TNF- α aus der Zelle hemmt.

2.4.4 Magnetische Separation aktivierter Zellen

Jeder Stimulationsansatz wurde in ein separates 5 mL Reaktionsgefäß überführt, das jeweiligen Nöpfchen mit 2 mL PEB gespült und in das Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Waschschrift (300 g bei 4°C für 6 Minuten) wurde der Überstand abgekippt. Für die magnetische Markierung aktivierter Zellen wurde im ersten Schritt zu jedem Ansatz 10 μL α -CD154-Biotin zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei 4°C wurden die Zellen erneut mit 2 mL PEB gewaschen und der Überstand abgekippt. Im zweiten Schritt wurde 10 μL α -Biotin-MicroBeads-Antikörper je Ansatz zugegeben und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach erneutem waschen der Zellen wurde das Zellpellet in 500 μL PEB aufgenommen. Nachdem die MACS MS Columns im OctoMACS Separator am MACS Multistand platziert und mit je 500 mL PEB gespült wurden, wurde die Zellsuspension auf

die Säule gegeben. Mithilfe des magnetischen Feldes des OctoMACS Separators und den ferromagnetischen Sphären in den MACS MS Columns wurden magnetisch markierte Zellen in der Säule gehalten. Die durchgelaufene Zellsuspension wurde verworfen. Zur Umpufferung wurde die Säulen mit 500 µL PEB und anschließend mit 500 µL PBS gespült.

2.4.5 Extra- und intrazelluläre Färbung

Extrazelluläre Färbung: Die Färbung der aktivierten Zellen erfolgte in den magnetischen Säulen. Dafür wurde ein Antikörper-Mix (s. Tabelle 5) in einem verdunkelten Reaktionsgefäß vorbereitet. Je Ansatz wurde zudem Fc-Rezeptor (FcR) Blocking Reagenz zur Verhinderung der Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren humaner Zellen zugegeben, womit die Spezifität der Immunfluoreszenzfärbung erhöht wird. Zusätzlich wurde 1 µL Viobility 488/520 Fixable Dye zur Differenzierung lebender und toter Zellen verwendet. Der AK-Mix wurde auf die Säule mit den magnetisch fixierten Zellen appliziert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Säule mit 500 µL PBS gewaschen und anschließend aus dem Magneten entfernt. Die Zellen wurden unter Druck eines Kolbens mit 500 µL PEB mechanisch aus der Säule in ein 5 mL Reaktionsgefäß eluiert.

Antikörper/ Agens / Puffer	Verdünnung	Volumen je Ansatz [µL]	Beispiel mit 10 Ansätzen (+10 % Überschuss) [µL]
α-CD4-APC-Vio770	1:11	5.45	59.95
α-CD8-APC	1:11	5.45	59.95
α-CD14-FITC	1:11	5.45	59.95
α-CD20-FITC	1:11	5.45	59.95
α-CD45RA-VioGreen	1:11	5.45	59.95
α-CD45RO-VioBlue	1:11	5.45	59.95
FcR Blocking Reagenz	1:11	5.45	59.95
Viobility 488/520 Fixable Dye		1.00	11.00
PBS		20.85	229.35
Gesamtvolumen		60	660

Tabelle 5: Zusammensetzung des extrazellulären Antikörper-Mixes

Fixierung der Zellen: Zu jeder Zellsuspension wurden 200 µL Inside Fix mit Formaldehyd zur Fixierung verwendet. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im

Dunkeln wurden die Zellen auf ein zweites vorbereitetes MACS MS Column gegeben. Die Zellen wurden mit 500 μL PEB gewaschen und mit 200 μL Inside Perm Puffer umgepuffert. Dadurch werden die Zellen permeabilisiert und für die anschließende intrazelluläre Immunofluoreszenzfärbung zugänglich gemacht.

Intrazelluläre Färbung: Ein zweiter Antikörper-Mix (s. Tabelle 6) zur intrazellulären Färbung wurde in verdunkelten Reaktionsgefäßen vorbereitet und auf die magnetische Säule gegeben. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Säule mit 200 μL Inside Perm Puffer gewaschen und aus dem Magneten entfernt. Die Zellen wurden unter Druck eines Kolbens mit 1000 μL PEB aus der Säule in ein 5 mL Reaktionsgefäß eluiert. Nach Zentrifugation (300 g, 5 Minuten, 4°C) wurden 750 μL des Überstandes entfernt und das Zellpellet im Restvolumen (~250 μL) resuspendiert. Die Lagerung der Probe bis zur FACS-Messung erfolgte verdunkelt auf Eis.

Antikörper/ Agens/ Puffer	Verdünnung	Volumen je Ansatz [μL]	Beispiel mit 10 Ansätzen (+10 % Überschuss) [μL]
$\alpha\text{-IFN}\gamma\text{-PE}$	1:11	5.45	59.95
$\alpha\text{-TNF}\alpha\text{-PE-Vio770}$	1:11	5.45	59.95
$\alpha\text{-CD154-PerCP-Vio700}$	1:11	5.45	59.95
FcR Blocking Reagenz	1:11	5.45	59.95
Inside Perm Puffer		38.2	420.2
Gesamtvolumen		60	660

Tabelle 6: Zusammensetzung des intrazellulären Antikörper-Mixes

2.4.6 Original-Fraktion (ORI)

Aus dem nicht stimulierten Ansatz wurden die Zellen in ein 5 mL Reaktionsgefäß überführt, das Nöpfchen mit 2 mL PEB gespült und in das Reaktionsgefäß übertragen. Nach Zentrifugation (300 g bei 4°C für 6 Minuten) wurde der Überstand abgekippt und auf PBS umgepuffert. Die Zellen wurden mit 1 mL PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Zum Zellpellet wurden 60 μL eines zuvor vorbereiteten extrazellulären AK-Mixes (s. Tabelle 7) gegeben und das Pellet resuspendiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Zur Fixierung wurden die Zellen in 500 μL PEB und 200 μL Inside Fix resuspendiert. Die Lagerung der Probe bis zur Messung im Durchflusszytometer erfolgte verdunkelt auf Eis.

Antikörper/ Agens / Puffer	Verdünnung	Volumen je Ansatz [µL]	Beispiel mit 4 Ansätzen (+10 % Überschuss) [µL]
α-CD4-APC-Vio770	1:11	5.45	23.98
α-CD8-APC	1:11	5.45	23.98
α-CD14-FITC	1:11	5.45	23.98
α-CD20-FITC	1:11	5.45	23.98
FcR Blocking Reagenz	1:11	5.45	23.98
Viobility 488/520 Fixable Dye		1.00	4.4
PBS		31.75	139.7
Gesamtvolumen		60	264

Tabelle 7: Zusammensetzung des extrazellulären Antikörper-Mixes für die ORI-Färbung

2.5 Durchflusszytometrie

2.5.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Funktionsweise: In der Flusszelle des Durchflusszytometers passieren meist Fluorochromen gekoppelte Zellen in einer Trägerflüssigkeit einzeln mehrere Laser (fokussiertes Licht mit einer spezifischen Wellenlänge). Abhängig von Volumen und intrazellulärer Granularität streuen die Zellen das Licht in unterschiedlichem Maß. Darüber hinaus emittieren unterschiedliche Fluorochrome Licht mit unterschiedlichen Wellenlängen. Diese Signale werden über Linsen gesammelt und durch Spiegel zu den gewünschten Detektoren mit Lichtfiltern reflektiert. Dabei werden Bandpass- und Langpass-Filter unterschieden. Bandpass-Filter detektieren Licht eines schmalen Lichtspektrums (beispielsweise lässt ein 530/30-Filter Licht zwischen 515-545 nm passieren; das gefilterte Emissionsspektrum beträgt somit 30 nm). LP-Filter detektieren Licht nur oberhalb einer bestimmten Wellenlänge (685LP-Filter detektiert Licht mit einer Wellenlänge >685 nm). Die Detektoren sind in der Lage u.a. die Dauer und die Intensität des Signals zu ermitteln.

Fluorochrome: Fluorochrome werden in der Immunfluoreszenzfärbung genutzt. Hierbei kommt es nach Anregung mit Licht zur Emission von Licht mit höherer Wellenlänge. Durch die Absorption eines Photons im Fluorochrom kommt es zur Überführung eines Elektrons von einem energiearmen Grundzustand in einen energiereicheren, angeregten Zustand. Dieses fällt spontan in den energiearmen Zustand zurück und emittiert dabei ein Photon mit niedrigerer Energie (höherer Wellenlänge). Durch die Existenz mehrerer Grundzustände besitzt ein Fluorochrom ein Exzitationsspektrum mit einem

Exzitationsmaximum und auch ein Emissionsspektrum mit einem Emissionsmaximum. Diese sind für jedes Fluorochrom spezifisch. Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die genutzten Fluorochrome mit ihren jeweiligen Ex_{max} , Em_{max} und den genutzten Spiegeln und Filter im FACS Canto II.

Exzitationslaser [nm]	Fluorochrome/ Parameter	Ex_{max} [nm]	Em_{max} [nm]	Spiegel	Filter
Violett - 405	VioBlue	400	452	-	450/50
	VioGreen	388	520	502LP	510/50
Blau - 488	Forward Scatter (FSC) - Größe	-	-	-	488/10
	Sideward Scatter (SSC) - Granularität	-	-	-	488/10
	FITC	495	520	502LP	530/30
	PE	565	578	556LP	585/42
	PerCP-Vio700	482	675	655LP	670LP
	PE-Vio770	565	775	745LP	780/60
Rot - 633	APC	652	660	-	660/20
	APC-Vio770	652	775	735LP	780/60

Tabelle 8: Laser-, Filter- und Spiegelkonfiguration des FACS Canto II mit Fluorochromen

Es sind die Fluorochrome bzw. Parameter angegeben, die durch den jeweiligen Laser angeregt/ bestimmt werden. Fluorochrome sind mit ihren jeweiligen Exzitations- (Ex_{max}) und Emissionsmaxima (Em_{max}) aufgelistet. BP = Bandpass. LP = Langpass.

2.5.2 Kompensation

Überlappende Emissionsspektren: Bei der Immunfluoreszenzfärbung kommt es bei Nutzung mehrerer Fluorochrome zu überlappenden Emissionsspektren, die von mehreren Detektoren in unterschiedlicher Intensität gemessen werden (s. Abbildung 5). Diese „Kontamination“ kann rechnerisch für jedes Fluorochrom in jedem Kanal kompensiert werden.

Einzelfärbungen: Zur Kompensation sind ungefärbte Kontrollen und Einzelfärbungen mit jedem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper notwendig. Da manche Antikörper bei dieser Fragestellung nur wenige Zellen binden (z.B. TNF α -Antikörper) und somit in der Färbung ein nur schwaches Signal emittieren, waren diese für Einzelfärbungen nicht geeignet. Deswegen wurden je nach Wirtsspezies der Antikörper anti-Maus Igk bzw. anti-Mensch Igk MACS Comp Beads genutzt. Für jedes Fluorochrom-konjugierte Antikörper wurde in einem 5 mL Reaktionsgefäß 100 μ L FACS-Puffer, 20 μ L des Antikörpers und je ein

ganzer Tropfen der MACS Comp Beads – anti-mouse/-human und MACS Comp Beads – blank (jeweils ca. 50 µL) gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde jeder Ansatz mit 1 mL FACS-Puffer verdünnt und bis zur Messung am Durchflusszytometer verdunkelt auf Eis gelagert.

Kompensation: Die Kompensation der stimulierten Zellen erfolgte rechnerisch mit FlowJo nach bereits erfolgter Messung im Durchflusszytometer. Hierzu wurden die Daten der Comp Bead - Einzelfärbungen in FlowJo übertragen. Die daraus errechnete Kompensationmatrix wurde bei jeder FACS-Messung angewendet. Damit konnten überlappende „falsche“ Emissionssignale in den jeweiligen Kanälen korrigiert werden (s. Abbildung 5)

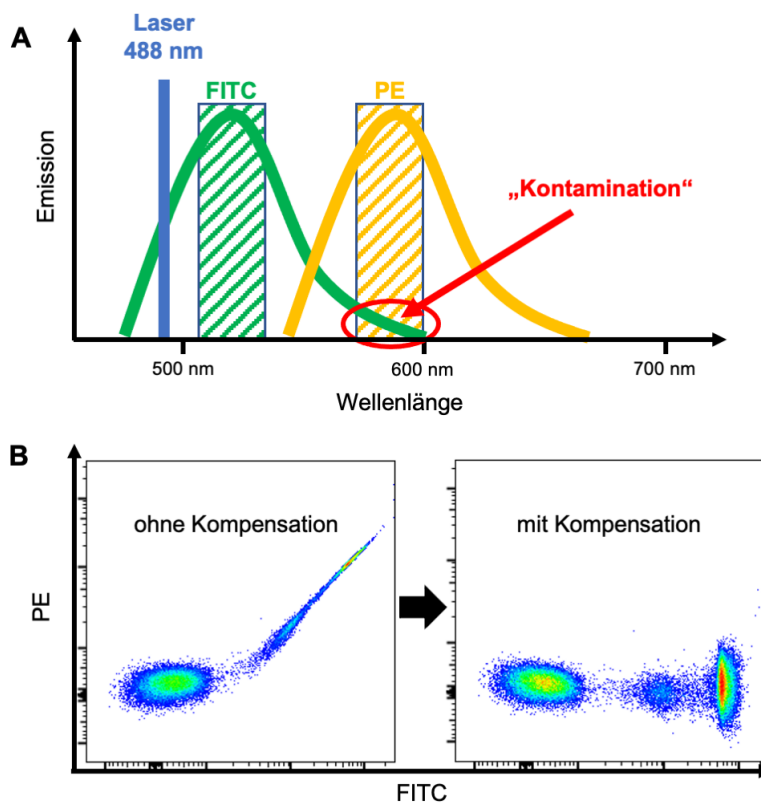


Abbildung 5: Überlappende Emissionsspektren und Kompensation

Darstellung der Emissionsspektren der Fluorochrome FITC (Grün) und PE (Orange) bei Stimulation mit dem 488 nm Laser (Blau) mit den beiden jeweiligen Filtern 530/30 (Grün gestreifter Balken) und 585/42 (Orange gestreifter Balken). Rot eingekreist ist das überlappende Emissionssignal von FITC, welches zu einem überlappenden Signal im PE-Kanal (Filter 585/42) führt (A). Es ist eine exemplarische Einzelfärbung von Comp Beads mit dem FITC-gekoppeltem Antikörper dargestellt. Vor Kompensation mit FlowJo erzeugte das Signal von FITC ein gewünschtes Signal im FITC-Kanal (x-Achse) und ein unerwünschtes „überschwappendes“ Signal im PE-Kanals (y-Achse). Nach Kompensation wurde das Signal im PE-Kanal korrigiert (B).

2.5.3 Messungen und Gating-Strategie

Die stimulierten Zell- sowie die ORI-Färbungen wurden in 5 mL Rundboden Falcon®-Röhrchen übertragen. Nach kurzem Vortexen der Proben erfolgte die Messung der gesamten Probe im Durchflusszytometer (FACS Canto II). Zwischen den einzelnen Messungen wurde das System mit Trägerflüssigkeit gespült. Anschließend erfolgte das Gating und die Kompensation mit FlowJo.

Gating für Antigenstimulation: Aus den in der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten konnten mit dem Programm FlowJo die Zellen analysiert werden. In sog. „Gates“ konnten die Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz voneinander differenziert werden. Zuerst erfolgte die Auswahl der Lymphozyten anhand der Größe und Granularität. Nach Isolation aller Einzelzellen werden CD4⁺-T-Zellen von anderen Lymphozyten oder toten Zellen getrennt. Aktivierte CD4⁺-T_H-Zellen konnten anhand ihrer CD154-Expression ausgewählt und aus ihnen die Zytokin-produzierenden T-Zellen isoliert werden (s. Abbildung 6).

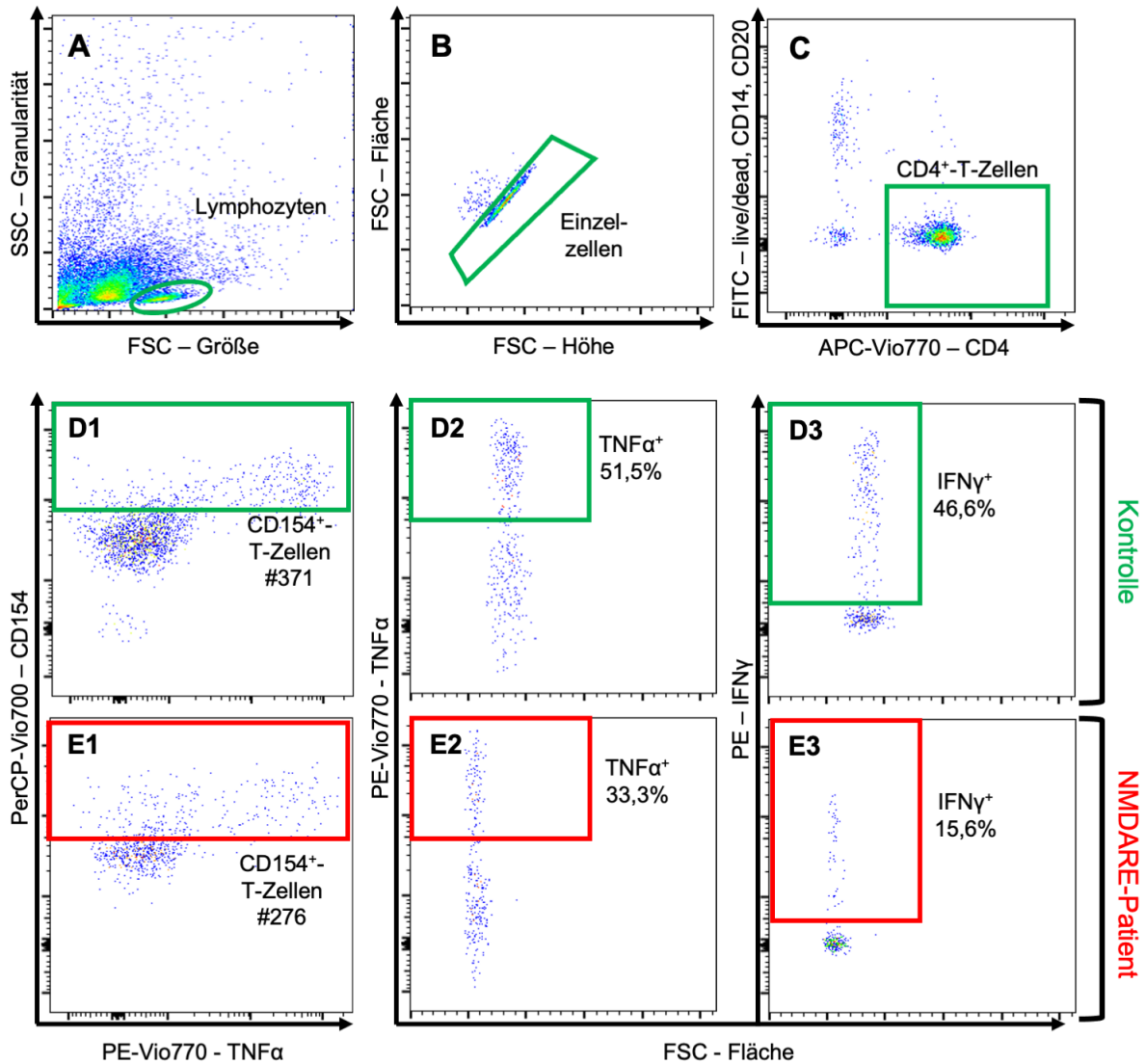


Abbildung 6: Exemplarische Gating-Strategie einer Stimulation mit S1S2

Anhand der Seitwärts- (SSC) und Vorwärtsstreuung (FSC) werden Lymphozyten ausgehend von ihrer Größe und Granularität isoliert (A). Die Messung der Daten wird in der Vorwärtsstreuung als Höhen- (FSC – Höhe) und als Flächen-Signal (FSC – Fläche) erhoben. Einzelzellen zeigen ein lineares Verhältnis zwischen Höhe und Fläche und konnten so isoliert werden (B). Tote, CD14⁺- und CD20⁺-Zellen werden im FITC-Kanal entfernt und nur die CD4⁺-Zellen im APC-Vio770-Kanal eingeschlossen (C). Es werden beispielhaft Aktivierungs- und die Zytokingates der Kontrolle (D1-3, grün) und des NMDARE-Patienten (E1-3, rot) parallel abgebildet. Die Selektion aktivierter Zellen fand anhand ihrer CD154-Expression im PerCP-Vio700-Kanal statt (# = absolute Anzahl der Ereignisse) (D1, E1). Anschließend erfolgte die Bestimmung der TNFα- (D2, E2) und IFNγ-produzierenden T-Zellen (D3, E3) im VioBlue- und PE-Vio770- bzw. PE-Kanal (prozentuale Angabe zum CD154⁺-T-Zell-Gate).

Gating für ORI: Für die Berechnung der T-Zell-Frequenzen wurde die Zahl der CD4⁺-T-Zellen innerhalb der PBMCs mithilfe der ORI-Färbung bestimmt. Die Gating-Strategie beinhaltete die Isolation aller peripheren mononukleären Einzelzellen und die Bestimmung des CD4⁺-T_H-Zell-Anteils. Dieser betrug meist zwischen 20-50% der PBMCs. Anschließend erfolgte eine Differenzierung zwischen Gedächtnis- und naiven T-Zellen (s. Abbildung 7).

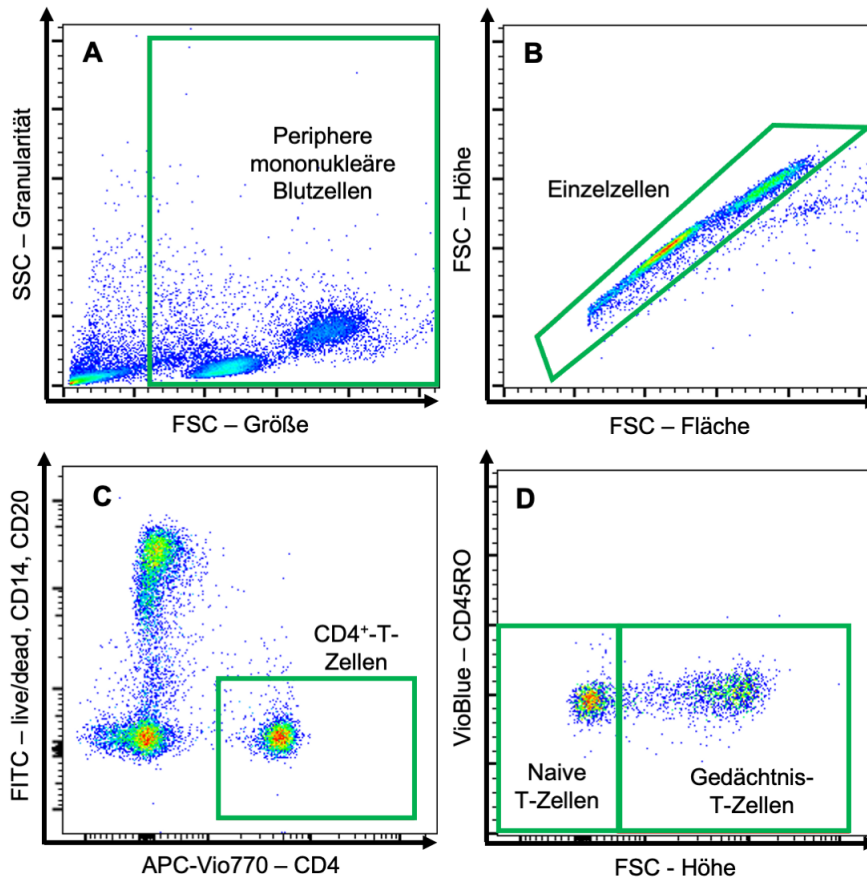


Abbildung 7: Exemplarische Gating-Strategie einer ORI-Färbung

Es wird die Gating-Strategie der ORI-Färbung einer Kontrolle dargestellt. Periphere mononukleäre Blutzellen werden anhand ihrer Größe und Granularität ausgewählt (A). Aus diesem Gate wurden Einzelzellen isoliert (B) und anschließend der prozentuale Anteil an CD4⁺-T-Zellen bestimmt (C). Anhand der Expression von CD45RO wurde zwischen Gedächtnis- und naiven T-Zellen unterschieden (D).

2.6 Statistische Auswertung

Die in FlowJo ermittelten Daten wurden mit Microsoft Excel und GraphPad Prism ausgewertet. Zur Berechnung der antigenreaktiven CD4⁺-T-Zellfrequenzen wurde die Anzahl an absoluten CD4⁺-T-Zellen benötigt. Dazu erfolgte bei jedem Patienten eine

ORI-Färbung, bei der der Prozentsatz an CD4⁺-T-Zellen innerhalb der PBMCs bestimmt wurde. Aus ihr ließ sich die absolute Anzahl an CD4⁺-T-Zellen in jedem Stimulationsansatz herleiten. Ließen sich beispielsweise 30% CD4⁺-T-Zellen in der ORI-Färbung nachweisen, ergaben sich je Ansatz 3×10^6 CD4⁺-T-Zellen bei einer Stimulation von je 1×10^7 PBMCs.

Nachdem bei jedem Probanden als Hintergrund die PBS-reaktiven Zellen aus der Kontroll-Stimulation von jedem anderen Ansatz abgezogen wurde, ließ sich die Frequenz an antigenreaktiven CD154⁺CD4⁺-T-Zellen im Probanden berechnen. Bei einer Messung von bspw. 600 ATD-reaktiven CD154⁺CD4⁺-T-Zellen ergab sich bei 3×10^6 CD4⁺-T-Zellen eine T-Zell-Frequenz von 1 in 2×10^{-4} ATD-spezifischen CD4⁺-T-Zellen.

Bei T-Zell-Frequenzen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen wurde eine logarithmische Transformation durchgeführt. Zur Prüfung, ob die gewonnenen Daten in der Gruppe normalverteilt sind, wurde der Shapiro-Wilk- und der D'Agostino Pearson Test angewendet. Da eine Normalverteilung gezeigt werden konnte wurde zum Vergleich von zwei Gruppen der zweiseitige Student-t-Test angewendet. In allen Graphen sind Mittelwerte mit Standardabweichungen sichtbar. Das Signifikanzlevel wurde mit $p < 0.05$ definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinsynthese

3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Nach Hitzeschocktransformation der Plasmide in *E. coli* (BL21) wurden diese auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und aus einer ausgewählten Kolonie ein Glycerolstock hergestellt. Mit der gleichen Kolonie erfolgte eine Kolonie-PCR zur Kontrolle der erfolgreichen Transformation. Durch die Schnittstelle der verwendeten Primer entstand ein ca. 300 bp langer Abschnitt des pGEX-Vektors. Zusammen mit den DNA-Inserten (ATD – 1179 bp; S1S2 – 873 bp) ergaben sich PCR-Produkte mit einer Länge von ca. 1500 bp (ATD) bzw. 1200 bp (S1S2). Diese DNA-Länge konnte in der Agarose-Gelelektrophorese bestätigt werden (s. Abbildung 8).

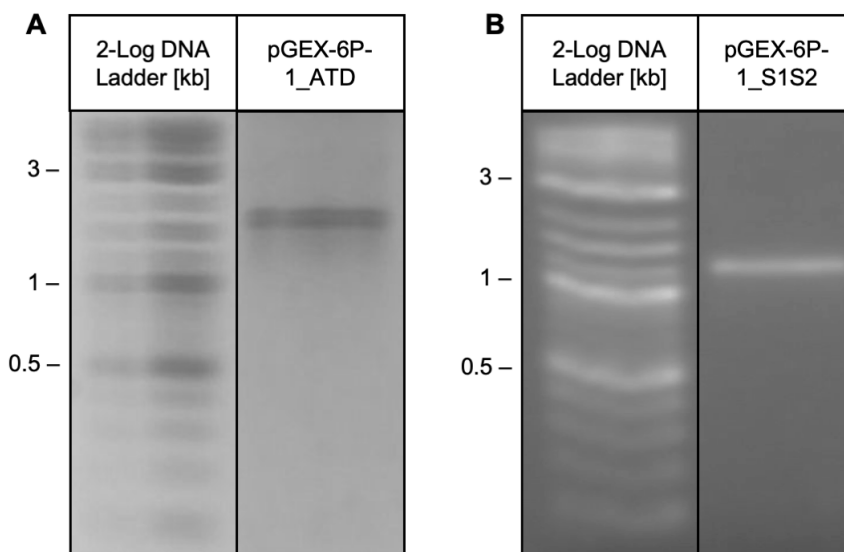


Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese von Kolonie-PCR-Produkten

In der linken Säule ist jeweils die 2-Log DNA-Leiter aufgetragen, welches die Einordnung der DNA-Länge des PCR-Produkts ermöglicht. In der Agarose-Gelelektrophorese ist beim PCR-Produkt des ATD-Plasmids eine Bande mittig zwischen den 1- und 3 kb-Markern erkennbar, was bei der logarithmischen DNA-Leiter in etwa 1.5 kb entspricht und damit mit der errechneten Länge von ca. 1500 bp übereinstimmt (A). Das PCR-Produkt für S1S2 zeigt eine erwartete Bande etwas oberhalb der 1 kb-Bande, entsprechend kalkulierten Größe von 1.2 kb (B).

3.1.2 Proteinnachweis

SDS-PAGE

Zum Nachweis der Fusionsproteine und zur Kontrolle der einzelnen Schritte der Proteinsynthese wurden Acrylamid-Gele mit den Kontrollen beladen und unter Spannung der Größe nach aufgeteilt. Neben den sich im Eluat befindlichen aufgereinigten GST-Fusionsproteinen wurden weitere Proben während der Proteinsynthese und -aufreinigung zur Kontrolle der getesteten Expressionsparameter wie z.B. Temperatur, IPTG-Konzentration und Induktionsdauer entnommen und in der SDS-PAGE aufgetragen (s. Abbildung 9; A). Die Methode ermöglichte zudem eine ungefähre Einordnung der Proteingröße und gab Aufschlüsse über mögliche Verunreinigungen. Während in den Elektrophorese-Säulen „nicht-induziert“ bis „ungebunden“ viele verschiedene Banden unterschiedlicher Größe nachweisbar waren, ließ sich in den „Elutions“-Säulen jeweils nur eine isolierte Bande klar abgrenzen. Die Masse des GST-Tags betrug ca. 26 kDa. Das Molekulargewicht von ATD und S1S2 ließ sich anhand ihres DNA-Inserts im pGEX-Vektor berechnen. So ergaben sich für das ATD-Insert mit 1179 bp ein Protein mit 393 AS. Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 110 Da/AS ließ sich für ATD eine Masse von ~43 kDa berechnen. Entsprechend zeigte das S1S2-Konstrukt mit einem DNA-Insert von 873 bp ein Protein mit der Masse von ~32 kDa. Dadurch ergaben sich Fusionsproteine mit der Masse von ~69 kDa (ATD-GST) bzw. ~58 kDa (S1S2-GST), welche mit den Proteinbanden im SDS-PAGE übereinstimmen (s. Abbildung 9; B-C).

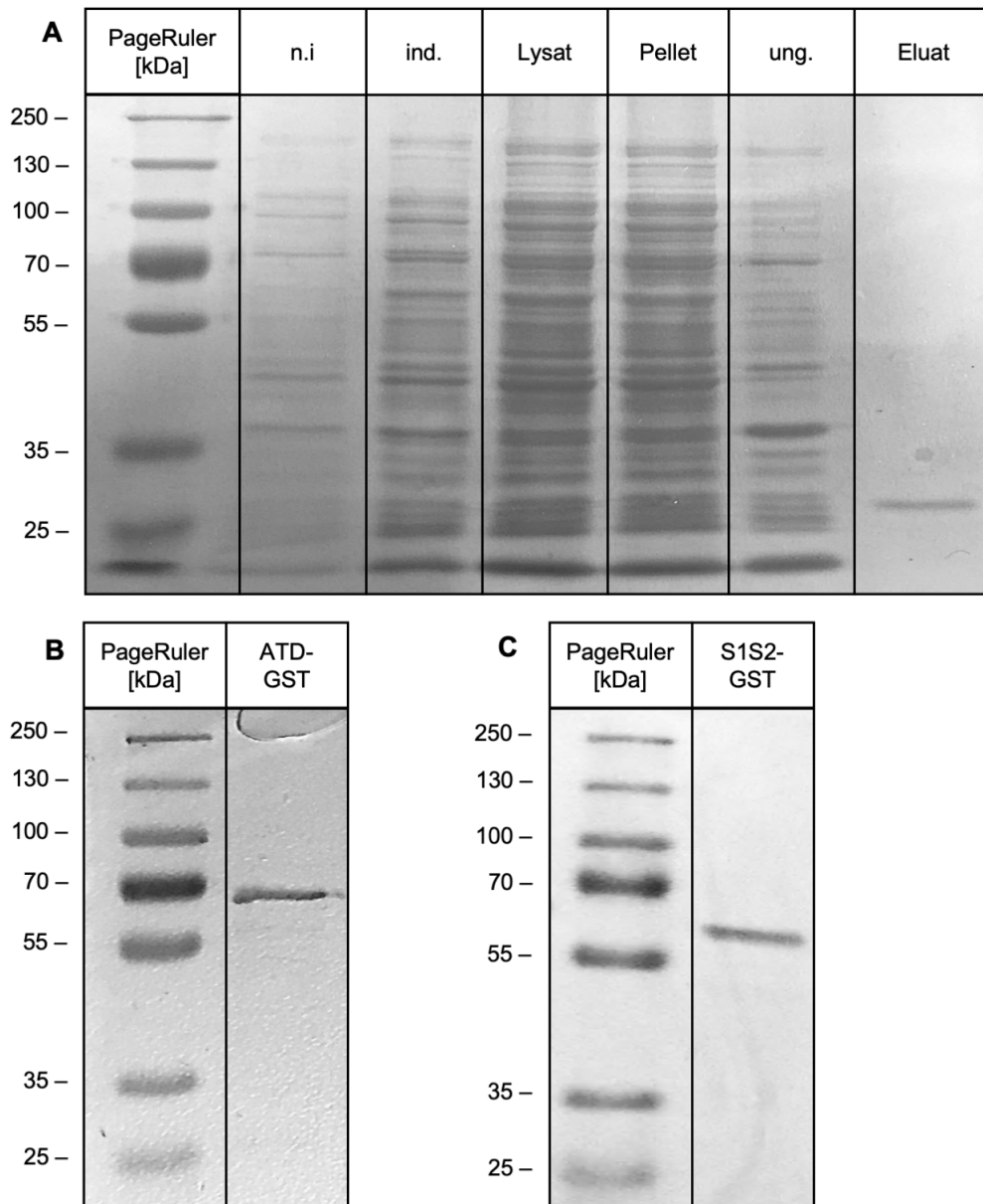


Abbildung 9: Gelelektrophorese von GST-, ATD- und S1S2-Proteinaufreinigungen

In den jeweils linken Säulen ist der PageRuler als Proteinleiter aufgetragen, welche die Einordnung der Proteinmasse ermöglicht. In der exemplarischen SDS-PAGE einer GST-Aufreinigung ließen sich wie erwartet in den Säulen der Proben „nicht induziert“ (= n.i.), „induziert“ (= ind.), „Lysat“ (= Lys.), „Pellet“ (= Pel.) und „ungebunden“ (= ung.) viele Banden unterschiedlicher Intensität und atomarer Masse beobachten. Nach Isolation und Dialyse des Zielproteins ist in der Säule „Eluat“ (= elu.) eine einzelne Bande oberhalb des 25 kDa-Markers erkennbar, welches mit der Masse von GST (26 kDa) übereinstimmt (A). Entsprechend der errechneten Proteinmassen von 69 kDa für ATD-GST und 58 kDa für S1S2-GST zeigten die SDS-PAGEs übereinstimmende isolierte Proteinbanden unterhalb des 70 kDa-Markers für ATD-GST (B) bzw. oberhalb des 55 kDa-Markers für S1S2-GST (C).

Dot Blot:

Neben dem SDS-PAGE diente der Dot Blot dem spezifischen Nachweis der Fusionsproteine. Hierfür wurden monoklonale Erstantikörper aus Tieren verwendet, welche mit kurzen Aminosäuresequenzen des GluN1 immunisiert wurden. Zur Kontrolle des GST-Proteins wurde der Ziege- α -GST-Antikörper verwendet, welcher ein Signal bei allen synthetisierten (Fusions-)Proteinen zeigte, jedoch wie erwartet keines bei GluN1-transfizierten HEK-Zellen (Positivkontrolle). Das bestätigt das Vorkommen des GST-Tags bei den Fusionsproteinen ATD-GST und S1S2-GST (s. Abbildung 10; A). Zum Nachweis des ATD-Proteins wurde ein Kaninchen- α -GluN1-Antikörper genutzt, welches gegen die AS 35-53 reaktiv ist. Dieser band wie erwartet an das ATD-GST und die Positivkontrolle und nicht an GST oder S1S2-GST (s. Abbildung 10; C). Entsprechend zeigte der Maus- α -GluN1 (immunogen gegen AS 660-811) das Vorhandensein der S2-Untereinheit beim S1S2-GST sowie in der Positivkontrolle und kein Signal beim ATD-GST und GST (s. Abbildung 10; B). In der Primärstruktur der GluN1-Untereinheit entsprachen die ersten 400 AS ungefähr dem ATD und die AS zwischen ca. 650-810 der S1-Region (153).

Proteinquantifizierung nach Bradford mit dem BCA-Test

Zur Quantifizierung der vorhandenen Proteinkonzentration wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford mit dem BCA-Test durchgeführt. Aus der BSA-Standardreihe wurde eine Standardkurve generiert, aus der die Konzentrationen der Proteine aus den einzelnen Aufreinigungen bestimmt werden konnten. Die Konzentrationen der synthetisierten Fusionsproteine variierten je nach Aufreinigung und betrugen zwischen 65-380 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

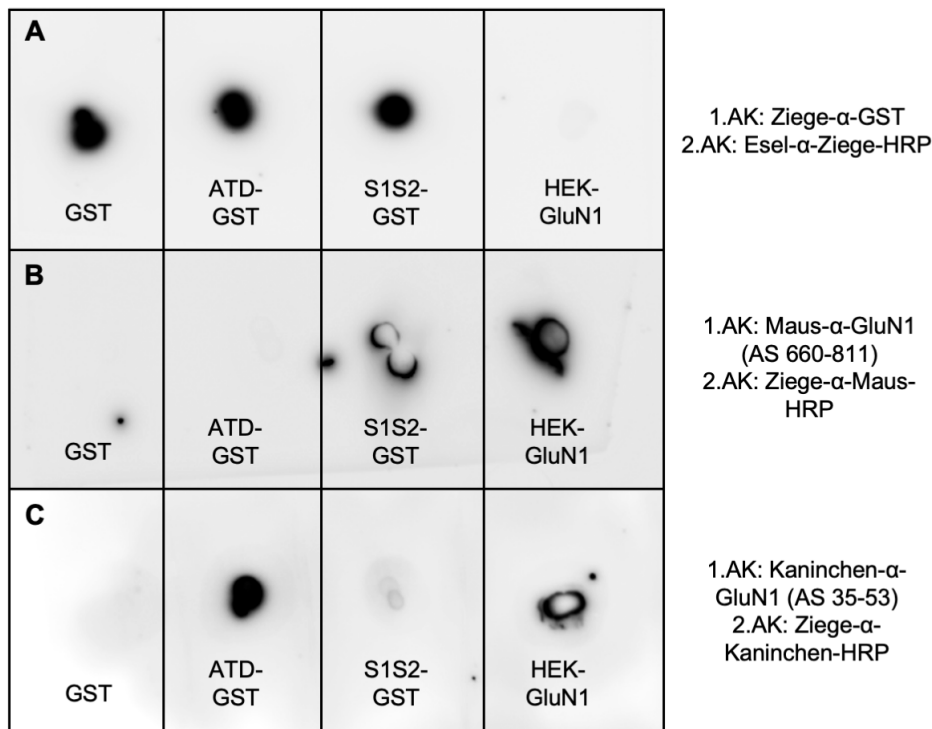


Abbildung 10: Dot Blot von Syntheseprodukten und Kontrollen

Mit dem Erstantikörper Ziege-α-GST und entsprechendem Zweitantikörper Esel-α-Ziege-HRP konnten Signale in den synthetisierten (Fusion-)Proteinen gezeigt werden, welches GST in ihnen nachweist. Die Positivkontrolle HEK-GluN1 zeigte keine Veränderung (A). Die extrazelluläre S1-Domäne konnte im S1S2-GST und in der Positivkontrolle mit dem Erstantikörper Maus-α-GluN1 (AS 660-811) und dem Zweitantikörper Ziege-α-Maus-HRP nachgewiesen werden. GST und ATD-GST entwickelten kein Signal (B). Entsprechend konnte das ATD in ATD-GST und in GluN1 transfizierten HEK-Zellen mit dem Erstantikörper Kaninchen-α-GluN1 (AS 35-53) und entsprechendem Zweitantikörper nachgewiesen werden (C).

3.2 Studienkohorte

Es wurden 16 NMDARE-Patienten und 23 alters- und geschlechtsangepasste in die Studie eingeschlossen. Es waren vor allem Frauen von der NMDARE betroffen (14 Frauen vs. 2 Männer). Demgegenüber standen 17 Frauen und 6 Männer in der Kontrollgruppe. Das durchschnittliche Alter lag bei 34.1 ± 13.2 [\pm Standardabweichung] Jahren für die NMDARE-Patienten und bei 33.5 ± 12.8 für die Kontrollen (Stichtag ist der 31.12.2018). Die meisten Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Blutabnahme eine immunsuppressive Therapie (s. [Tabelle 9](#))

Studienkohorte	NMDARE-Patienten*	Kontrollen
Teilnehmer (n)	24	23
Geschlecht	21 F, 3 M	17 F, 6 M
Ø-Alter in Jahren (± SD)	31.9 (± 11.9)	33.5 (± 12.8)
Ø Zeit zwischen Krankheitsbeginn und Probenentnahme in Monaten (± SD)	27.8 (± 19.0)	-
Immuntherapie		
- Steroide	23 (95.8%)	0 (0%)
- Plasmapherese/ Immunadsorption	19 (79.2%)	0 (0%)
- Rituximab	20 (83.3%)	0 (0%)
- IVIGs	13 (54.2%)	0 (0%)
- Cyclophosphamid, MTX, Bortezomib, Azathioprin, Mycophenolatmofetil	5 (20.8%)	0 (0%)
Autoimme Komorbiditäten	Schilddrüsenerkrankung (2) Multiple Sklerose (1)	0
Tumorerkrankungen	Ovarialkarzinom (1) Ovarialteratome (5)	0

* Der Datensatz der NMDARE-Patienten enthält alle in der Studie eingeschlossenen Patienten und daher auch 8 erst später rekrutierte Patienten, deren Proben ich nicht bearbeitet habe.

Tabelle 9: Klinische, epidemiologische und therapeutische Informationen der Studienteilnehmer

SD = Standardabweichung, Ø = Durchschnitt, F = Frauen, M = Männer

3.3 Auswertung der Daten aus der Durchflusszytometrie

3.3.1 Patienten und Kontrollen zeigen keine Unterschiede in der ORI-Färbung

In der Bestimmung der CD4⁺-T-Zell-Fraktion innerhalb der PBMCs, welche für die spätere Berechnung der antigenspezifischen T-Zell-Frequenzen von Bedeutung ist, ließen sich keine Unterschiede zwischen NMDARE-Patienten und Kontrollen feststellen [CD4: NMDARE-Patienten ($M = 0.357$, $SD = 0.079$), Kontrollen ($M = 0.359$, $SD = 0.059$), $t(37) = 0.047$, $p = .963$] (s. Abbildung 11; A). Auch zeigten NMDARE-Patienten und Kontrollen keine Unterschiede in der Verteilung von naiven CD4⁺CD45RA⁺- und Gedächtnis-CD4⁺CD45RO⁺-T-Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen [CD4CD45RA: NMDARE-Patienten ($M = 0.479$, $SD = 0.094$), Kontrollen ($M = 0.478$, $SD = 0.119$), $t(35) = 0.018$, $p = .986$; CD4CD45RO: NMDARE-Patienten ($M = 0.509$, $SD = 0.096$), Kontrollen ($M = 0.503$, $SD = 0.110$), $t(35) = 0.154$, $p = .878$] (s. Abbildung 11; B). Diese Werte sind von Bedeutung, weil die Gewichtung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen im Alter variiert

(154). Da hier keine Unterschiede beobachtet werden konnten, sind die Vergleiche nach Stimulation und magnetischer Anreicherung der errechneten T-Zell-Frequenzen möglich.

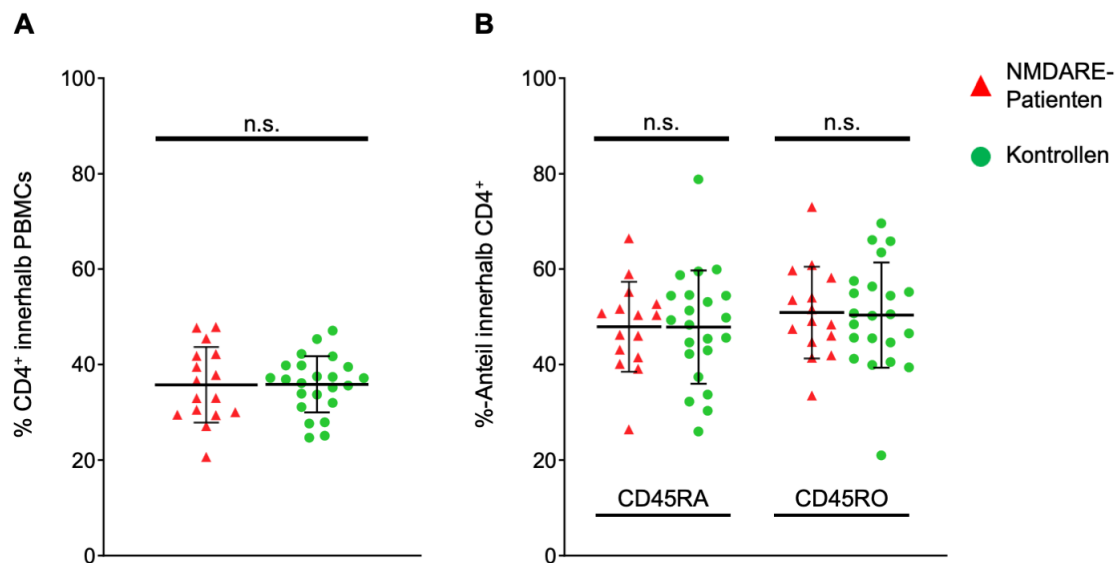


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der CD4⁺-Zellen in der Original-Fraktion

Jeder Punkt repräsentiert einen NMDARE-Patienten (rote Dreiecke) bzw. eine Kontrolle (grüner Kreis). Die y-Achse gibt den prozentualen Wert innerhalb des übergeordneten Gates an. In der ORI-Färbung zeigte sich kein Unterschied in der prozentualen Verteilung von CD4⁺-T-Zellen innerhalb der PBMCs zwischen NMDARE-Patienten und Kontrollen (A). Im nächsten Schritt wurde die prozentuale Verteilung der CD4⁺CD45RA⁺-T-Zellen (naive T_H-Zellen) bzw. der CD4⁺CD45RO⁺-T-Zellen (Gedächtnis T_H-Zellen) miteinander verglichen (B). In keinen der drei Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.3.2 NMDARE-Patienten haben erniedrigte Frequenzen von S1S2- und ATD+S1S2-reaktiven CD154⁺-T-Zellen

Die Antigenreaktivität wurde anhand der extrazellulären Regionen ATD, S1 und S2 der GluN1-Domäne untersucht. Die Untersuchung von ATD als Hauptepitop der pathogenetisch relevanten GluN1-Antikörper in NMDARE-Patienten erfolgte separat. Das Fusionsprotein S1S2, welche zusammen als funktionelle Einheit die Ligandenbindungsdomäne bilden, repräsentieren den restlichen Anteil der extrazellulären Domäne von GluN1. Das Schlitzschnecken-Hämocyanin (engl. Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH) diente als Negativkontrolle, da es als Protein der großen kalifornischen Schlüssellockschnecke für das Immunsystem des Menschen unbekannt ist und folglich als „Neoantigen“ genutzt werden kann.

Entgegen der anfangs aufgestellten Hypothese konnte keine erhöhte Anzahl an GluN1-reaktiven CD154-exprimierenden CD4⁺-T-Zellen in NMDARE-Patienten beobachtet werden. Im Gegenteil zeigte sich sogar eine signifikant verminderte Anzahl an GluN1-reaktiven aktivierten CD4⁺-T-Zellen in NMDARE-Patienten nach Stimulation mit S1S2 und ATD + S1S2 gegenüber den Kontrollen [S1S2: NMDARE-Patienten ($M = -4.28$, $SD = 0.31$), Kontrollen ($M = -3.86$, $SD = 0.51$), $t(30) = 2.748$, $p = .010$; ATD+S1S2: NMDARE-Patienten ($M = -4.19$, $SD = 0.27$), Kontrollen ($M = -3.74$, $SD = 0.51$), $t(19) = 2.4$, $p = .027$]. Obwohl kein signifikanter Unterschied in den ATD-spezifischen T-Zell-Frequenzen festgestellt werden konnte, zeigte sich hier die gleiche Tendenz [ATD: NMDARE-Patienten ($M = -4.19$, $SD = 0.37$), Kontrollen ($M = -3.90$, $SD = 0.51$), $t(30) = 1.738$, $p = .094$]. Demgegenüber zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den CD154⁺-T-Zellfrequenzen nach Stimulation mit dem Neoantigen KLH [KLH: NMDARE-Patienten ($M = -4.56$, $SD = 0.34$), Kontrollen ($M = -4.35$, $SD = 0.30$), $t(23) = 1.662$, $p = .110$] (s. Abbildung 12; B). Es wurde wie erwartet eine niedrigere KLH-spezifische CD154⁺-T-Zellfrequenz im Vergleich zum Autoantigen GluN1 beobachtet (145).

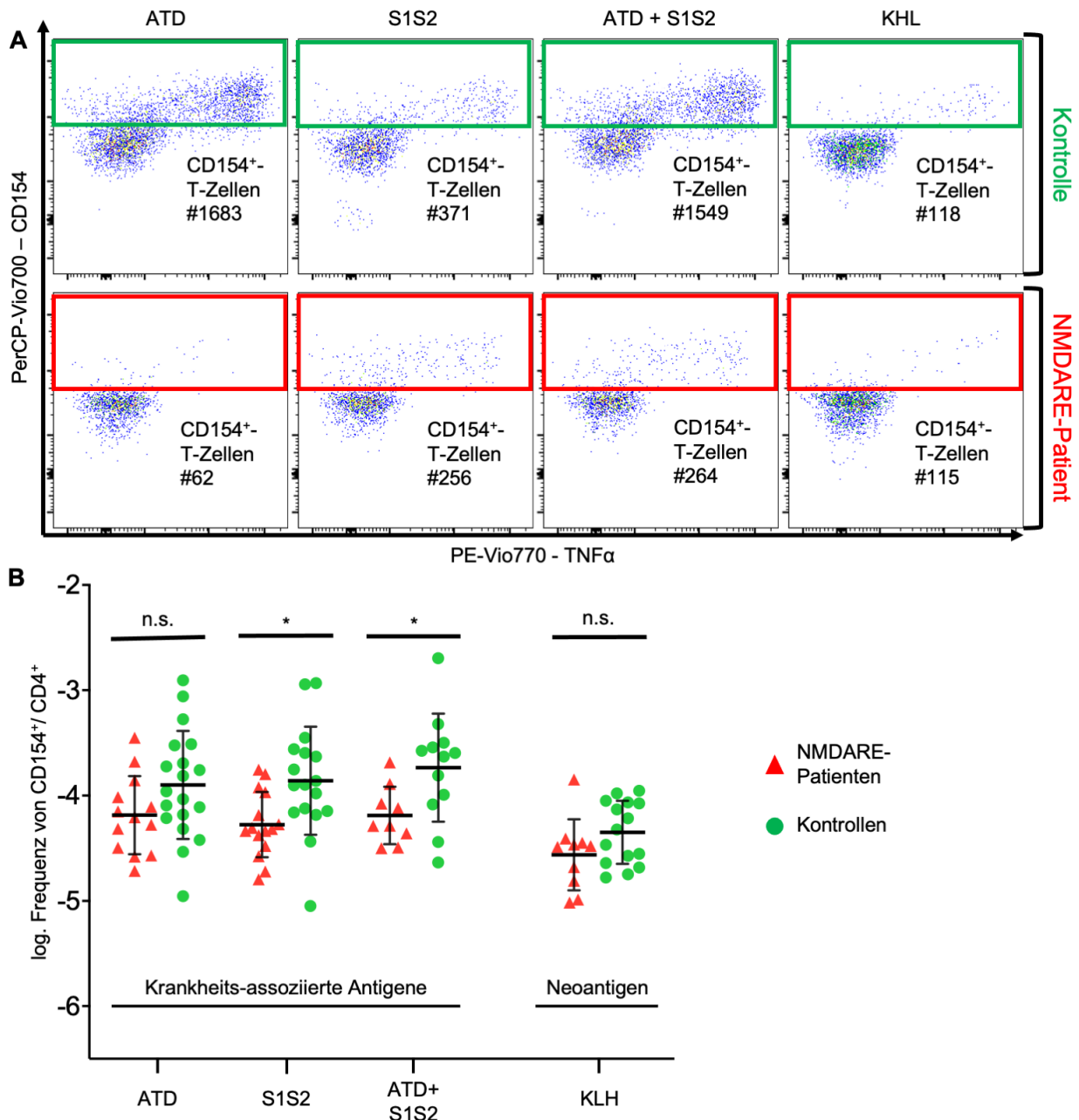


Abbildung 12: CD154-Expression durch CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit Antigenen

Exemplarische Darstellung der Anzahl von CD154-exprimierenden CD4⁺-T-Zellen (# = absolute Anzahl der Ereignisse) der gleichen Kontrolle (oben, grün) bzw. desselben NMDARE-Patienten (unten, rot) nach Stimulation mit den oberhalb angegebenen Antigenen (A). Logarithmische Darstellung der aktivierten antigenreaktiven CD154⁺-T-Zell-Frequenzen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen. Jeder Punkt repräsentiert einen NMDARE-Patienten (rote Dreiecke) bzw. eine Kontrolle (grüner Kreis). ATD und S1S2 sind krankheitsassoziierte Antigene. KLH diente als Kontrollneoantigen. Die y-Achse gibt die logarithmische Frequenz von CD154-exprimierenden Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen an. Es zeigten sich signifikant niedrigere Frequenzen von antigenreaktiven CD154⁺-T-Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit S1S2 und ATD+S1S2 zwischen NMDARE-Patienten und Kontrollen. Es konnten keine Unterschiede nach Stimulation mit ATD oder dem Neoantigen KLH beobachtet werden (B).

3.3.3 Verminderte Produktion von inflammatorischen Zytokinen in CD154⁺-T-Zellen von NMDARE-Patienten

Im nächsten Schritt wurde ermittelt, ob antigenreaktive CD154⁺-T-Zellen in NMDARE-Patienten inflammatorische Zytokine unterschiedlich stark gegenüber Kontrollen exprimieren. Dazu wurde zum einen die Frequenz von Zytokinproduzenten innerhalb der CD4⁺-T-Zellen und zum anderen der prozentuale Anteil der Zytokinproduzenten innerhalb aktivierter CD4⁺-T-Zellen bestimmt.

Die Auswertung der Frequenz von TNF α - und IFN γ -Produzenten innerhalb der CD4⁺-T-Zellen ergab erneut entgegen der Hypothese keine verstärkte Immunantwort gegen krankheitsassoziierte Antigene in NMDARE-Patienten gegenüber den Kontrollen. In bereits reduzierten antigenspezifischen T-Zellen zeigte sich sogar eine signifikante Reduktion der TNF α -Produzenten gegen die krankheitsspezifischen Antigene in NMDARE-Patienten [ATD: NMDARE-Patienten ($M = -4.512$, $SD = 0.425$), Kontrollen ($M = -4.082$, $SD = 0.541$), $t(31) = 2.421$, $p = .022$; S1S2: NMDARE-Patienten ($M = -4.573$, $SD = 0.34$), Kontrollen ($M = -4.059$, $SD = 0.523$), $t(30) = 3.252$, $p = .003$; ATD+S1S2: NMDARE-Patienten ($M = -4.475$, $SD = 0.228$), Kontrollen ($M = -3.855$, $SD = 0.465$), $t(18) = 3.645$, $p = .002$] (s. Abbildung 13; B). Unterstützt wurden die Befunde durch eine gleichzeitige Reduktion der IFN γ -Produktion [ATD: NMDARE-Patienten ($M = -4.626$, $SD = 0.462$), Kontrollen ($M = -4.156$, $SD = 0.666$), $t(31) = 2.213$, $p = .034$; S1S2: NMDARE-Patienten ($M = -4.695$, $SD = 0.396$), Kontrollen ($M = -4.129$, $SD = 0.65$), $t(30) = 2.928$, $p = .007$; ATD+S1S2: NMDARE-Patienten ($M = -4.69$, $SD = 0.314$), Kontrollen ($M = -3.864$, $SD = 0.516$), $t(19) = 4.231$, $p < .001$] (s. Abbildung 14; B). Es zeigte sich jedoch in beiden Auswertungen gleichzeitig eine unerwartete signifikante Reduktion der Zytokin⁺CD154⁺CD4⁺-T-Zell-Frequenzen gegen das KHL-Neoantigen in NMDARE-Patienten gegenüber Kontrollen [TNF α : NMDARE-Patienten ($M = -5.023$, $SD = 0.378$), Kontrollen ($M = -4.739$, $SD = 0.279$), $t(23) = 2.171$, $p = .041$; IFN γ : NMDARE-Patienten ($M = -5.449$, $SD = 0.379$), Kontrollen ($M = -5.062$, $SD = 0.387$), $t(23) = 2.474$, $p = .021$;] (s. Abbildung 13; B und Abbildung 14; B).

Parallel wurde der relative Anteil an Zytokinproduzenten innerhalb der aktivierten CD154⁺-T-Zellen untersucht. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die Zytokinproduktion (TNF α und IFN γ) innerhalb der aktivierten T-Zellen in NMDARE-Patienten sich gegenüber den Kontrollen unterscheidet. Es konnte wiederholt entgegen der aufgestellten Hypothesen in aktivierten GluN1-reaktiven CD4⁺-T-Zellen von

NMDARE-Patienten eine signifikant reduzierte Expression von TNF α nach Stimulation mit extrazellulären GluN1-Domänen gegenüber den Kontrollen festgestellt werden [ATD: NMDARE-Patienten ($M = 0.394$, $SD = 0.155$), Kontrollen ($M = 0.542$, $SD = 0.139$), $t(31) = 2.846$, $p = .008$; S1S2: NMDARE-Patienten ($M = 0.416$, $SD = 0.141$), Kontrollen ($M = 0.555$, $SD = 0.137$), $t(30) = 2.837$, $p = .008$]; ATD+S1S2: NMDARE-Patienten ($M = 0.444$, $SD = 0.121$), Kontrollen ($M = 0.581$, $SD = 0.075$), $t(19) = 3.220$, $p = .005$] (s. Abbildung 13; C). Die Auswertung der IFN γ -Produktion zeigte ähnliche Ergebnisse. Alle Stimulationen mit krankheitsassoziierten Antigenen zeigten einen signifikant reduzierten prozentualen Anteil an IFN γ -Produzenten innerhalb aktivierter CD154⁺-T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe [ATD: NMDARE-Patienten ($M = 0.311$, $SD = 0.157$), Kontrollen ($M = 0.499$, $SD = 0.218$), $t(31) = 2.679$, $p = .012$; S1S2: NMDARE-Patienten ($M = 0.318$, $SD = 0.134$), Kontrollen ($M = 0.494$, $SD = 0.207$), $t(30) = 2.818$, $p = .009$; ATD+S1S2: NMDARE-Patienten ($M = 0.286$, $SD = 0.101$), Kontrollen ($M = 0.593$, $SD = 0.192$), $t(19) = 4.339$, $p < .001$] (s. Abbildung 14; C). Anders als in der CD154⁺CD4⁺-T-Zell-Frequenz zeigte die Stimulation mit KLH keinen Unterschied in der prozentualen Produktion der Zytokine innerhalb aktivierter CD4⁺-T-Zellen zwischen NMDARE-Patienten und Kontrollen [TNF α : NMDARE-Patienten ($M = 0.362$, $SD = 0.107$), Kontrollen ($M = 0.420$, $SD = 0.108$), $t(23) = 1.329$, $p = .197$; IFN γ : NMDARE-Patienten ($M = 0.149$, $SD = 0.080$), Kontrollen ($M = 0.249$, $SD = 0.175$), $t(15) = 0.412$, $p = .686$] (s. Abbildung 13; C und Abbildung 14; C).

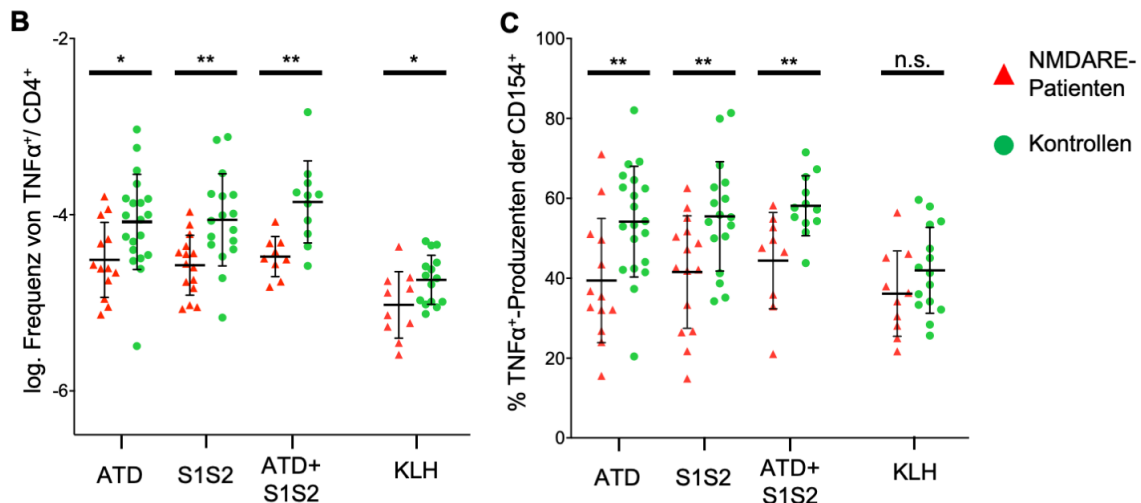
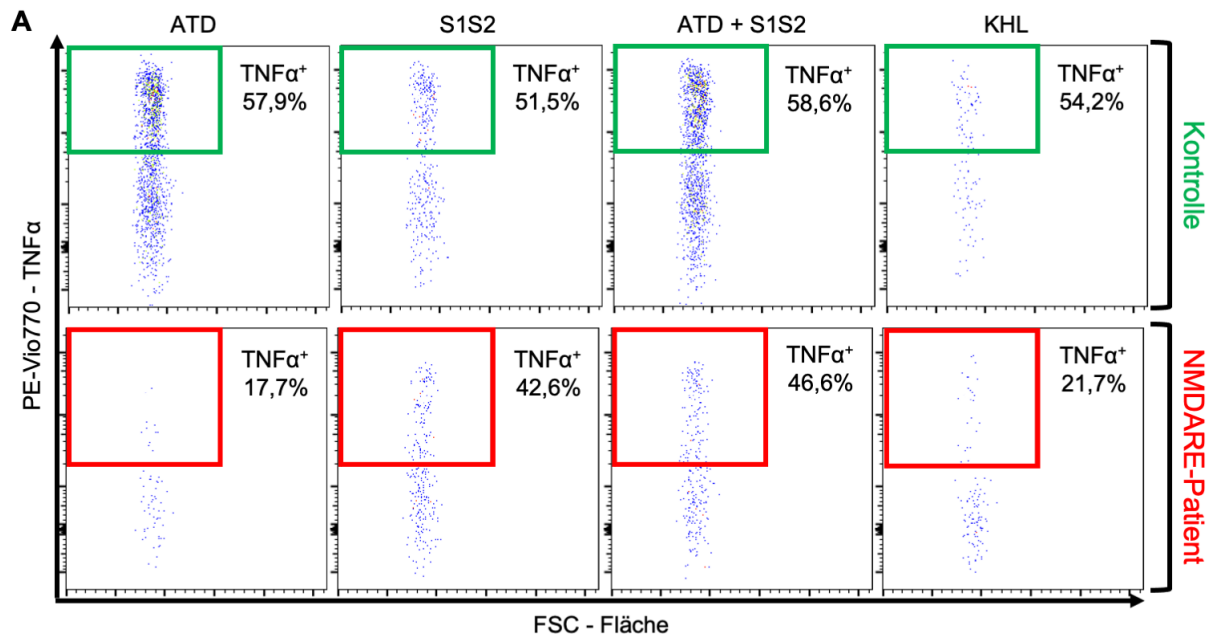


Abbildung 13: TNFα-Expression aktivierter CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation

Exemplarische Darstellung der TNFα-Expression innerhalb der CD154-exprimierenden CD4⁺-T-Zellen der gleichen Kontrolle (grün) bzw. desselben NMDARE-Patienten (rot) nach Stimulation mit den oberhalb angegebenen Antigenen (A). Jeder Punkt repräsentiert einen NMDARE-Patienten (rote Dreiecke) bzw. eine Kontrolle (grüner Kreis) (B-C). Die y-Achse gibt die logarithmische Frequenz der TNFα⁺CD154⁺-Expression innerhalb der CD4⁺-T-Zellen (B) bzw. den prozentualen Anteil an TNFα-Produzenten innerhalb der CD154⁺CD4⁺-T-Zellen an (C). Es zeigt sich nach Stimulation mit ATD, S1S2 und ATD+S1S2 eine signifikante Reduktion der TNFα⁺CD154⁺CD4⁺-T-Zell-Frequenzen (B) und eine signifikant verminderte prozentuale TNFα-Expression innerhalb aktivierter CD4⁺-T-Zellen (C). Während sich nach Stimulation mit dem Kontrollantigen KLH eine unerwartete Reduktion von TNFα⁺-T-Zell-Frequenzen zeigt (B), konnte diese Beobachtung in der prozentualen Expression von TNFα innerhalb CD154⁺CD4⁺-T-Zellen nicht bestätigt werden (C).

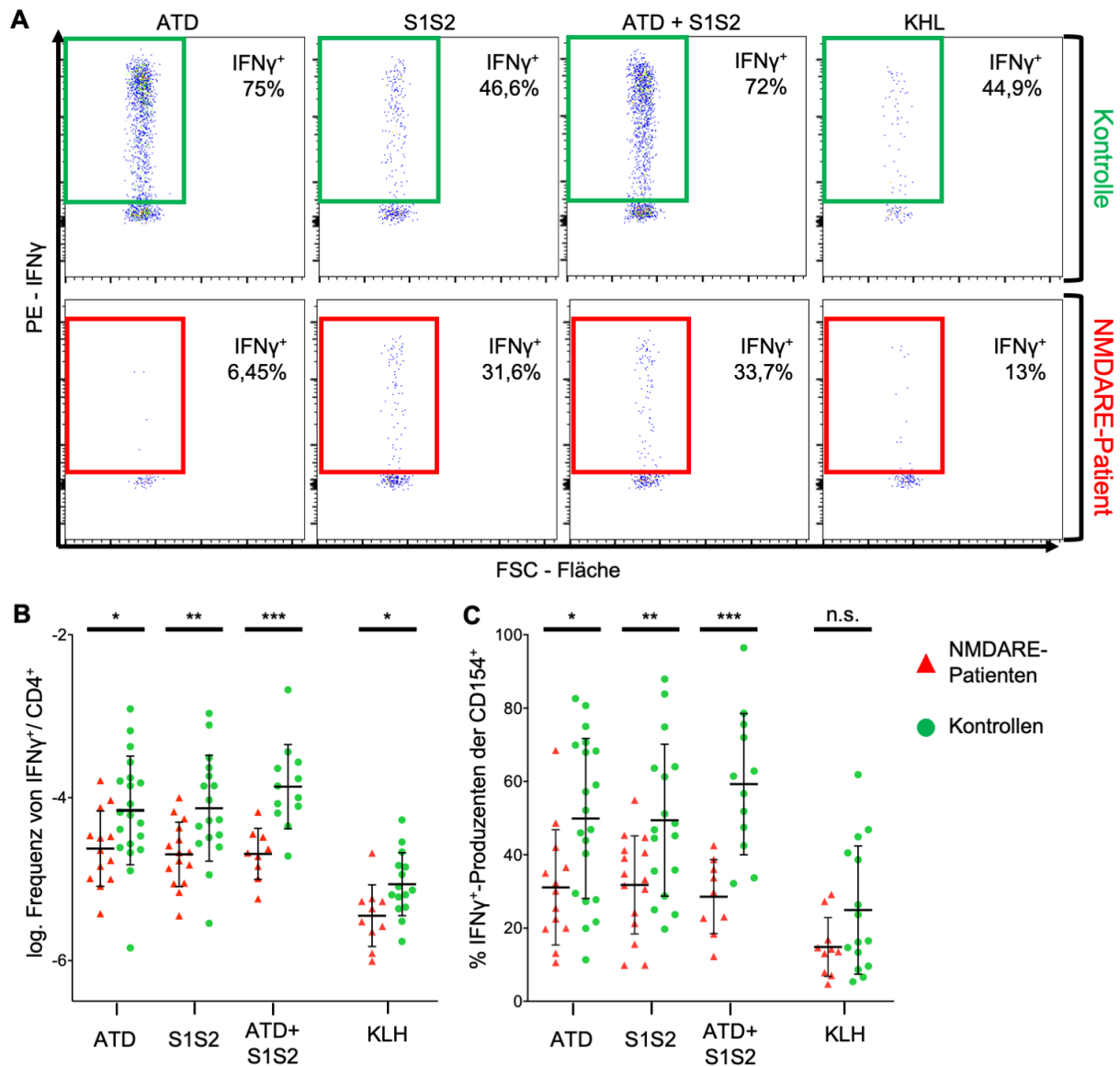


Abbildung 14: IFN γ -Expression aktivierter CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation

Exemplarische Darstellung der IFN γ -Expression innerhalb der CD154-exprimierenden CD4⁺-T-Zellen der gleichen Kontrolle (grün) bzw. desselben NMDARE-Patienten (rot) nach Stimulation mit den oberhalb angegebenen Antigenen (A). Jeder Punkt repräsentiert einen NMDARE-Patienten (rote Dreiecke) bzw. eine Kontrolle (grüner Kreis) (B-C). Die y-Achse gibt die logarithmische Frequenz der IFN γ ⁺CD154⁺-Expression innerhalb der CD4⁺-T-Zellen (B) bzw. den prozentualen Anteil an IFN γ -Produzenten innerhalb der CD154⁺CD4⁺-T-Zellen an (C). Es zeigt sich nach Stimulation mit ATD, S1S2 und ATD+S1S2 eine signifikante Reduktion von IFN γ ⁺CD154⁺CD4⁺-T-Zell-Frequenzen (B) und eine signifikant verminderte prozentuale Zytokin-Expression innerhalb aktivierter CD4⁺-T-Zellen (C). Während sich nach Stimulation mit dem Kontrollantigen KLH eine unerwartete Reduktion der IFN γ ⁺-T-Zell-Frequenzen zeigt (B), konnte diese Beobachtung in der prozentualen Expression von IFN γ innerhalb CD154⁺CD4⁺-T-Zellen nicht bestätigt werden (C).

3.3.4 Verminderte T-Zell-Antwort ist unabhängig von der Immunsuppression

Zum Ausschluss, dass die entstandenen Ergebnisse in der Auswertung von CD154⁺-, TNF α ⁺- oder IFN γ ⁺-T-Zell-Frequenzen kein Resultat vorheriger immunsuppressiver Therapie bei NMDARE-Patienten war, wurden diese Proben parallel zu den krankheitsbezogenen Antigenen mit dem Lysat des ubiquitär vorkommenden *C. albicans* stimuliert. Dieses führt in Individuen mit erfolgter Immunisierung typischerweise zu einer ausgeprägten Immunreaktion mit Aktivierung von $\sim 1/10^3$ CD4⁺-T-Zellen, einer starken TNF α -Reaktion ($\sim 70\%$ innerhalb der aktivierter Zellen) und einer IFN γ -Produktion im Bereich von 10% (145, 155). In NMDARE-Patienten und Kontrollen konnte diese Immunreaktion reproduziert werden, ohne feststellbare Unterschiede in der Frequenz von CD154⁺CD4⁺-T-Zellen oder in der prozentualen Expression von TNF α und IFN γ innerhalb der CD154⁺CD4⁺-T-Zellen [CD154CD4: NMDARE-Patienten ($M = -3.135$, $SD = 0.347$), Kontrollen ($M = -3.030$, $SD = 0.311$), $t(16) = 0.6723$, $p = .511$; TNF α : NMDARE-Patienten ($M = 0.758$, $SD = 0.111$), Kontrollen ($M = 0.780$, $SD = 0.139$), $t(16) = 0.378$, $p = .710$; IFN γ : NMDARE-Patienten ($M = 0.099$, $SD = 0.041$), Kontrollen ($M = 0.141$, $SD = 0.060$), $t(16) = 1.745$, $p = .100$] (s. Abbildung 15). Somit kann von einer unbeeinträchtigten Immunantwort in NMDARE-Patienten ausgegangen werden, welche die oben festgestellten Unterschiede bekräftigen.

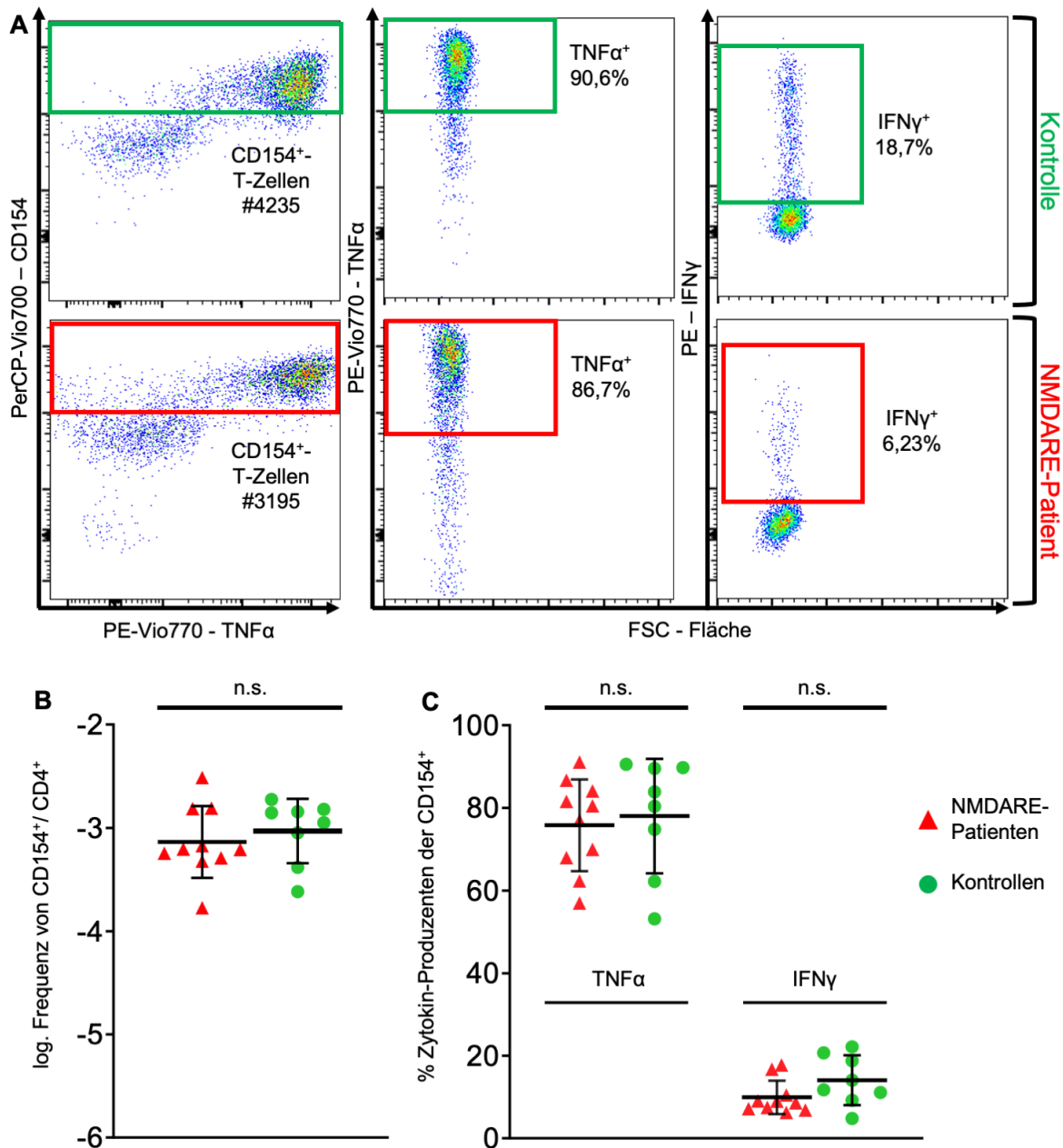


Abbildung 15: Expression von CD154, IFN γ und TNF α nach Stimulation mit *C. albicans*-Lysat

Exemplarische Darstellung der CD154-Expression und der TNF α - und IFN γ -Produktion innerhalb der CD154⁺CD4⁺-T-Zellen der gleichen Kontrolle (grün) bzw. desselben NMDARE-Patienten (rot) nach Stimulation mit dem Lysat von *C. albicans* (A). Jeder Punkt repräsentiert einen NMDARE-Patienten (rote Dreiecke) bzw. eine Kontrolle (grüner Kreis) (B-C). Nach Stimulation von PBMCs mit *C. albicans* – Lysat zeigten NMDARE-Patienten und Kontrollen wie erwartet eine Aktivierung von 1 in 10²-10³ CD4⁺-T-Zellen (y-Achse zeigt logarithmische Frequenz von CD154-Expression innerhalb der CD4⁺-T-Zellen) (B). Es zeigte sich zudem in beiden Gruppen eine ~80%-ige TNF α - und ~15% IFN γ -Produktion innerhalb aktivierter CD4⁺-T-Zellen (C). In keiner der Untersuchungen konnten Unterschiede zwischen NMDARE-Patienten und Kontrollen festgestellt werden, was auf eine ungestörte Immunreaktion hinweist (B-C).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die hier präsentierte Studie ist eine ex vivo Analyse von zirkulierenden NMDAR-autoreaktiven T-Zellen. Die gewonnenen Daten konnten entgegen der anfangs aufgestellten Hypothese keine Expansion von krankheitsspezifischen GluN1-reaktiven CD4⁺-T-Zellen in NMDARE-Patienten feststellen. Im Gegenteil, bei gleicher Verteilung von CD4⁺-T-Zellen innerhalb der PBMCs und gleichem Verhältnis von Gedächtnis- und naiven T-Zellen zwischen Patienten und Kontrollen wurde eine unerwartete, signifikante Reduktion der Frequenzen von CD154⁺CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit den extrazellulären GluN1-Domänen S1S2 und ATD + S1S2 beobachtet. Obwohl die isolierte Stimulation mit ATD in Patienten keinen signifikanten Unterschied ergab, zeigte sich auch hier eine Tendenz zur Reduktion der aktivierten T-Zellen. Die beobachteten Frequenzen von autoantigenreaktiven CD4⁺-T_H-Zellen lagen dabei im Bereich von 1 in 10⁴-10⁶ CD4⁺-T-Zellen, ähnlich wie in vorherigen Studien (145). Unterstützt werden die Befunde durch eine Subanalyse isolierter aktivierter T-Zellen, welche eine reduzierte TNFα- und IFNγ-Produktion gegen ATD, S1S2 und ATD+S1S2 ergab. Diese äußerte sich zum einen durch eine verminderte Frequenz von zytokinproduzierenden CD154⁺CD4⁺-T-Zellen als auch durch eine relative Reduktion der Zytokinexpression innerhalb aktivierter CD4⁺-T-Zellen. Ansätze mit Kontrollantigenen (KLH, *C. albicans* Lysat), die parallel zu den GluN1-Antigenen stattfanden, ergaben keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

4.2 Immunsuppression als Ursache der präsentierten Ergebnisse?

Dabei muss der ggf. vorhandene Einfluss einer immunsuppressiven Therapie beachtet werden. Nach Stimulationen mit dem KLH-Protein, einem Kontroll- und Neoantigen, wurde wie erwartet eine niedrigere Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen gegenüber Stimulationen mit Autoantigenen (145) beobachtet. Die Daten zeigten im Vergleich zwischen immunsupprimierten NMDAR-Patienten und Kontrollen keine Unterschiede in den CD154⁺CD4⁺-T-Zell-Frequenzen und auch nicht in der prozentualen TNFα- und IFNγ-Produktion. Es zeigte sich jedoch ein Unterschied in der Frequenz von Zytokin-exprimierenden KLH-reaktiven CD4⁺-T-Zellen, welche, ähnlich wie in der Stimulation mit den krankheitsassoziierten Antigenen, in NMDARE-Patienten signifikant reduziert war.

Diese Beobachtung könnte auf eine generell verminderte Immunreaktion in den NMDARE-Patienten durch ihre Therapie hindeuten. Ausgehend davon wären die beobachteten Unterschiede einer verminderten Immunantwort von NMDARE-Patienten gegen ihre krankheitsspezifischen Antigene nur allein auf die immunsuppressive Therapie zurückzuführen und kein Zeichen einer veränderten Immunantwort.

Dagegen sprechen jedoch die parallel erhobenen Daten der Stimulationen mit dem Lysat des ubiquitär vorkommenden *C. albicans*. Obwohl die meisten NMDARE-Patienten eine Erst- oder Zweitlinien-Immunsuppressionstherapie erhielten, reagierte ihr Immunsystem bezüglich der CD4⁺-T-Zell-Frequenzen und Zytokin-Produktion in der erwarteten Größenordnung gegen das *C. albicans* Lysat (148) und zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine statistischen Unterschiede. In einem fast identischen Versuchsaufbau von Kollegen unserer Arbeitsgruppe, in dem NMDARE-, LGI1-Enzephalitis (LGI1E)-Patienten und deren jeweiligen Kontrollgruppen mit dem Protein LGI1 (leucine-rich glioma inactivated 1) stimuliert wurden, konnten bei vergleichbarer Immuntherapie zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen keine Unterschiede in der CD154⁺-T-Zell-Frequenz oder in der TNF α ⁺- oder IFN γ ⁺-CD4⁺-T-Expression gezeigt werden (156). Zusammenfassend unterstützen die oben genannten Beobachtungen eine unbeeinträchtigte CD4⁺-T-Zell-Antwort in den hier getesteten NMDARE-Patienten.

4.3 Was bedeutet die verminderte Zytokinproduktion?

Entgegen der anfangs aufgestellten Hypothese einer verstärkten CD154-, IFN γ - und TNF α -Expression durch GluN1-spezifische CD4⁺-T-Zellen in NMDARE-Patienten zeigen die Ergebnisse eine Reduktion dieser pro-inflammatorischen Zytokine. CD154 ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie und ein Oberflächenmolekül, welches auf CD4⁺-T-Zellen nach Antigenkontakt exprimiert wird. Die Bindung von CD154 an CD40 auf B-Zellen induziert die B-Zell-Proliferation, Reifung, den Isotypenswitch und somatische Hypermutationen ihrer Antikörper (125, 152). Die verminderte Expression von CD154 in GluN1-spezifischen T-Zellen von NMDARE-Patienten ist hinweisend für eine Antikörpergenese, die unabhängig von der CD154-CD40-Interaktion ist (s. 4.6). TNF α ist ein genereller Aktivierungsmarker und ein Zytokin, dessen Produktion nicht auf eine T-Zell-Linie beschränkt ist (148). Ihre verminderte Produktion in aktivierten CD4⁺-T-Zellen unterstützt die Beobachtung reduzierter CD154⁺CD4⁺-T-Zell-Frequenzen. Die verminderte IFN γ -Produktion in aktivierten CD4⁺-T-Zellen ist hinweisend auf eine

Pathogenese ohne die Beteiligung von T_H1 -Zellen. $IFN\gamma$ ist eines der Leitzytokine von T_H1 -Zellen und ist vor allem für die zellvermittelte adaptive Immunantwort verantwortlich. $IFN\gamma$ verstärkt dabei die durch $CD8^+$ -T-Zellen verursachte Zytotoxizität (157). Ein Beispiel für die autoreaktive Relevanz von T_H1 -Zellen zeigt sich in ihrer Beteiligung in der Multiplen Sklerose (158). Zusammen mit der Beobachtung, dass in Hirnbiopsien und Autopsien wenig $CD8^+$ -T-Zellen und neuronaler Schaden beschrieben wurde (139, 141) unterstützt die reduzierte $IFN\gamma$ -Antwort eine T_H1 -abhängige Genese der NMDARE. Zusammen spricht die Reduktion von $CD154$, $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ generell gegen eine pro-inflammatorische Immunreaktion gegen die krankheitsspezifischen Antigene der NMDARE.

4.4 Wie verhalten sich $CD4^+$ -T-Zellen in anderen antikörpervermittelten ZNS-Erkrankungen?

Die verminderte $CD4^+$ -T-Zell-Antwort von NMDARE-Patienten gegen die extrazellulären Domänen des GluN1 sind auch insbesondere im Vergleich zu Untersuchungen von LGI1E-Patienten interessant. Die LGI1E ist neben der NMDARE eine der häufigsten antikörpervermittelten Autoimmunenzephalitiden (54, 55). Ihre Klinik ähnelt in vielerlei Hinsicht der NMDARE: Sie ist häufig mit einer limbischen Enzephalitis und Veränderungen der Kognition und des Verhaltens assoziiert. Besonders charakteristisch sind zudem generalisierte oder partielle epileptische Anfälle, die sich oft als unilateraler epileptischer Anfall der oberen Extremität und des Gesichts präsentieren (eng. faciobrachial dystonic seizure) (159). Auch in der Pathogenese finden sich Parallelen zur NMDARE. So ist die LGI1E durch Antikörper gegen das neuronale LGI1 charakterisiert, welches zusammen mit ADAM22 und ADAM23 einen transsynaptischen Proteinkomplex in exzitatorischen Synapsen bildet (160). Diese LGI1-Antikörper sind ähnlich wie NMDAR-Antikörper direkt funktional und verhindern in zellbasierten Assays die Bindung von LGI1 an ADAM22 und ADAM23, wodurch die intrinsische zelluläre Exzitabilität sowie die glutamaterge Transmission in hippocampalen CA3-Neuronen erhöht wird (161, 162). In einem parallelen Versuchsaufbau von Kollegen unserer Arbeitsgruppe wurden PBMCs von NMDARE-Patienten mit dem neuronalen Autoantigen LGI1 stimuliert. Die daraus resultierende $CD4^+$ -T-Zell-Antwort zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe, anders als bei Stimulation mit den krankheitsspezifischen Antigenen, keinen Unterschied in ihrer

Immunantwort gegen LGI1. Parallel wurde die Immunantwort von LGI1E-Patienten gegen LGI1 selbst untersucht, welches in keinem der untersuchten Parameter (CD154⁺CD4⁺-, TNF α ⁺CD154⁺CD4⁺-, IFN γ ⁺CD154⁺CD4⁺-T-Zellfrequenzen und prozentuale Expression von TNF α und IFN γ innerhalb aktivierter CD4⁺-T-Zellen) zu Unterschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (156). Das steht im starken Kontrast zu den hier präsentierten Daten einer verminderten Immunreaktion und weist auf einen krankheitsspezifischen Effekt in NMDARE-Patienten gegen ihr definierendes Antigen hin. Möglicherweise beeinflussen immunogenetische Faktoren die Immunzellfrequenzen und -verteilung. So zeigen genomweite Assoziationsstudien eine starke Korrelation der LGI1E mit dem HLA-DR7 Haplotypen (163, 164), während die NMDARE eine Assoziation mit HLA-II DRB1*16:02 aufweist (165). Dieses wurde interessanterweise schon mit anderen antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen wie Morbus Basedow (166) und Neuromyelitis optica (NMO) (167) assoziiert.

Die verminderten Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen unterscheiden sich auch zum aktuellen Stand der T-Zell-Forschung in der NMO. Die NMO ist eine autoimmune inflammatorische demyelinisierende Erkrankung des ZNS (168), welche durch Autoantikörper gegen das krankheitsspezifische Protein Aquaporin 4 (AQP4) definiert ist. In der Pathogenese unterscheiden sich die NMO und die NMDARE bezüglich des Wirkungsmechanismus der Antikörper. Während eine Bindung von GluN1-Antikörpern an den NMDAR seine Internalisierung zur Folge hat (111), löst die AQP4-Antikörperbindung am Zielprotein vor allem eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität aus (169). Ungeachtet dessen existieren auch in der NMO zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung von CD4⁺-T-Zellen an ihrer Pathogenese. Es konnte in NMO-Patienten eine generelle Erhöhung der Konzentration von CD154 (170) und im akuten Krankheitsstadium ein erhöhter prozentualer Anteil von CD154⁺CD4⁺-T-Zellen innerhalb der CD4⁺-T-Zellen nachgewiesen werden (171). Ein direkter Vergleich dieser Beobachtungen mit beschriebenen Befunden in der NMDARE ist jedoch nur teilweise möglich, da es sich hierbei um keine Analyse antigenspezifischer CD154-Expression handelt und sich dieser Unterschied nur in Patienten im akuten Krankheitsstadium zeigte. Patienten mit stabiler NMO zeigten in der gleichen Studie keine Unterschiede in der CD154-Expression verglichen mit gesunden Kontrollen (171). Daneben existieren auch Hinweise auf eine Vermehrung von AQP4-spezifischen T-Zellen. So konnten AQP4-spezifische-T_H-Zellen klonal expandiert werden, welche in NMO-Patienten eine signifikant stärkere Proliferation bei Stimulation mit AQP4 zeigten als T_H-Zellen von

gesunden Kontrollen (172). Anders als hier wurden diese Daten jedoch aus einer langfristigen in vitro-Kultur generiert, welche möglicherweise individuelle T-Zell-Klone selektierte und somit die phänotypischen und funktionellen Charakteristika verändert haben könnten. Eine 2016 veröffentlichte Studie bestärkt dennoch die Relevanz von T-Zellen. Peptidfragmente des AQP4-Proteins induzierte in AQP4 Knockout-Mäusen eine deutliche T-Zell-Antwort, die nach Übertragung in das ZNS von Wildtyp-Mäusen eine Autoimmunität auslöste. Interessanterweise erzeugten AQP4-Fragmente keine T-Zell-Antwort in Wildtyp-Mäusen (173). Die Daten suggerieren strenge Mechanismen zentraler Toleranz in gesunden Individuen, die die Aktivierung solcher autoreaktiven T-Zellen normalerweise inhibiert. Der Reifungsprozess unreifer T-Zellen führt durch Präsentation von körpereigenen Epitopen im Thymus i.d.R. zur Entwicklung von T-Zellen, die „nur“ eine mittlere Affinität für Autoantigene vorweisen. Für das Überleben benötigen TCRs reifer T-Zellen eine minimale Affinität gegenüber MHC-Molekülen (positive Selektion) und gleichzeitig dürfen sie keine zu hohe Affinität aufweisen (negative Selektion). So weist die fehlende Proliferation von AQP4-spezifischen T-Zellen in Wildtyp-Mäusen, anders als in AQP4-Knockout-Mäusen, auf eine mögliche dysfunktionale thymische Selektion hin (173). Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich mit den hier präsentierten Daten nicht auf die Pathogenese der NMDARE übertragen. Ausgehend von einer ausbleibenden zentralen Toleranzentwicklung bei NMDARE-Patienten gegenüber der GluN1-Untereinheit müsste die T-Zell-Antwort nach Stimulation mit krankheitsspezifischen Antigenen verstärkt ausfallen. Bei fehlendem Grenzwert einer „starken Immunreaktion“ gegen neuronale Autoantigene würde sich im Vergleich zwischen den NMDARE-Patienten zumindest eine abgeschwächte CD4⁺-T-Zell-Antwort in der Kontrollgruppe beobachten lassen.

Ein Vergleich mit der Myasthenia gravis (MG) unterstreicht erneut die überraschenden Befunde einer verminderten T-Zell-Antwort in NMDARE-Patienten. Die MG ist wie die NMDARE oder NMO eine durch Antikörper vermittelte Erkrankung, welche durch Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor (AChR) ausgelöst wird (174). Diese Autoantikörper führen über mehrere Mechanismen (z.B. beschleunigte Endozytose von AChR oder funktionelle Blockade des Rezeptors) zu einer Reduktion verfügbarer AChR, wodurch es zu einer Störung der neuromuskulären Endplatte mit einer pathologisch gesteigerten Ermüdbarkeit der Muskulatur kommt (175). Zahlreiche Studien weisen dabei auf eine T-Zell-abhängige antikörpervermittelte Pathogenese der MG hin. Dafür sprechen beispielweise der Nachweis von AChR-spezifischen CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut

und Thymus von MG-Patienten (176, 177) und die Synthese von AChR-Autoantikörpern in Mäusen, für die der adoptive Transfer von AChR-spezifischen CD4⁺-T-Zellen ausreichend war (178). Auch waren CD4-defiziente Mäuse nicht in der Lage, die experimentelle Autoimmun-Myasthenia gravis (EAMG), ein Tiermodell der MG, zu entwickeln (179). Anders als bei den hier präsentierten Ergebnissen mit einer Reduktion der GluN1-spezifischen IFN γ -Produktion in NMDARE-Patienten zeigten MG-Patienten in mehreren Studien jedoch erhöhte Frequenzen von IFN γ -exprimierenden AChR-autoreaktive T-Zellen (180-183). Ein Vergleich mit den verminderten GluN1-spezifischen CD154⁺-T-Zell-Frequenzen ist nach eigener Recherche leider nicht möglich, da bisher keine Studien über die Frequenz von AChR-spezifischen CD154⁺CD4⁺-T-Zellen in Patienten veröffentlicht wurden. Hinweise für eine pathophysiologische Beteiligung von CD154 wurden jedoch beschrieben. So sind beispielsweise CD154-Knockout Mäuse resistent gegenüber der Induktion der EAMG (184) und eine Blockade von CD154 in chronischer EAMG führten zu einer verminderten Krankheitsaktivität in erkrankten Mäusen (185). Diese Daten weisen auf eine notwendige CD154-Expression in CD4⁺-T-Zellen hin und suggerieren eine klonale Expansion von AChR-spezifischen CD154⁺-T-Zellen in der MG, was für eine erhöhte Frequenz von AChR-spezifischen CD154⁺-T-Zellen sprechen könnte. Existierende Unterschiede in der IFN γ -Produktion und potentiell bestehende Unterschiede in der antigenspezifischen CD154-Expression könnten dabei durch eine unterschiedliche Verteilung von T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen bedingt sein. Eine Rolle könnte so den IL17 produzierenden T_H17-Zellen zukommen. So konnte gezeigt werden, dass IL-17-Knockout-Mäuse nach aktiver Immunisierung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen weniger oder keine EAMG-Symptome entwickelten (186). Interessanterweise konnte auch in klonal expandierten AQP4-spezifischen T-Zellen von NMO-Patienten eine vermehrte Expression von IL-17 gezeigt werden (172). Aktuelle Studien beschreiben zudem dysfunktionale Treg-Populationen als mögliche Ursache der MG-Pathogenese. MG-Patienten zeigten im Vergleich zu Kontrollen erhöhte Frequenzen von AChR-spezifischen CCR6⁺ Gedächtnis-T-Zellen, einem Marker für eine Untergruppe von regulatorische T-Zellen (187), mit vermehrter Produktion von IFN γ und IL17 (183). Zukünftige Forschung über das T-Zell-Repertoire von NMDARE-Patienten, insbesondere hinsichtlich der Rolle von T_H17- und regulatorischen T-Zellen, sind notwendig, um bestehende Unterschiede im Vergleich zur MG oder zur NMO besser einordnen zu können und ein besseres Verständnis über die Pathogenese der NMDARE zu gewinnen.

4.5 Befinden sich GluN1-reaktive T-Zellen nicht im Blut?

Ein Erklärungsansatz für die erniedrigten Frequenzen von GluN1-spezifischen T_H-Zellen könnte die Migration der Zellen in Keimzentren des lymphatischen Systems (z.B. Lymphknoten), in Keimzentren-ähnlichen Strukturen in Tumoren (89) und Gehirn/Gehirnparenchym sein, wodurch sie durch sie im peripheren Blut nicht detektierbar wären. In der Tat konnten bereits GluN1-Antikörperproduzierende B-Zellen in lymphozytenreichen Strukturen innerhalb von Teratomen von NMDARE-Patienten nachgewiesen werden (188), die eventuell von T-Zellen umgeben werden. Auch in Patienten mit AChR-Antikörper-positiver MG sind ektope Keimzentren im Thymus schon länger bekannt (189). Dagegen spricht jedoch, dass in der Immunantwort gegen fremde Epitope antigenspezifische T-Zellen während und nach der Erkrankung im peripheren Blut nachweisbar sind (155). Die hier präsentierten Daten zeigen trotz nicht bestehender *C. albicans*-Infektion konsistent hohe *C. albicans*-spezifisch CD4⁺-T-Zell-Frequenzen mit starker TNF α -Sekretion. Zudem zeigen die Untersuchungen Kollegen nach Stimulation mit LGI1 keine reduzierte Anzahl an peripher autoreaktiven CD4⁺-T-Zellen, weder in NMDARE- noch LGI1E-Patienten (156). Zusammengenommen widersprechen diese Befunde eine T-Zell-Verschiebung ins Gewebe. Eine Untersuchung zur Bestätigung dieser Hypothese am Menschen wäre durch die limitierte Anzahl an Biopsie- und Autopsieproben zudem sehr schwer.

4.6 Ist eine CD4⁺-T-Zell-Beteiligung in der Pathogenese der NMDARE nicht notwendig?

Die präsentierten Daten sind unerwartet, weil in der klonalen Selektionstheorie (190) die CD4⁺-T-Zell-Hilfe für die Selektion und Produktion von hochspezifischen und hochaffinen Antikörper essentiell sind. Im Rahmen der humoralen adaptiven Immunantwort benötigen B-Zellen typischerweise die Hilfe von aktivierten antigenspezifischen CD4⁺-T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung. T_{H2}-Zell-abhängig kommt es in antigenspezifischen B-Zellen zu einem Klassenswitch zu IgG und somatischen Hypermutationen, die schlussendlich B-Zellen mit hochaffinen Antikörpern hervorbringen.

Angesichts des bisherigen Forschungsstandes einer Antikörper-vermittelten Ätiologie mit hochaffinen IgG-Antikörpern, Liquorbefunden mit Pleozytose und erhöhten Zytokinen sowie post mortem Untersuchungen mit CD4⁺-T-Zell-Infiltraten im Gehirn deuten die

Befunde auf eine verstärkte Immunantwort mit starker CD4⁺-T-Zell-Beteiligung hin. Insbesondere ein 2019 entwickeltes Tiermodell von NMDARE von Mäusen betonte die pathophysiologische Relevanz von CD4⁺-T-Zellen. Drei Wochen nach aktiver Immunisierung waren CD4⁺-T-Zellen die prädominante Klasse von Immunzellen im Hippocampus von symptomatischen Tieren. Darüber hinaus entwickelten Mäuse mit CD4- und CD8-Knockout verglichen mit Wildtyp-Tieren keine Enzephalitis, zeigten histopathologisch keine Inflammation und bildeten keine NMDAR-Antikörper (142).

Dennoch, gegensätzlich zur anfänglichen Hypothese, zeigen die Daten eine Reduktion von GluN1-reaktiven T_H-Zellen und eine signifikante Reduktion von inflammatorischen Zytokinen in den Zellen von NMDARE-Patienten. Es stellt sich die Frage, ob in dieser spezifischen Erkrankung CD154-exprimierenden CD4⁺-T_H-Zellen in der Bildung von GluN1-Antikörpern möglicherweise nicht beteiligt sind. Vorstellbar wäre eine T_H-Zell-unabhängige extrafollikuläre Aktivierung von bereits GluN1-reaktiven B-Zellen in NMDARE-Patienten direkt im Gehirn nach einer Virusenzephalitis (91) oder in assoziierten NMDAR-exprimierenden Tumor-Zellen in Teratomen (89). Für diese Hypothese müssten zwei Voraussetzungen erfüllt sein: das Vorhandensein von autoreaktiven B-Zellen und eine T_H-Zell-unabhängige B-Zell-Aktivierung.

Die B-Zell-Reifung und Toleranzentwicklung finden im Knochenmark statt. Die riesige Vielfalt an variablen B-Zell-Rezeptoren (BCR) entsteht durch die zufällige Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente (somatische Rekombination), bei der es unausweichlich auch zur Entstehung von autoreaktiven B-Zellen kommt. Typischerweise durchlaufen B-Zellen während ihrer Reifung eine Toleranzentwicklung mit negativer Selektion von hochaffinen BCR gegen Autoepitope. GluN1-reaktive B-Zellen könnten jedoch aufgrund einer ausbleibenden GluN1-Präsentation oder wegen einer genügend niedrigen Affinität ihrer BCR als Teil des naiven B-Zell-Repertoires bestehen bleiben. Solch ein Mechanismus würde die pathogene Wirkung der bereits entdeckten Keimbahn-GluN1-Antikörper in NMDARE-Patienten erklären (112). Daneben wurden auch bei NMO-Patienten bereits naive AQP4-spezifische B-Zellen entdeckt (191).

Die Aktivierung von diesen naiven B-Zellen erfolgt in der Regel T_H-Zell-abhängig. Antigen-spezifische CD4⁺-T-Zellen binden über ihren T-Zell-Rezeptor den MHC-II/Peptid-Komplex der präsentierenden B-Zelle, wonach sie die B-Zelle über Zellkontakte und Zytokine aktivieren. Dieser Prozess induziert in naiven B-Zellen, die fast ausschließlich IgM-Antikörper exprimieren, einen Klassenswitch zu IgG und somatische Hypermutationen ihrer Antikörper, die die Affinität gegen das Epitop steigern.

Autoantikörper aus LGI1E- und MG-Patienten zeigten einen Wechsel ihrer Immunglobulinklasse und wiesen zahlreiche somatische Mutationen in den hypervariablen V-Regionen auf (162, 192).

Die hier präsentierten Daten einer Reduktion von GluN1-spezifischen CD4⁺-T-Zellen suggerieren jedoch eine T_H-Zell-unabhängige humorale Immunantwort. Solch ein Mechanismus ist zwar schon länger bekannt, er unterscheidet sich jedoch von der T_H-Zell-abhängigen B-Zell-Antwort. Naive B-Zellen können durch repetitive Nicht-Protein-Epitope wie z.B. Kohlenhydratstrukturen auf Bakterienoberflächen direkt aktiviert werden. Es kommt jedoch typischerweise durch die fehlende T-Zell-Hilfe zu keinem Klassenwechsel der Immunglobuline und auch zu keinen somatischen Hypermutationen, sodass diese, ähnlich wie naive B-Zellen, nur weniger affine IgM produzieren können (193). Dazu passen die Befunde von GluN1-spezifischen IgM-Antikörpern in Patienten, welche noch Monate nach Ausbruch der Erkrankung nachweisbar waren (188). Zudem zeigten sich nur wenige bzw. keine somatischen Hypermutationen in Antikörpern aus NMDAR-Patienten (112). Pathogene unmutierte GluN1-Antikörper stehen auch im deutlichen Kontrast zur NMO, wo AQP4-Antikörper nach Umkehrung der somatischen Hypermutationen jegliche Bindung zu ihrem Epitop verloren (194). Im Verlauf der Erkrankung könnten die hochaffinen pathogenen NMDAR-IgGs dabei im Rahmen eines CD4⁺-T-Zell-unabhängigen Isotypenswitches entstehen. In T-Zell-defizienten Mäusen konnte solch eine Umstellung der IgM- zur IgG-Produktion nach Virusinfektion bereits nachgewiesen werden (195).

Die verminderte T-Zell-Antwort, wie sie hier gegen GluN1-Epitope beschrieben wurde, könnte sich mit dieser Hypothese decken. Bereits auto-reaktive naive B-Zellen könnten nach erneutem Antigenkontakt eine T_H-Zell-unabhängige Aktivierung mit Synthese von hochaffinen IgG-Antikörpern unterlaufen. Die Befunde deuten auf eine notwendige T-Zell-Beteiligung in der Pathogenese der LGI1E und NMO hin, während die keimbahnkonfigurierten GluN1-Antikörper und eine reduzierte CD4⁺-T-Zell-Antwort konsistent mit einer CD4⁺-T_H-Zell-unabhängigen Genese sind.

4.7 Sind NMDA-Antikörper natürlich vorkommende Autoantikörper?

Ungeklärt bleibt jedoch die hohe Seroprävalenz von IgA, IgM und IgG GluN1-Antikörpern in der allgemeinen Bevölkerung (117). NMDA-Antikörper könnten Teil einer bestimmten Gruppe von „natürlich“ vorkommenden Autoantikörpern sein, deren Existenz ist seit über

40 Jahren bekannt ist (196, 197). Natürliche Autoantikörper der Klassen IgM, IgA und IgG werden schon vor der Geburt von B1-Zellen und B-Zellen in der Marginalzone der Milz produziert, unabhängig von Antigenkontakten und CD4-T-Zell-Hilfe (198, 199). Sie sind womöglich vor allem in der frühen Entwicklung des Immunsystems von Bedeutung und sind an der Bekämpfung von Krankheitserregern wie Staphylococcus aureus beteiligt (200) bevor es zur Bildung von Antikörper der adaptiven Immunantwort kommen kann (201, 202). Natürlich GluN1-Antikörper decken sich mit der Entdeckung von GluN1-Antikörpern auf Keimbahnebene (112), deren Auftreten im Individuum möglicherweise allein von der statistischen Wahrscheinlichkeit der VDJ-Rekombination abhängig ist. Es lassen sich zahlreiche Autoantikörper in sowohl gesunden als auch kranken Individuen und in anderen Säugetieren finden (203), auch gegen Proteine aus dem ZNS (120). Während es jedoch typischerweise zu einer Abnahme der natürlichen IgM- (198) und Zunahme der natürlichen IgG-Antikörper im Alter kommt (203), zeigten Untersuchungen der GluN1-spezifischen Antikörper eine altersabhängige Zunahme aller Immunglobulinklassen in kranken und gesunden Individuen (118). Die Gründe für diesen Widerspruch sind bisher noch unklar. Unterstützend für die Theorie natürlicher GluN1-Antikörper ist das Vorkommen von NMDAR-Antikörper der Immunglobulinklassen IgA, IgM und IgG in anderen Säugetieren wie Hunden und Rhesus Makaken, wo sie zum natürlichen Autoimmunantikörperrepertoire gehören (204). In allen getesteten Säugetieren zeigt GluN1 eine Sequenzhomologie von mehr als 99%. Parallel zu den Untersuchungen in Menschen waren alle aus Säugetieren gewonnenen GluN1-Antikörper in Experimenten funktional und damit potentiell pathogen. Dass NMDAR-Antikörper auch in Tieren pathogen sein können, wurde bereits 2015 nachgewiesen. Knut, ein Eisbär aus dem Berliner Zoo, ertrank in Folge eines epileptischen Anfalls ausgelöst durch NMDAR-Antikörper (205). Auch Hunde scheinen aufgrund von GluN1-Antikörper Enzephalitiden entwickeln zu können (206). Ob und welche Rolle natürlich vorkommende GluN1-Antikörper haben, kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Es existieren jedoch Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung. Bereits vorhandene NMDAR-Autoantikörper in Individuen sind mit einer kleineren Läsionsgröße nach Schlaganfällen assoziiert (118), möglicherweise durch eine von ihnen bewirkte Reduktion der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität. Ihre Autoreaktivität in Trägern ist möglicherweise nur ein ungünstiges Nebenprodukt. Der spezifische Keimbahnantikörper mit der variablen schweren Kette 4-34 zeigte eine nachgewiesene Reaktivität gegen

kommensale Bakterien, weist jedoch gleichzeitig eine autoreaktive Komponente auf (207).

Es stellt sich die Frage, wie diese seit der Geburt vorhandenen Antikörper, im späteren Verlauf in bestimmten Individuen zu einer Neuroinflammation führen. Alle untersuchten GluN1-Antikörper (IgG-GluN1-Antikörper auf Keimbahnebene aus NMDAR-Patienten (112), Immunglobuline (IgA, IgM und IgG) aus gesunden Individuen (117) und aus Säugetieren (204)) waren in zellbasierten Assays direkt funktional und damit potentiell pathologisch, lösten jedoch im Großteil ihrer Träger keine Symptomatik aus. Ein Erklärungsansatz findet sich in der Rolle der Blut-Hirn-Schranke. Mäuse mit Apolipoprotein (ApoE)-Knockout, welche eine dysfunktionale Blut-Hirn-Schranke aufweisen (208, 209), zeigten nach Injektion von Antikörpern aus NMDAR-Antikörper-positiven Individuen psychotische Verhaltensstörungen (121). Zudem wiesen seropositive schizophrene Patienten mit Geburtskomplikationen oder bekanntem Neurotrauma in der Vorgeschichte, beides Hinweise für eine zumindest vorübergehende Einschränkung der Blut-Hirn-Schranke, signifikant mehr neurologische Defizite aus als vergleichbare seronegative Patienten (121). Auch die kleinere Läsionsgröße nach Schlaganfällen war nur mit dem negativem ApoE4-Trägerstatus assoziiert, ApoE4-Träger zeigten dagegen eine gegenteilige Vergrößerung des Läsionsareals (118). Eine dysfunktionale Blut-Hirn-Schranke scheint auch in der NMO eine relevante pathophysiologische Rolle zu spielen. Der alleinige Transfer von Immunglobulinen aus AQP4-Antikörper-positiven NMO Patienten führte zu keinen pathologischen Veränderungen im ZNS (210). Erst die Gabe von AQP4-Antikörpern und Komplementfaktoren und die gleichzeitige Umgehung der Blut-Hirn-Schranke führte zu NMO-typischen demyelinisierenden Veränderungen in Mäusen (211).

Die Ergebnisse vieler Studien weisen auf NMDAR-Antikörper als Teil dieses natürlichen vorkommenden Antikörperrepertoires hin. Die in dieser Arbeit beschriebene fehlende CD4⁺-T-Zell-Antwort würde sich mit dieser Theorie einer natürlichen GluN1-Antikörperproduktion durch B1-Zellen decken. Für die Produktion solcher natürlich vorkommenden Antikörper benötigen diese B-Zellen keinen Antigenkontakt und, viel wichtiger, wäre die Produktion vollkommen T_H-Zell-unabhängig. Der genaue Mechanismus, wie diese natürlichen GluN1-Antikörper im Verlauf pathogen werden, ist jedoch auch mit diesem Erklärungsansatz nicht vollumfänglich geklärt. Das Auftreten von der NMDARE nach Viruszephalitiden (91) oder während NMDAR-Expression in Teratomen (89) implizieren eine Assoziation mit (erneuter) Präsentation von NMDA-

Rezeptoren. Es ist unklar, welche Faktoren zu einer Expansion oder Zunahme der GluN1-Antikörperproduktion von bereits existierenden B-Zellen beitragen würden. Möglicherweise erfolgt die Aktivierung dabei durch abnorme Neurone in Teratomen (89, 212), Antikörper-Komplex-Bildung mit bisher unbekanntem Substanzen (213) oder Antikörperkontakt mit frei löslichem NMDAR nach neuronalem Schaden (214, 215).

4.8 Limitationen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist Limitationen seitens der Methodik und des Studiendesigns auf, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

T-Zell-Stimulation: Die zur Stimulation genutzten Antigene waren aus *E. coli* gewonnen GST-Fusionsproteine. Die Stimulation von allen Probanden fand daher auch mit dem an dem Fusionsprotein befindlichen GST-Tag statt. Auch zum Zeitpunkt der Stimulation war der GST-Tag Teil dieses Proteins. Mögliche Unterschiede in der CD154⁺CD4⁺-T-Zellfrequenz oder in der Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen können jedoch relativiert werden. Die Stimulation von beiden Kohorten erfolgte mit den gleichen Proteinen, sodass ein Unterschied bei unbeeinträchtiger Immunantwort nur auf die GluN1-Domänen zurückgeführt werden kann.

Analyse von seltenen antigenspezifischen T-Zellen: Die Analyse von autoreaktiven T-Zellen stellt aufgrund ihrer niedrigen Frequenz ($1/10^4$ - 10^7 autoreaktiven T-Zellen (145)) ein methodisches Problem dar. Das ARTE-Protokoll ist dabei eine etablierte Methode um antigenspezifischen CD4⁺-T-Zellen anzureichern (148, 155, 216) und sie der späteren Messung z.B. in der Durchflusszytometrie zugänglich zu machen. Die hier präsentierten Kontroll-Stimulationen mit KLH und *C. albicans*-Lysat waren in der Lage frühere Ergebnisse zu reproduzieren (148), was für eine hohe Inter-Assay-Präzision spricht. Dennoch wäre es interessant, T-Zell-Frequenzen mithilfe von löslichem Peptid/MHC-II-Tetrameren zu analysieren, da diese auch nicht aktivierte antigenspezifische T-Zellen mit einbeziehen kann. Alternativen zur Analyse von seltenen antigenspezifischen T-Zellen ist z.B. die in-vitro Expansion über Wochen mit kontinuierlicher Stimulation mit einem Antigen. Diese Methode wird jedoch von vielen schwer vorhersehbaren Parametern beeinflusst wie z.B. ihrem T-Zell-Status (z.B. naive vs. Gedächtnis-T-Zellen) oder einer antigenunspezifischen Aktivierung (Bystander-Aktivierung). Zudem ist eine Errechnung der antigenspezifischen T-Zell-Frequenz mit dieser Methode nicht möglich.

Studiendesign: Es handelt sich hierbei um eine Momentaufnahme von GluN1-spezifischen T-Zellen, weshalb ihre Aussagekraft bezüglich der T-Zell-Entwicklung während der Erkrankung eingeschränkt ist. Die T-Zellen der meisten Patienten wurden erst Monate bis Jahre nach Erkrankungsbeginn untersucht. Hier wäre eine langzeitliche Begleitung von mehreren Patienten mit mehreren Untersuchungszeitpunkten interessant. Diese könnten die Entwicklung der CD4⁺-T-Zell-Antwort vor allem zu Beginn der Erkrankung charakterisieren und möglicherweise eine Normalisierung der T-Zellen über einen längeren Zeitraum feststellen. Interessant wäre auch die Testung von gesunden Individuen mit NMDAR-Antikörper-Träger-Status, um deren CD4⁺-T-Zell-Antwort zu Vergleichen. Die Patientenakquise stellt hierbei aufgrund der relativ niedrigen Inzidenz der NMDARE ein generelles Problem dar.

T-Zell-Analyse: Die generierten Daten ermöglichten eine Analyse der CD4-, CD45RA-, CD45RO-, TNF α -, IFN γ - und CD154-Expression in antigenspezifischen T-Zellen. Die Hürden für die ausführlichere Charakterisierung der T-Zellen sind zum einen das limitierte Patientenmaterial sowie die begrenzte Anzahl an Detektoren und verfügbaren Fluorochromen in der Durchflusszytometrie (217). Mehrere Stimulationsansätze mit dem gleichen Antigen zur genaueren Differenzierung der T-Zell-Antwort wären dafür in der Zukunft notwendig. Oberflächenmarker und Zytokinprofile könnten Aussagen über die Beteiligung bestimmter CD4⁺-T-Zellreihen geben, wie z.B. IFN γ und IL-2 für T_H1-, IL-4, IL-5, etc. für T_H2-, IL-17 für T_H17-T-Zellen oder FOXP3 für regulatorische T-Zellen. Regulatorische T_H-Zellen wären besonders interessant, da sie möglicherweise zu einer verminderten GluN1-spezifischen T_H-Zellfrequenz führen. Es ist jedoch schwer zu prognostizieren, wie Treg-Zellen an der Pathogenese der NMDARE beteiligt sind, da es bisher meines Wissens nach noch nicht möglich ist, autoantigenspezifische Treg-Zellen in Menschen zu isolieren oder funktionell zu charakterisieren.

4.9 Fazit

Die hier präsentierten Daten zeigen eine unerwartete Reduktion von CD154⁺CD4⁺-T_H-Zellen und eine signifikant verminderte Produktion von inflammatorischen Zytokinen (IFN γ und TNF α) in Patienten mit NMDARE. Dagegen konnten Stimulationen mit dem *C. albicans*-Lysat keinen Unterschied zur Kontrollgruppe erzeugen, was auf eine intakte Immunantwort hinweist. Die verminderte Immunantwort deutet auf eine NMDARE-Pathogenese ohne Beteiligung von proinflammatorischen GluN1-spezifischen T_H-Zellen

hin. Die GluN1-reaktiven Antikörper könnten als natürliche vorkommende Antikörper seit der Geburt existieren oder im Rahmen einer T_H-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Zellen mit fehlerhafter Toleranzentwicklung gebildet werden, welche erst durch eine dysfunktionale Blut-Hirnschranke pathogen werden. Betrachtet man dazu die Daten der Stimulation von NMDARE- und LGI1E-Patienten mit LGI1-Protein, welche keine Unterschiede zu den Kontrollgruppen zeigten, weisen die verminderten CD4⁺-T-Zellen auf eine krankheitsspezifische Erscheinung. Zukünftige Studien können die fehlerhafte T-Zell-Antwort gegen GluN1 in Patienten ausführlicher charakterisieren. So könnten parallel zum Krankheitsverlauf wiederholte T-Zell-Analysen des gleichen NMDARE-Patienten Einblicke in die T-Zell-Entwicklung geben und die klonale Expansion GluN1-reaktiver T-Zellen in Kultur die Analyse von T-Zell-Subpopulationen ermöglichen.

5 Literaturverzeichnis

1. Dzamba D, Honsa P, Anderova M. NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(3):250-62.
2. Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, Mobius W, Goetze B, Jahn HM, Huang W, Steffens H, Schomburg ED, Perez-Samartin A, Perez-Cerda F, Bakhtiari D, Matute C, Lowel S, Griesinger C, Hirrlinger J, Kirchhoff F, Nave KA. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. *Neuron*. 2016;91(1):119-32.
3. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, Vivien D, de Vries HE. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. *J Neurochem*. 2010;113(2):447-53.
4. Benveniste M, Mayer ML. Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. *Biophys J*. 1991;59(3):560-73.
5. Clements JD, Westbrook GL. Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron*. 1991;7(4):605-13.
6. Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*. 2002;415(6873):793-8.
7. Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*. 2004;2004(255):re16.
8. Paoletti P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci*. 2011;33(8):1351-65.
9. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010;62(3):405-96.
10. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*. 1992;256(5060):1217-21.
11. Rauner C, Kohr G. Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses. *J Biol Chem*. 2011;286(9):7558-66.
12. Hatton CJ, Paoletti P. Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron*. 2005;46(2):261-74.
13. Tovar KR, McGinley MJ, Westbrook GL. Triheteromeric NMDA receptors at hippocampal synapses. *J Neurosci*. 2013;33(21):9150-60.
14. Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*. 1994;368(6467):144-7.
15. Laurie DJ, Putzke J, Zieglgänsberger W, Seeburg PH, Toïlle TR. The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Molecular Brain Research*. 1995;32(1):94-108.
16. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*. 1994;12(3):529-40.

17. Hardingham GE, Bading H. Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(10):682-96.
18. Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*. 1987;325(6104):529-31.
19. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*. 1988;241(4867):835-7.
20. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*. 1984;309(5965):261-3.
21. Derkach V, Barria A, Soderling TR. Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(6):3269-74.
22. Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol*. 1994;347(1):150-60.
23. Xu X, Russell T, Bazner J, Hamilton J. NMDA receptor antagonist AP5 and nitric oxide synthase inhibitor 7-NI affect different phases of learning and memory in goldfish. *Brain Res*. 2001;889(1-2):274-7.
24. Brenneman DE, Forsythe ID, Nicol T, Nelson PG. N-methyl-D-aspartate receptors influence neuronal survival in developing spinal cord cultures. *Brain Res Dev Brain Res*. 1990;51(1):63-8.
25. Levin ED, Bettegowda C, Weaver T, Christopher NC. Nicotine-dizocilpine interactions and working and reference memory performance of rats in the radial-arm maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998;61(3):335-40.
26. Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*. 1998;393(6683):377-81.
27. Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol*. 2002;87(4):2052-63.
28. Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;100(1-2):43-52.
29. Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*. 1984;226(4676):850-2.
30. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*. 1999;399(6738 Suppl):A7-14.
31. Ronicke R, Mikhaylova M, Ronicke S, Meinhardt J, Schroder UH, Fandrich M, Reiser G, Kreutz MR, Reymann KG. Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors. *Neurobiol Aging*. 2011;32(12):2219-28.
32. Aarsland D, Ballard C, Walker Z, Bostrom F, Alves G, Kossakowski K, Leroi I, Pozo-Rodriguez F, Minthon L, Londos E. Memantine in patients with Parkinson's disease dementia or dementia with Lewy bodies: a double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Neurol*. 2009;8(7):613-8.
33. Hallett PJ, Dunah AW, Ravenscroft P, Zhou S, Bezard E, Crossman AR, Brotchie JM, Standaert DG. Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the

- development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 2005;48(4):503-16.
34. Moghaddam B, Javitt D. From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(1):4-15.
 35. Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*. 1999;98(4):427-36.
 36. Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, Quinlan EM, Nakazawa K. Postnatal NMDA receptor ablation in cortic limbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci*. 2010;13(1):76-83.
 37. Dalmau J, Tuzun 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*. 2007;61(1):25-36.
 38. Granerod J, Ambrose HE, Davies NWS, Clewley JP, Walsh AL, Morgan D, Cunningham R, Zuckerman M, Mutton KJ, Solomon T, Ward KN, Lunn MPT, Irani SR, Vincent A, Brown DWG, Crowcroft NS, HPA UHPA. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infectious Diseases*. 2010;10(12):835-44.
 39. Pruss H, Dalmau J, Harms L, Holtje M, Ahnert-Hilger G, Borowski K, Stoecker W, Wandinger KP. Retrospective analysis of NMDA receptor antibodies in encephalitis of unknown origin. *Neurology*. 2010;75(19):1735-9.
 40. Gable MS, Sheriff H, Dalmau J, Tilley DH, Glaser CA. The frequency of autoimmune N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis surpasses that of individual viral etiologies in young individuals enrolled in the California Encephalitis Project. *Clin Infect Dis*. 2012;54(7):899-904.
 41. Henson RA, Hoffman HL, Urich H. Encephalomyelitis with carcinoma. *Brain*. 1965;88(3):449-64.
 42. Corsellis JA, Goldberg GJ, Norton AR. "Limbic encephalitis" and its association with carcinoma. *Brain*. 1968;91(3):481-96.
 43. Russel DS. Encephalomyelitis and carcinomatous neuropathy. In: Van Bogaert L, editor. *Encephalitides: Proceedings of a Symposium on the Neuropathology, Electroencephalography and Biochemistry of Encephalitides*. Amsterdam: Elsevier; 1961. p. 131-5.
 44. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology*. 1985;35(4):538-43.
 45. Greenlee JE, Brashear HR. Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann Neurol*. 1983;14(6):609-13.
 46. Voltz R, Dalmau J, Posner JB, Rosenfeld MR. T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology*. 1998;51(4):1146-50.
 47. Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med*. 1998;4(11):1321-4.
 48. Lindstrom JM, Engel AG, Seybold ME, Lennon VA, Lambert EH. Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis. II. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats with anti-acetylcholine receptor antibodies. *J Exp Med*. 1976;144(3):739-53.

49. Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, Mata S, Kremens D, Vitaliani R, Geschwind MD, Bataller L, Kalb RG, Davis R, Graus F, Lynch DR, Balice-Gordon R, Dalmau J. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol*. 2009;65(4):424-34.
50. Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to the GABAB receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *The Lancet Neurology*. 2010;9(1):67-76.
51. Petit-Pedrol M, Armangue T, Peng X, Bataller L, Cellucci T, Davis R, McCracken L, Martinez-Hernandez E, Mason WP, Kruer MC, Ritacco DG, Grisold W, Meaney BF, Alcalá C, Silveira-Smitt P, Titulaer MJ, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABA_A receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*. 2014;13(3):276-86.
52. Dale RC, Merheb V, Pillai S, Wang D, Cantrill L, Murphy TK, Ben-Pazi H, Varadkar S, Aumann TD, Horne MK, Church AJ, Fath T, Brilot F. Antibodies to surface dopamine-2 receptor in autoimmune movement and psychiatric disorders. *Brain*. 2012;135(Pt 11):3453-68.
53. Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Titulaer MJ, Boulos M, Weaver S, Antoine JC, Liebers E, Kornblum C, Bien CG, Honnorat J, Wong S, Xu J, Contractor A, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to metabotropic glutamate receptor 5 in the Ophelia syndrome. *Neurology*. 2011;77(18):1698-701.
54. Lai MZ, Huijbers MGM, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurology*. 2010;9(8):776-85.
55. Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, Peles E, Buckley C, Lang B, Vincent A. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain*. 2010;133(9):2734-48.
56. Arino H, Hoftberger R, Gresa-Arribas N, Martinez-Hernandez E, Armangue T, Kruer MC, Arpa J, Domingo J, Rojc B, Bataller L, Saiz A, Dalmau J, Graus F. Paraneoplastic Neurological Syndromes and Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies. *JAMA Neurol*. 2015;72(8):874-81.
57. Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, Cortese I, Dale RC, Gelfand JM, Geschwind M, Glaser CA, Honnorat J, Hoftberger R, Iizuka T, Irani SR, Lancaster E, Leypoldt F, Pruss H, Rae-Grant A, Reindl M, Rosenfeld MR, Rostasy K, Saiz A, Venkatesan A, Vincent A, Wandinger KP, Waters P, Dalmau J. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol*. 2016;15(4):391-404.
58. Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangue T, Glaser C, Iizuka T, Honig LS, Benseler SM, Kawachi I, Martinez-Hernandez E, Aguilar E, Gresa-Arribas N, Ryan-Florence N, Torrents A, Saiz A, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol*. 2013;12(2):157-65.
59. Florence NR, Davis RL, Lam C, Szperka C, Zhou L, Ahmad S, Campen CJ, Moss H, Peter N, Gleichman AJ, Glaser CA, Lynch DR, Rosenfeld MR, Dalmau J. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol*. 2009;66(1):11-8.

60. Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Iizuka T, Kawachi I, Bataller L, Torrents A, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. Late-onset anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology*. 2013;81(12):1058-63.
61. Afanasiev V, Brechemier ML, Boisseau W, Ducoudray R, Mayeur ME, Meyronet D, Peskine A, Desestret V, Psimaras D. Anti-NMDA receptor antibody encephalitis and neuroendocrine pancreatic tumor: Causal link? *Neurology*. 2016;87(1):112-3.
62. Hara M, Morita A, Kamei S, Yamaguchi M, Homma T, Nemoto N, Sugita K, Yamamoto T, Dalmau J. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with carcinosarcoma with neuroendocrine differentiation of the uterus. *J Neurol*. 2011;258(7):1351-3.
63. Jeraiby M, Depince-Berger A, Bossy V, Antoine JC, Paul S. A case of anti-NMDA receptor encephalitis in a woman with a NMDA-R(+) small cell lung carcinoma (SCLC). *Clin Immunol*. 2016;166-167:96-9.
64. Wu YY, He XJ, Zhang ML, Shi YY, Zhang JW. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis with lung adenocarcinoma. *Neurol Sci*. 2016;37(9):1573-5.
65. Dalmau J, Armangue T, Planaguma J, Radosevic M, Mannara F, Leypoldt F, Geis C, Lancaster E, Titulaer MJ, Rosenfeld MR, Graus F. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *Lancet Neurol*. 2019;18(11):1045-57.
66. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*. 2008;7(12):1091-8.
67. Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol*. 2011;10(1):63-74.
68. Kayser MS, Dalmau J. Anti-NMDA Receptor Encephalitis in Psychiatry. *Curr Psychiatry Rev*. 2011;7(3):189-93.
69. Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, Friese MA, Galea I, Kullmann DM, Beeson D, Lang B, Bien CG, Vincent A. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain*. 2010;133(Pt 6):1655-67.
70. McKeon GL, Robinson GA, Ryan AE, Blum S, Gillis D, Finke C, Scott JG. Cognitive outcomes following anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: A systematic review. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2018;40(3):234-52.
71. Arino H, Munoz-Lopetegui A, Martinez-Hernandez E, Armangue T, Rosa-Justicia M, Escudero D, Matos N, Graus F, Sugranyes G, Castro-Fornieles J, Compte A, Dalmau J, Santamaria J. Sleep disorders in anti-NMDAR encephalitis. *Neurology*. 2020;95(6):e671-e84.
72. Creten C, van der Zwaan S, Blankespoor RJ, Maatkamp A, Nicolai J, van Os J, Schieveld JN. Late onset autism and anti-NMDA-receptor encephalitis. *Lancet*. 2011;378(9785):98.
73. Hur J. Fever of Unknown Origin: An Unusual Presentation of Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis. *Infect Chemother*. 2015;47(2):129-32.
74. Johnson N, Henry C, Fessler AJ, Dalmau J. Anti-NMDA receptor encephalitis causing prolonged nonconvulsive status epilepticus. *Neurology*. 2010;75(16):1480-2.
75. Kurian M, Lalive PH, Dalmau JO, Horvath J. Opsoclonus-myoclonus syndrome in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Arch Neurol*. 2010;67(1):118-21.

76. Player B, Harmelink M, Bordini B, Weisgerber M, Girolami M, Croix M. Pediatric Opsoclonus-Myoclonus-Ataxia Syndrome Associated With Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis. *Pediatr Neurol.* 2015;53(5):456-8.
77. Mechelhoff D, van Noort BM, Weschke B, Bachmann CJ, Wagner C, Pfeiffer E, Winter S. Anti-NMDA receptor encephalitis presenting as atypical anorexia nervosa: an adolescent case report. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2015;24(11):1321-4.
78. Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, Gleichman AJ, Balice-Gordon R, Rosenfeld MR, Lynch D, Graus F, Dalmau J. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *The Lancet Neurology.* 2014;13(2):167-77.
79. Armangue T, Santamaria J, Dalmau J. When a serum test overrides the clinical assessment. *Neurology.* 2015;84(13):1379-81.
80. Zandi MS, Paterson RW, Ellul MA, Jacobson L, Al-Diwani A, Jones JL, Cox AL, Lennox B, Stamelou M, Bhatia KP, Schott JM, Coles AJ, Kullmann DM, Vincent A. Clinical relevance of serum antibodies to extracellular N-methyl-D-aspartate receptor epitopes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(7):708-13.
81. Murdie D, Cooney G, Ferguson J. Seronegative Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis. *Biol Psychiatry.* 2016;79(9):e67-e8.
82. Chen CH, Cheng MC, Liu CM, Liu CC, Lin KH, Hwu HG. Seroprevalence survey of selective anti-neuronal autoantibodies in patients with first-episode schizophrenia and chronic schizophrenia. *Schizophr Res.* 2017;190:28-31.
83. Hara M, Martinez-Hernandez E, Arino H, Armangue 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.* 2018;90(16):e1386-e94.
84. Ho ACC, Mohammad SS, Pillai SC, Tantsis E, Jones H, Ho R, Lim M, Hacoheh Y, Vincent A, Dale RC. High sensitivity and specificity in proposed clinical diagnostic criteria for anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Dev Med Child Neurol.* 2017;59(12):1256-60.
85. Seki M, Suzuki S, Iizuka T, Shimizu T, Nihei Y, Suzuki N, Dalmau J. Neurological response to early removal of ovarian teratoma in anti-NMDAR encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(3):324-6.
86. Suppiej A, Nosadini M, Zuliani L, Pelizza MF, Toldo I, Bertossi C, Tison T, Zoccarato M, Marson P, Giometto B, Dale RC, Sartori S. Plasma exchange in pediatric anti-NMDAR encephalitis: A systematic review. *Brain Dev.* 2016;38(7):613-22.
87. Dale RC, Brilot F, Duffy LV, Twilt M, Waldman AT, Narula S, Muscal E, Deiva K, Andersen E, Eyre MR, Eleftheriou D, Brogan PA, Kneen R, Alper G, Anlar B, Wassmer E, Heineman K, Hemingway C, Riney CJ, Kornberg A, Tardieu M, Stocco A, Banwell B, Gorman MP, Benseler SM, Lim M. Utility and safety of rituximab in pediatric autoimmune and inflammatory CNS disease. *Neurology.* 2014;83(2):142-50.
88. Chi X, Wang W, Huang C, Wu M, Zhang L, Li J, Zhou D. Risk factors for mortality in patients with anti-NMDA receptor encephalitis. *Acta Neurol Scand.* 2017;136(4):298-304.
89. Day GS, Laiq S, Tang-Wai DF, Munoz DG. Abnormal neurons in teratomas in NMDAR encephalitis. *JAMA Neurol.* 2014;71(6):717-24.
90. Viacoz A, Desestret V, Ducray F, Picard G, Cavillon G, Rogemond V, Antoine JC, Delattre JY, Honnorat J. Clinical specificities of adult male patients with NMDA receptor antibodies encephalitis. *Neurology.* 2014;82(7):556-63.
91. Pruss H, Finke C, Holtje M, Hofmann J, Klingbeil C, Probst C, Borowski K, Ahnert-Hilger G, Harms L, Schwab JM, Ploner CJ, Komorowski L, Stoecker W, Dalmau

- J, Wandinger KP. N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in herpes simplex encephalitis. *Ann Neurol.* 2012;72(6):902-11.
92. Nosadini M, Mohammad SS, Corazza F, Ruga EM, Kothur K, Perilongo G, Frigo AC, Toldo I, Dale RC, Sartori S. Herpes simplex virus-induced anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis: a systematic literature review with analysis of 43 cases. *Dev Med Child Neurol.* 2017;59(8):796-805.
93. Armangue T, Spatola M, Vlasea A, Mattozzi S, Carceles-Cordon M, Martinez-Heras E, Llufríu S, Muchart J, Erro ME, Abreira L, Moris G, Monros-Gimenez L, Corral-Corral I, Montejo C, Toledo M, Bataller L, Secondi G, Arino H, Martinez-Hernandez E, Juan M, Marcos MA, Alsina L, Saiz A, Rosenfeld MR, Graus F, Dalmau J, Simplex SH. Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: a prospective observational study and retrospective analysis. *Lancet Neurology.* 2018;17(9):760-72.
94. Linnoila J, Pulli B, Armangue T, Planaguma J, Narsimhan R, Schob S, Zeller MWG, Dalmau J, Chen J. Mouse model of anti-NMDA receptor post-herpes simplex encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2019;6(2):e529.
95. Solis N, Salazar L, Hasbun R. Anti-NMDA Receptor antibody encephalitis with concomitant detection of Varicella zoster virus. *J Clin Virol.* 2016;83:26-8.
96. Grillo E, da Silva RJ. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis and parvovirus B19: A possible link? *J Pediatr.* 2013;163(4):1233-4.
97. Ioannidis P, Papadopoulos G, Koufou E, Parissis D, Karacostas D. Anti-NMDA receptor encephalitis possibly triggered by measles virus. *Acta Neurol Belg.* 2015;115(4):801-2.
98. Phan TG, Messacar K, Dominguez SR, da Costa AC, Deng X, Delwart E. A new densovirus in cerebrospinal fluid from a case of anti-NMDA-receptor encephalitis. *Arch Virol.* 2016;161(11):3231-5.
99. Ma J, Zhang T, Jiang L. Japanese encephalitis can trigger anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *J Neurol.* 2017;264(6):1127-31.
100. Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1998;4(3):111-7.
101. Adang LA, Lynch DR, Panzer JA. Pediatric anti-NMDA receptor encephalitis is seasonal. *Ann Clin Transl Neurol.* 2014;1(11):921-5.
102. Vedeler CA, Antoine JC, Giometto B, Graus F, Grisold W, Hart IK, Honnorat J, Sillevs Smitt PA, Verschuuren JJ, Voltz R, Paraneoplastic Neurological Syndrome E. Management of paraneoplastic neurological syndromes: report of an EFNS Task Force. *Eur J Neurol.* 2006;13(7):682-90.
103. Keime-Guibert F, Graus F, Broet P, Rene R, Molinuevo JL, Ascaso C, Delattre JY. Clinical outcome of patients with anti-Hu-associated encephalomyelitis after treatment of the tumor. *Neurology.* 1999;53(8):1719-23.
104. Martinez-Hernandez E, Horvath J, Shiloh-Malawsky Y, Sangha N, Martinez-Lage M, Dalmau J. Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology.* 2011;77(6):589-93.
105. Dale RC, Pillai S, Brilot F. Cerebrospinal fluid CD19(+) B-cell expansion in N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Dev Med Child Neurol.* 2013;55(2):191-3.
106. Pruss H, Dalmau J, Arolt V, Wandinger KP. [Anti-NMDA-receptor encephalitis. An interdisciplinary clinical picture]. *Nervenarzt.* 2010;81(4):396, 8, 400, passim.
107. Hansen HC, Klingbeil C, Dalmau J, Li W, Weissbrich B, Wandinger KP. Persistent intrathecal antibody synthesis 15 years after recovering from anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *JAMA Neurol.* 2013;70(1):117-9.

108. Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, Parsons TD, Lynch DR, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci*. 2010;30(17):5866-75.
109. Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, Georges F, Rogemond V, Didelot A, Meissirel C, Honnorat J, Groc L. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain*. 2012;135(Pt 5):1606-21.
110. Planaguma J, Leyboldt F, Mannara F, Gutierrez-Cuesta J, Martin-Garcia E, Aguilar E, Titulaer MJ, Petit-Pedrol M, Jain A, Balice-Gordon R, Lakadamyali M, Graus F, Maldonado R, Dalmau J. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain*. 2015;138(Pt 1):94-109.
111. Kreye J, Wenke NK, Chayka M, Leubner J, Murugan R, Maier N, Jurek B, Ly LT, Brandl D, Rost BR, Stumpf A, Schulz P, Radbruch H, Hauser AE, Pache F, Meisel A, Harms L, Paul F, Dirnagl U, Garner C, Schmitz D, Wardemann H, Pruss H. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain*. 2016;139(Pt 10):2641-52.
112. Wenke NK, Kreye J, Andrzejak E, van Casteren A, Leubner J, Murgueitio MS, Reincke SM, Secker C, Schmidl L, Geis C, Ackermann F, Nikolaus M, Garner CC, Wardemann H, Wolber G, Pruss H. N-methyl-D-aspartate receptor dysfunction by unmutated human antibodies against the NR1 subunit. *Ann Neurol*. 2019;85(5):771-6.
113. Hilderink M, Titulaer MJ, Schreurs MW, Keizer K, Bunt JE. Transient anti-NMDAR encephalitis in a newborn infant due to transplacental transmission. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(4):e126.
114. Jagota P, Vincent A, Bhidayasiri R. Transplacental transfer of NMDA receptor antibodies in an infant with cortical dysplasia. *Neurology*. 2014;82(18):1662-3.
115. Shi YC, Chen XJ, Zhang HM, Wang Z, Du DY. Anti-N-Methyl-d-Aspartate receptor (NMDAR) encephalitis during pregnancy: Clinical analysis of reported cases. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2017;56(3):315-9.
116. Jurek B, Chayka M, Kreye J, Lang K, Kraus L, Fidzinski P, Kornau HC, Dao LM, Wenke NK, Long M, Rivalan M, Winter Y, Leubner J, Herken J, Mayer S, Mueller S, Boehm-Sturm P, Dirnagl U, Schmitz D, Kolch M, Pruss H. Human gestational N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies impair neonatal murine brain function. *Ann Neurol*. 2019;86(5):656-70.
117. Castillo-Gomez E, Oliveira B, Tapken D, Bertrand S, Klein-Schmidt C, Pan H, Zafeiriou P, Steiner J, Jurek B, Trippe R, Pruss 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*. 2017;22(12):1776-84.
118. 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, Siren AL, Stocker W, Ehrenreich H. Preexisting Serum Autoantibodies Against the NMDAR Subunit NR1 Modulate Evolution of Lesion Size in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2015;46(5):1180-6.
119. Castillo-Gomez E, Kastner A, Steiner J, Schneider A, Hettling B, Poggi G, Ostehr K, Uhr M, Asif AR, Matzke M, Schmidt U, Pfander V, Hammer C, Schulz TF, Binder L, Stocker W, Weber F, Ehrenreich H. The brain as immunoprecipitator of serum autoantibodies against N-Methyl-D-aspartate receptor subunit NR1. *Ann Neurol*. 2016;79(1):144-51.
120. 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, Stocker W, Ehrenreich H. Seroprevalence of

autoantibodies against brain antigens in health and disease. *Ann Neurol*. 2014;76(1):82-94.

121. Hammer C, Stepniak B, Schneider A, Papiol S, Tantra M, Begemann M, Siren AL, Pardo LA, Sperling S, Mohd Jofry S, Gurvich A, Jensen N, Ostmeier K, Luhder F, Probst C, Martens H, Gillis M, Saher G, Assogna F, Spalletta G, Stocker W, Schulz TF, Nave KA, Ehrenreich H. Neuropsychiatric disease relevance of circulating anti-NMDA receptor autoantibodies depends on blood-brain barrier integrity. *Mol Psychiatry*. 2014;19(10):1143-9.

122. Pruss H, Holtje 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*. 2012;78(22):1743-53.

123. 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*. 2012;32(32):11082-94.

124. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135.

125. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*. 1992;175(4):1091-101.

126. Xu Y, Song G. The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation. *J Biomed Sci*. 2004;11(4):426-38.

127. Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:881-922.

128. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*. 1994;1(3):167-78.

129. Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity*. 1994;1(5):423-31.

130. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008;112(5):1557-69.

131. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*. 2006;117(4):433-42.

132. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*. 2018;101:14-8.

133. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-8.

134. Emerson H. Panum on Measles: Observations Made During the Epidemic of Measles on the Faroe Islands in the Year 1846 (A translation from the Danish). *Am J Public Health Nations Health*. 1940;30(10):1245-6.

135. Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*. 1992;360(6401):264-5.

136. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag*; 2011.

137. Liba Z, Kayserova J, Elisak M, Marusic P, Nohejlova H, Hanzalova J, Komarek V, Sediva A. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: the clinical course in light

of the chemokine and cytokine levels in cerebrospinal fluid. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):55.

138. Byun JI, Lee ST, Moon J, Jung KH, Sunwoo JS, Lim JA, Kim TJ, Shin YW, Lee KJ, Jun JS, Lee HS, Lee WJ, Kim YS, Kim S, Jeon D, Park KI, Jung KY, Kim M, Chu K, Lee SK. Distinct intrathecal interleukin-17/interleukin-6 activation in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *J Neuroimmunol*. 2016;297:141-7.

139. Bien CG, Vincent A, Barnett MH, Becker AJ, Blumcke I, Graus F, Jellinger KA, Reuss DE, Ribalta T, Schlegel J, Sutton I, Lassmann H, Bauer J. Immunopathology of autoantibody-associated encephalitides: clues for pathogenesis. *Brain*. 2012;135(Pt 5):1622-38.

140. Tuzun E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol*. 2009;118(6):737-43.

141. Camdessanche JP, Streichenberger N, Cavillon G, Rogemond V, Jousserand G, Honnorat J, Convers P, Antoine JC. Brain immunohistopathological study in a patient with anti-NMDAR encephalitis. *Eur J Neurol*. 2011;18(6):929-31.

142. Jones BE, Tovar KR, Goehring A, Jalali-Yazdi F, Okada NJ, Gouaux E, Westbrook GL. Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally stabilized holoreceptors. *Sci Transl Med*. 2019;11(500):eaaw0044.

143. Malviya M, Barman S, Golombeck KS, Planaguma J, Mannara F, Strutz-Seebohm N, Wrzos C, Demir F, Baksmeier C, Steckel J, Falk KK, Gross CC, Kovac S, Bonte K, Johnen A, Wandinger KP, Martin-Garcia E, Becker AJ, Elger CE, Klocker N, Wiendl H, Meuth SG, Hartung HP, Seebohm G, Leyboldt F, Maldonado R, Stadelmann C, Dalmau J, Melzer N, Goebels N. NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4(11):768-83.

144. Wright S, Hashemi K, Stasiak L, Bartram J, Lang B, Vincent A, Upton AL. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain*. 2015;138(Pt 11):3159-67.

145. Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry A*. 2013;83(8):692-701.

146. Alanio C, Lemaitre F, Law HK, Hasan M, Albert ML. Enumeration of human antigen-specific naive CD8⁺ T cells reveals conserved precursor frequencies. *Blood*. 2010;115(18):3718-25.

147. Geiger R, Duhon T, Lanzavecchia A, Sallusto F. Human naive and memory CD4⁺ T cell repertoires specific for naturally processed antigens analyzed using libraries of amplified T cells. *J Exp Med*. 2009;206(7):1525-34.

148. Bacher P, Schink C, Teutschbein J, Kniemeyer O, Assenmacher M, Brakhage AA, Scheffold A. Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. *J Immunol*. 2013;190(8):3967-76.

149. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JL, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996;274(5284):94-6.

150. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Alvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noe F, Freund C. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol*. 2017;8:292.

151. Bacher P, Scheffold A. New technologies for monitoring human antigen-specific T cells and regulatory T cells by flow-cytometry. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;23:17-24.

152. Lederman S, Yellin MJ, Cleary AM, Pernis A, Inghirami G, Cohn LE, Covey LR, Lee JJ, Rothman P, Chess L. T-BAM/CD40-L on helper T lymphocytes augments

- lymphokine-induced B cell Ig isotype switch recombination and rescues B cells from programmed cell death. *J Immunol.* 1994;152(5):2163-71.
153. Furukawa H, Gouaux E. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J.* 2003;22(12):2873-85.
154. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):512-22.
155. Koehler FC, Cornely OA, Wisplinghoff H, Schauss AC, Salmanton-Garcia J, Ostermann H, Ziegler M, Bacher P, Scheffold A, Alex R, Richter A, Koehler P. Candida-Reactive T Cells for the Diagnosis of Invasive Candida Infection-A Prospective Pilot Study. *Front Microbiol.* 2018;9:1381.
156. Dao LM, Machule ML, Bacher P, Hoffmann J, Ly LT, Wegner F, Scheffold A, Pruss H. Decreased inflammatory cytokine production of antigen-specific CD4(+) T cells in NMDA receptor encephalitis. *J Neurol.* 2021.
157. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology.* 96: Academic Press; 2007. p. 41-101.
158. Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812(2):246-51.
159. Irani SR, Michell AW, Lang B, Pettingill P, Waters P, Johnson MR, Schott JM, Armstrong RJ, A SZ, Bleasel A, Somerville ER, Smith SM, Vincent A. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol.* 2011;69(5):892-900.
160. Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science.* 2006;313(5794):1792-5.
161. Petit-Pedrol M, Sell J, Planaguma J, Mannara F, Radosevic M, Haselmann H, Ceanga M, Sabater L, Spatola M, Soto D, Gasull X, Dalmau J, Geis C. LGI1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain.* 2018;141(11):3144-59.
162. Kornau HC, Kreye J, Stumpf A, Fukata Y, Parthier D, Sammons RP, Imbrosci B, Kurpjuweit S, Kowski AB, Fukata M, Pruss H, Schmitz D. Human Cerebrospinal Fluid Monoclonal LGI1 Autoantibodies Increase Neuronal Excitability. *Ann Neurol.* 2020;87(3):405-18.
163. Mueller SH, Farber A, Pruss H, Melzer N, Golombek KS, Kumpfel T, Thaler F, Elisak M, Lewerenz J, Kaufmann M, Suhs KW, Ringelstein M, Kellinghaus C, Bien CG, Kraft A, Zettl UK, Ehrlich S, Handreka R, Rostasy K, Then Bergh F, Faiss JH, Lieb W, Franke A, Kuhlenbaumer G, Wandinger KP, Leypoldt F, German Network for Research on Autoimmune E. Genetic predisposition in anti-LGI1 and anti-NMDA receptor encephalitis. *Ann Neurol.* 2018;83(4):863-9.
164. van Sonderen A, Roelen DL, Stoop JA, Verdijk RM, Haasnoot GW, Thijs RD, Wirtz PW, Schreurs MW, Claas FH, Sillevius Smitt PA, Titulaer MJ. Anti-LGI1 encephalitis is strongly associated with HLA-DR7 and HLA-DRB4. *Ann Neurol.* 2017;81(2):193-8.
165. Shu Y, Qiu W, Zheng J, Sun X, Yin J, Yang X, Yue X, Chen C, Deng Z, Li S, Yang Y, Peng F, Lu Z, Hu X, Petersen F, Yu X. HLA class II allele DRB1*16:02 is associated with anti-NMDAR encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(6):652-8.

166. Chen PL, Fann CS, Chu CC, Chang CC, Chang SW, Hsieh HY, Lin M, Yang WS, Chang TC. Comprehensive genotyping in two homogeneous Graves' disease samples reveals major and novel HLA association alleles. *PLoS One*. 2011;6(1):e16635.
167. Yoshimura S, Isobe N, Matsushita T, Yonekawa T, Masaki K, Sato S, Kawano Y, Kira J, South Japan Multiple Sclerosis Genetics C. Distinct genetic and infectious profiles in Japanese neuromyelitis optica patients according to anti-aquaporin 4 antibody status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(1):29-34.
168. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, de Seze J, Fujihara K, Greenberg B, Jacob A, Jarius S, Lana-Peixoto M, Levy M, Simon JH, Tenenbaum S, Traboulsee AL, Waters P, Wellik KE, Weinshenker BG, International Panel for NMOSD. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015;85(2):177-89.
169. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*. 2012;11(6):535-44.
170. Zhong X, Wang H, Ye Z, Qiu W, Lu Z, Li R, Shu Y, Chang Y, Hu X. Serum concentration of CD40L is elevated in inflammatory demyelinating diseases. *J Neuroimmunol*. 2016;299:66-9.
171. Liu J, Zhang Q, Shi Z, Yang M, Lian Z, Chen H, Feng H, Du Q, Zhang Y, Miao X, Li H, Zhou H. Increased expression of the membrane-bound CD40 ligand on peripheral CD4(+) T cells in the acute phase of AQP4-IgG-seropositive neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neuroimmunol*. 2018;325:64-8.
172. Varrin-Doyer M, Spencer CM, Schulze-Topphoff U, Nelson PA, Stroud RM, Cree BA, Zamvil SS. Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter. *Ann Neurol*. 2012;72(1):53-64.
173. Sagan SA, Winger RC, Cruz-Herranz A, Nelson PA, Hagberg S, Miller CN, Spencer CM, Ho PP, Bennett JL, Levy M, Levin MH, Verkman AS, Steinman L, Green AJ, Anderson MS, Sobel RA, Zamvil SS. Tolerance checkpoint bypass permits emergence of pathogenic T cells to neuromyelitis optica autoantigen aquaporin-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(51):14781-6.
174. Vincent A, Palace J, Hilton-Jones D. Myasthenia gravis. *Lancet*. 2001;357(9274):2122-8.
175. Drachman DB. Myasthenia gravis. *N Engl J Med*. 1994;330(25):1797-810.
176. Berrih-Aknin S, Cohen-Kaminsky S, Lepage V, Neumann D, Bach JF, Fuchs S. T-cell antigenic sites involved in myasthenia gravis: correlations with antibody titre and disease severity. *J Autoimmun*. 1991;4(1):137-53.
177. Hohlfeld R, Toyka KV, Heininger K, Grosse-Wilde H, Kalies I. Autoimmune human T lymphocytes specific for acetylcholine receptor. *Nature*. 1984;310(5974):244-6.
178. Hohlfeld R, Kalies I, Ernst M, Ketelsen UP, Wekerle H. T-lymphocytes in experimental autoimmune myasthenia gravis. Isolation of T-helper cell lines. *J Neurol Sci*. 1982;57(2-3):265-80.
179. Kaul R, Shenoy M, Goluszko E, Christadoss P. Major histocompatibility complex class II gene disruption prevents experimental autoimmune myasthenia gravis. *J Immunol*. 1994;152(6):3152-7.
180. Yi Q, Pirskanen R, Lefvert AK. Human muscle acetylcholine receptor reactive T and B lymphocytes in the peripheral blood of patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 1993;42(2):215-22.
181. Link H, Olsson O, Sun J, Wang WZ, Andersson G, Ekre HP, Brenner T, Abramsky O, Olsson T. Acetylcholine receptor-reactive T and B cells in myasthenia gravis and controls. *J Clin Invest*. 1991;87(6):2191-6.

182. Sommer N, Harcourt GC, Willcox N, Beeson D, Newsom-Davis J. Acetylcholine receptor-reactive T lymphocytes from healthy subjects and myasthenia gravis patients. *Neurology*. 1991;41(8):1270-6.
183. Cao Y, Amezcua RA, Kleinstein SH, Stathopoulos P, Nowak RJ, O'Connor KC. Autoreactive T Cells from Patients with Myasthenia Gravis Are Characterized by Elevated IL-17, IFN-gamma, and GM-CSF and Diminished IL-10 Production. *J Immunol*. 2016;196(5):2075-84.
184. Shi FD, He B, Li H, Matusevicius D, Link H, Ljunggren HG. Differential requirements for CD28 and CD40 ligand in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol*. 1998;28(11):3587-93.
185. Im SH, Barchan D, Maiti PK, Fuchs S, Souroujon MC. Blockade of CD40 ligand suppresses chronic experimental myasthenia gravis by down-regulation of Th1 differentiation and up-regulation of CTLA-4. *J Immunol*. 2001;166(11):6893-8.
186. Schaffert H, Pelz A, Saxena A, Losen M, Meisel A, Thiel A, Kohler S. IL-17-producing CD4(+) T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol*. 2015;45(5):1339-47.
187. Lim HW, Lee J, Hillsamer P, Kim CH. Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2008;180(1):122-9.
188. Makuch M, Wilson R, Al-Diwani A, Varley J, Kienzler AK, Taylor J, Berretta A, Fowler D, Lennox B, Leite MI, Waters P, Irani SR. N-methyl-D-aspartate receptor antibody production from germinal center reactions: Therapeutic implications. *Ann Neurol*. 2018;83(3):553-61.
189. Berrih-Aknin S, Ragheb S, Le Panse R, Lisak RP. Ectopic germinal centers, BAFF and anti-B-cell therapy in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*. 2013;12(9):885-93.
190. Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin*. 1976;26(2):119-21.
191. Wilson R, Makuch M, Kienzler AK, Varley J, Taylor J, Woodhall M, Palace J, Leite MI, Waters P, Irani SR. Condition-dependent generation of aquaporin-4 antibodies from circulating B cells in neuromyelitis optica. *Brain*. 2018;141(4):1063-74.
192. Yi JS, Guptill JT, Stathopoulos P, Nowak RJ, O'Connor KC. B cells in the pathophysiology of myasthenia gravis. *Muscle Nerve*. 2018;57(2):172-84.
193. Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol*. 1995;13(1):655-92.
194. Cotzomi E, Stathopoulos P, Lee CS, Ritchie AM, Soltys JN, Delmotte FR, Oe T, Sng J, Jiang R, Ma AK, Vander Heiden JA, Kleinstein SH, Levy M, Bennett JL, Meffre E, O'Connor KC. Early B cell tolerance defects in neuromyelitis optica favour anti-AQP4 autoantibody production. *Brain*. 2019;142(6):1598-615.
195. Sha Z, Compans RW. Induction of CD4(+) T-cell-independent immunoglobulin responses by inactivated influenza virus. *J Virol*. 2000;74(11):4999-5005.
196. Steele EJ, Cunningham AJ. High proportion of Ig-producing cells making autoantibody in normal mice. *Nature*. 1978;274(5670):483-4.
197. Mouthon L, Lacroix-Desmazes S, Nobrega A, Barreau C, Coutinho A, Kazatchkine MD. The self-reactive antibody repertoire of normal human serum IgM is acquired in early childhood and remains conserved throughout life. *Scand J Immunol*. 1996;44(3):243-51.
198. Palma J, Tokarz-Deptula B, Deptula J, Deptula W. Natural antibodies - facts known and unknown. *Cent Eur J Immunol*. 2018;43(4):466-75.

199. Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1285:97-114.
200. Panda S, Zhang J, Tan NS, Ho B, Ding JL. Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsonized bacteria. *EMBO J.* 2013;32(22):2905-19.
201. Born WK, Huang Y, Zeng W, Torres RM, O'Brien RL. A Special Connection between gammadelta T Cells and Natural Antibodies? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016;64(6):455-62.
202. Ugorski M. [The natural antibodies]. *Postepy Hig Med Dosw.* 1979;33(3):239-48.
203. Nagele EP, Han M, Acharya NK, DeMarshall C, Kosciuk MC, Nagele RG. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS One.* 2013;8(4):e60726.
204. Pan H, Oliveira B, Saher G, Dere E, Tapken D, Mitjans M, Seidel J, Wesolowski J, Wakhloo D, Klein-Schmidt C, Ronnenberg A, Schwabe K, Trippe R, Matz-Rensing K, Berghoff S, Al-Krinawe Y, Martens H, Begemann M, Stocker W, Kaup FJ, Mischke R, Boretius S, Nave KA, Krauss JK, Hollmann M, Luhder F, Ehrenreich H. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Mol Psychiatry.* 2019;24(10):1489-501.
205. Pruss H, Leubner J, Wenke NK, Czirjak GA, Szentiks CA, Greenwood AD. Anti-NMDA Receptor Encephalitis in the Polar Bear (*Ursus maritimus*) Knut. *Sci Rep.* 2015;5(1):12805.
206. Stafford EG, Kortum A, Castel A, Green L, Lau J, Early PJ, Munana KR, Mariani CL, Yoder JA, Olby NJ. Presence of cerebrospinal fluid antibodies associated with autoimmune encephalitis of humans in dogs with neurologic disease. *J Vet Intern Med.* 2019;33(5):2175-82.
207. Schickel JN, Glauzy S, Ng YS, Chamberlain N, Massad C, Isnardi I, Katz N, Uzel G, Holland SM, Picard C, Puel A, Casanova JL, Meffre E. Self-reactive VH4-34-expressing IgG B cells recognize commensal bacteria. *J Exp Med.* 2017;214(7):1991-2003.
208. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4471-5.
209. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, Holtzman DM, Betsholtz C, Armulik A, Sallstrom J, Berk BC, Zlokovic BV. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature.* 2012;485(7399):512-6.
210. Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, Adzemovic M, Bauer J, Berger T, Fujihara K, Itoyama Y, Lassmann H. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol.* 2009;66(5):630-43.
211. Saadoun S, Waters P, Bell BA, Vincent A, Verkman AS, Papadopoulos MC. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. *Brain.* 2010;133(Pt 2):349-61.
212. Dabner M, McCluggage WG, Bundell C, Carr A, Leung Y, Sharma R, Stewart CJ. Ovarian teratoma associated with anti-N-methyl D-aspartate receptor encephalitis: a report of 5 cases documenting prominent intratumoral lymphoid infiltrates. *Int J Gynecol Pathol.* 2012;31(5):429-37.
213. Behan PO, Lowenstein LM, Stilmant M, Sax DS. Landry-Guillain-Barre-Strohl syndrome and immune-complex nephritis. *Lancet.* 1973;1(7808):850-4.
214. Ankeny DP, Popovich PG. B cells and autoantibodies: complex roles in CNS injury. *Trends Immunol.* 2010;31(9):332-8.

215. Armangue T, Leypoldt F, Malaga I, Raspall-Chaure M, Marti I, Nichter C, Pugh J, Vicente-Rasoamalala M, Lafuente-Hidalgo M, Macaya A, Ke M, Titulaer MJ, Hoffberger R, Sheriff H, Glaser C, Dalmau J. Herpes simplex virus encephalitis is a trigger of brain autoimmunity. *Ann Neurol*. 2014;75(2):317-23.
216. Bacher P, Heinrich F, Stervbo U, Nienen M, Vahldieck M, Iwert C, Vogt K, Kollet J, Babel N, Sawitzki B, Schwarz C, Bereswill S, Heimesaat MM, Heine G, Gadermaier G, Asam C, Assenmacher M, Kniemeyer O, Brakhage AA, Ferreira F, Wallner M, Worm M, Scheffold A. Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell*. 2016;167(4):1067-78 e16.
217. Chattopadhyay PK, Price DA, Harper TF, Betts MR, Yu J, Gostick E, Perfetto SP, Goepfert P, Koup RA, De Rosa SC, Bruchez MP, Roederer M. Quantum dot semiconductor nanocrystals for immunophenotyping by polychromatic flow cytometry. *Nat Med*. 2006;12(8):972-7.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Le Minh Dao, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Die Rolle der CD4⁺-T-Zellen an der Pathogenese der Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis

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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, 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

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Le Minh Dao hatte folgenden Anteil an folgender Publikation:

Dao LM, Machule ML, Bacher P, Hoffmann J, Ly LT, Wegner F, Scheffold A, Prüss H. Decreased inflammatory cytokine production of antigen-specific CD4⁺ T cells in NMDA receptor encephalitis. Journal of Neurology. 2021;10.1007/s00415-020-10371-y.

Beitrag im Einzelnen:

- Beteiligung an der Planung und Ausarbeitung des Studienprotokolls
- Proteinexpression der extrazellulären Domänen ATD und S1S2 des NMDA-Rezeptors und des Kontrollantigens GST
 - Sequenzierung der Plasmide
 - Transformation der Plasmide in kompetente E. coli
 - Kontrolle der Transformation mit Kolonie-PCR und Agarose-Gelelektrophorese
 - Proteinexpression und Aufreinigung der GST-getaggten Fusionsproteine inkl. Variationen der Expressionsbedingungen wie Einstellung der Temperatur, IPTG-Konzentration, Expressionsdauer und Lyse der E. coli
 - Proteinnachweis und -quantifizierung mit SDS-Gelelektrophorese, Western Blots, Dot

Blots und BCA-Teste)

- Rekrutierung und venöse Blutentnahmen von anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis Patienten und Kontrollen
- Anreicherung antigenreaktiver T-Zellen
 - Präparation von PBMCs aus venösem Blut
 - T-Zell-Stimulation mit synthetisierten Fusionsproteinen und Kontrollantigenen (C. albicans, Keyhole Limpet Hemocyanin)
 - Magnetische Separation von aktivierten T-Zellen
 - immunhistologische Färbung
 - Analyse am FACS
 - immunhistologische Färbung
 - immunhistologische Färbung der Original-Fraktion (ohne Stimulation) zur Bestimmung des ursprünglichen CD4⁺-T-Zell-Anteils
 - Einzelfärbungen zur Kompensation von Durchflusszytometer-Daten
- Datenauswertung in Zusammenarbeit mit Kollegen
 - Gating-Strategie der am Durchflusszytometer gewonnenen Daten
 - Kompensation von Daten
 - Datenaufbereitung
 - statistische Auswertung
- substantielle Beteiligung an der Ausarbeitung des Manuskriptes
- In Zusammenarbeit mit Kollegen (Zusammenführen der Datensätze, Gating Strategie, statistische Auswertung) sind die Abbildungen 1B, 1C, 1D, 1F, 3A, 3B, 3C, 5A, 5B, 5C und die Tabelle 1 entstanden, in denen ich für den Großteil der anti-NMDA-Rezeptor-Patienten und zugehörigen Kontrollen verantwortlich war.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Publikationsliste

1. Jurek B, Chayka M, Kreye J, Lang K, Kraus L, Fidzinski P, Kornau HC, Dao LM, Wenke NK, Long M, Rivalan M, Winter Y, Leubner J, Herken J, Mayer S, Mueller S, Boehm-Sturm P, Dirnagl U, Schmitz D, Kolch M, Pruss H. Human gestational N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies impair neonatal murine brain function. Ann Neurol. 2019;86(5):656-70.
2. Dao LM, Machule ML, Bacher P, Hoffmann J, Ly LT, Wegner F, Scheffold A, Prüss H. Decreased inflammatory cytokine production of antigen-specific CD4+ T cells in NMDA receptor encephalitis. Journal of Neurology. 2021;10.1007/s00415-020-10371-y.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meine tiefe Dankbarkeit aussprechen, die mich während der Experimente, der Datenauswertung und der Anfertigung der Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Harald Prüß für die Ermöglichung und Umsetzung der Doktorarbeit und die hervorragende Betreuung.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Kollegen aus der AG Prüß, insbesondere bei Dr. Betty Jurek, Marie-Luise Machule und Lam-Thanh Ly, bedanken, die mir bei meiner Forschung zur Seite gestanden haben.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für ihre emotionale Unterstützung während des Medizinstudiums und der Doktorarbeit.