

Aus dem Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen  
(Helmholtz-Gemeinschaft)

DISSERTATION

Identifizierung Neuroner und Glialer Autoantigene  
bei Patienten mit Autoimmunen Enzephalitiden

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Heike Schumacher Najm  
aus Offenburg

Datum der Promotion: 3. Dezember 2021

Vorwort:

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schumacher H, Wenke NK, Kreye J, Höltje M, Marcus K, May C, Prüss H. IgA autoantibodies against native myelin basic protein in a patient with MS. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 6(4):e569. Juli 2019

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	1
Abkürzungen.....	2
<b>Abstract (Deutsch) .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract (Englisch) .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Autoimmunenenzephalitiden .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Bisher entdeckte neuronale Autoantigene.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Nukleäre und cytoplasmatische Antigene.....	10
1.2.2 Intrazelluläre synaptische Antigene.....	11
1.2.3 Extrazelluläre Antigene .....	12
<b>1.3 Weitere Zellgruppen im Gehirn als Ziel für Autoantikörper - Gliazellen .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 Autoantikörper gegen Gliazellen .....	16
1.3.2 Autoantikörper und Multiple Sklerose.....	18
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>20</b>
<b>2. Material und Methodik .....</b>	<b>22</b>
2.1 Monoklonale Antikörper.....	22
2.2 Immunhistochemie.....	23
2.3 Immunpräzipitation.....	25
2.4 Transfektion von HEK-Zellen mit GFAP.....	27
2.5 Antikörper aus Plasmapherese-Eluat .....	28
2.6 Western Blot .....	29
2.7 Massenspektrometrie .....	30
2.8 Puffer und Lösungen.....	31
2.9 Materialien und Geräte .....	33
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Monoklonale Antikörper.....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Patientinnen.....	37
3.1.2 Immunhistochemie.....	38

3.1.3 Immunpräzipitation, Gelelektrophorese .....	41
3.1.4 Zell-basierter Assay .....	47
<b>3.2 Antikörper aus Plasmapherese-Eluat .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Patientin .....	48
3.2.2 Immunhistochemie.....	48
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 GFAP als Autoantigen.....</b>	<b>54</b>
4.1.1 Technische Schritte zur Identifizierung von GFAP als Autoantigen.....	54
4.1.2 Bisherige beschriebene Autoantikörper gegen GFAP .....	55
4.1.3 Pathogenität von GFAP-Autoantikörpern.....	56
4.1.4 GFAP-Autoantikörper bei NMDA-Rezeptor-Enzephalitis.....	59
4.1.5 Schlussfolgerungen .....	62
<b>4.2 Myelin Basic Protein (MBP) als Autoantigen .....</b>	<b>64</b>
4.2.1 Bisherige Studien zu MBP-Autoantikörpern.....	64
4.2.2 Autoantikörper gegen natives MBP.....	66
4.2.3 Schlussfolgerungen .....	68
<b>4.3 Weiterführende Schritte und Fragen.....</b>	<b>69</b>
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
Eidesstattliche Versicherung.....	92
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen .....	93
Lebenslauf.....	94
Publikationsliste.....	95
Danksagung.....	96

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Färbung von Hirnschnitten (Ratte) mit monoklonalen humanen Antikörpern.....	38
Abbildung 2: Doppelfärbung von Hirnschnitten (Ratte) mit monoklonalen Antikörpern .....	39
Abbildung 3: Färbung von kultivierten Astrozyten mit monoklonalen Antikörpern .....	40
Abbildung 4: Gelelektrophorese mit Gegenüberstellung verschiedener Waschpuffer.....	42
Abbildung 5: Gelelektrophorese zur Darstellung unspezifischer Proteinbindung an Beads.....	44
Abbildung 6: Gelelektrophorese zum Vergleich unterschiedlicher Lysate .....	45
Abbildung 7: Färbung von transfizierten HEK-Zellen mit monoklonalen Antikörpern .....	47
Abbildung 8: Färbung von Hirnschnitten (Ratte, Maus) mit nativen Antikörpern.....	50
Abbildung 9: Doppelfärbung von Hirnschnitten (Ratte) mit nativen Antikörpern.....	51
Abbildung 10: Färbung von Hirnschnitten (Maus Wildtyp; Shiverer) mit nativen Antikörpern	52

## Abkürzungen

ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP 4	Aquaporin 4
BSA	Bovine Serum Albumin
CASPR2	Contactin associated protein 2
D2R	Dopamine-2 Rezeptor
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DNase	Deoxyribonuclease
DTT	Dithiothreitol
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g	Gramm
GAD 65	Glutamic Acid Decarboxylase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HCL	Hydrogenchlorid (Chlorwasserstoff)
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney Cells
HRP	Horseradish Peroxidase/ Meerrettich -Peroxidase
IgA	Immunglobulin A

IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
L	Liter
LEMS	Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom
LGI1	Leucine-rich, glioma inactivated 1
MBP	Myelin Basic Protein
mGluR5	Metabotropic Glutamate Receptor 5
MOG	Myelin Oligodendrocytes Glykoprotein
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMOSD	Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder
ml	Milliliter
OCB	Oligoklonale Banden
ON	Optikusneuritis
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDVF	Polyvinylidene Difluoride
PLP	Phospholipoprotein
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
rpm	rounds per minute
SCLC	Small Cell Lung Cancer

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPS	Stiff Person Syndrome
TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline Tween
TEMED	Tetramethylethylenediamine
VGKC	Voltage Gated Potassium Channel Complex
ZNS	Zentrales Nervensystem



## **Abstract (Deutsch)**

### Einleitung:

Im Jahr 2007 wurde das Spektrum der bekannten neuroimmunologischen Erkrankungen um eine weitere Krankheitsentität erweitert – die NMDA-Rezeptor-Enzephalitis. Hierbei binden Autoantikörper an ein extrazelluläres, neuronales Antigen (NMDA-Rezeptoren) und führen zu mannigfaltigen Symptomen, wie Somnolenz, Krampfanfällen und Halluzinationen. Inzwischen wurden noch weitere extrazelluläre Zielantigene identifiziert, darunter AMPA- und GABA-Rezeptoren. Die damit assoziierten Erkrankungen werden übergreifend als „Antikörpervermittelte Enzephalitiden“ bezeichnet. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass bei Patientinnen mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis häufig B-Lymphozyten im Liquor vorliegen, die monoklonale Antikörper gegen zusätzliche Hirnstrukturen bilden. Gleichzeitig kommt es im klinischen Alltag noch häufig vor, dass die Symptomatik eines Patienten für eine autoimmune Enzephalitis spricht, mit der Standarddiagnostik jedoch nicht das betreffende Antigen der vorliegenden Autoantikörper erfasst werden kann.

Ziel dieser Studie war es, ein zuverlässiges Protokoll zu entwickeln, das zum einen die Identifizierung der Zielantigene von monoklonalen Antikörpern aus Liquor erlaubt und zum anderen die Identifizierung des Zielantigens von nativen Autoantikörpern aus Serum von Patienten mit Verdacht auf autoimmune Enzephalitis und unbekanntem Zielantigen vereinfacht.

### Methodik:

Es wurde repräsentativ mit drei unterschiedlichen Antikörpern gearbeitet – zwei monoklonale Antikörper, die aus isolierten B-Zellen aus dem Liquor von Patientinnen mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis stammen, und nativen IgA-Antikörpern aus dem Serum einer Patientin mit Multipler Sklerose. Zunächst wurde durch immunhistochemische Färbungen von Hirnschnitten eine Reaktivität der Antikörper gegen zentralnervöses Gewebe bestätigt. In nachfolgenden, optimierten Schritten wurden mittels Immunpräzipitation, Gelelektrophorese, Western Blot, Färbung von transfizierten HEK-Zellen und Massenspektrometrie die genauen Zielantigene bestimmt.

### Ergebnisse:

Mithilfe des entwickelten Protokolls wurde GFAP als Zielantigen der beiden monoklonalen Autoantikörper identifiziert. Es stellte sich heraus, dass die Autoantikörper aus Serum natives MBP, nicht aber das Protein in seiner denaturierten Struktur als Zielantigen erkennen.

### Schlussfolgerung:

In Zusammenschau der Ergebnisse anderer Studien wird deutlich, dass Autoantikörper gegen GFAP keine Seltenheit sind und dass eine pathogene Wirkung von GFAP-Autoantikörpern mit spezifischen Symptomen und Komplikationen möglich ist. Deshalb sollte das Autoantigen GFAP in das Standard-Panel der Diagnostik von Antikörper-vermittelten Enzephalitiden aufgenommen werden.

Die hier identifizierten Autoantikörper gegen natives MBP zeigen, dass es durchaus relevant ist, auch nach Autoantikörpern gegen nativ-gefaltete Proteine zu screenen. Da die Klinik der Patientin nach einer immunsuppressiven Therapie stabilisiert werden konnte, scheint es plausibel, dass diese Autoantikörper auch eine pathogene Wirkung haben. Im Hinblick auf frühere Studien zu Multipler Sklerose, die ausschließlich nach Autoantikörpern gegen denaturierte Myelin-assoziierte Proteine gesucht haben und variable Ergebnisse lieferten, erscheint es notwendig, erneut größere Patienten-Kollektive nach Autoantikörpern gegen native Proteinstrukturen zu untersuchen.

### **Abstract (Englisch)**

#### Introduction:

In 2007 NMDA-Receptor-Encephalitis was identified as a novel neuro-immunological disease. In this disease autoantibodies bind to an extracellular neuronal antigen (NMDA-receptors) which results in a broad range of symptoms, such as seizures, hallucinations and coma. Since then, other extracellular targets of autoantibodies have been identified, including AMPA- and GABA-receptors. The diseases associated with these autoantibodies are summarized as „Antibody-mediated Encephalitides“. Surprisingly, B-lymphocytes frequently are present in the cerebrospinal fluid of patients with NMDA-Receptor-Encephalitis, producing monoclonal antibodies that target additional neuronal and glial antigens. Furthermore, often patients present with symptoms characteristic for autoimmune encephalitis in the clinic, but with standard diagnostics the corresponding antigen of the autoantibodies cannot be identified. The aim of this study was to develop a protocol that identifies the targets of monoclonal antibodies from cerebrospinal fluid, and also allows one to identify the antigen of native autoantibodies obtained from serum of patients with suspected Antibody-mediated Encephalitis with unknown antigen.

### Methods:

This study focused on three different antibodies – two monoclonal antibodies, obtained from isolated B-cells from cerebrospinal fluid of patients with NMDA-Receptor-Encephalitis, and native IgA-autoantibodies from serum of a patient with Multiple Sclerosis. First, immunohistochemistry was performed on brain sections in order to confirm reactivity of the autoantibodies within central nervous tissue. In subsequent steps, the specific targets of the autoantibodies were identified, using immunoprecipitation, gel electrophoresis, western blot, staining of transfected HEK-cells and mass spectrometry.

### Results:

With this protocol, GFAP was recognized as the target of the two monoclonal antibodies. Additionally, the target of the IgA-autoantibodies from serum proved to be native MBP, not the protein in its denatured structure.

### Conclusion:

With regard to previous studies, it is apparent that autoantibodies against GFAP are not rare and that GFAP-autoantibodies are likely to be associated with specific symptoms and complications. GFAP should thus be included in the standard diagnostic panel of antibody-mediated encephalitides.

The autoantibodies, directed against native MBP, show that it is relevant to also screen for autoantibodies directed against proteins in their native structure. The symptoms of the patient stabilized after immunosuppressive therapy, making a pathogenic impact of the autoantibodies likely. With respect to Multiple Sclerosis, given that previous studies focused exclusively on autoantibodies against denatured myelin associated proteins and yielded inconclusive results, it will be necessary in the future to screen against larger patient cohorts for autoantibodies and include natively folded proteins.

# 1. Einleitung

## 1.1 Autoimmunenenzephalitiden

*“[...] the tumour in a patient with sensory neuropathy may contain antigenic determinants not present in other tumours, and [...] these determinants are shared by some constituent of the central nervous system. An immune reaction directed against such tumour determinants might then incidentally cause damage to the central nervous system.”(1)*

Nachdem P.C. Wilkinson 1964 bei einer Subgruppe von Krebspatienten neurologische Auffälligkeiten feststellte und bei ebendiesen Patienten Antikörper mit Affinität zu Hirngewebe nachweisen konnte, formulierte er seine Hypothese: Tumore können antigene Strukturen beinhalten, die denen im Gehirn ähneln. Antikörper, die gegen tumoröses Gewebe gerichtet sind, können konsekutiv Strukturen im Gehirn binden und schädigen.

Bereits vor der Veröffentlichung von Wilkinson wurde von Patienten mit ähnlichen Leiden berichtet, so: Herrmann Oppenheim, ein Arzt an der Berliner Charité, 1888 in dem Artikel “Über Hirnsymptome bei Carcinomatose” (2), und 1948 beschrieb Denny-Brown das nach ihm benannte Krankheitsbild in der Publikation “Primary sensory neuropathy with muscular changes associated with carcinoma” (3). Die Vorstellung, dass extrazerebrale Tumore und das Auftreten von neurologischen Symptomen wie Neuropathien oder Krampfleiden vergesellschaftet sein können, war also schon in den 60er Jahren nicht neu. Eine neue wissenschaftliche Erkenntnis war jedoch, das Immunsystem als Bindeglied zwischen Neoplasie und neurologischer Symptomatik zu identifizieren.

Seit Wilkinson`s vorsichtiger Hypothese 1964 haben die Forschung und die klinische Praxis auf dem Gebiet der “Hirnsymptome bei Carcinomatose” denn auch enorme Fortschritte gemacht.

Versiertere Labortechniken erlaubten in den Folgejahren zunächst die Identifizierung mehrerer Zielantigene, die intrazellulär in Nervenzellen lokalisiert sind und von Antikörpern erkannt werden, die vornehmlich im Zusammenhang mit unterschiedlichen Tumorentitäten gebildet werden. Heute wird diese Gruppe von Erkrankungen als paraneoplastische Enzephalitiden bezeichnet.

2007 bekam das Forschungsfeld neuen Aufwind durch eine Entdeckung von Josep Dalmau et al.: Es werden auch Antikörper gegen zerebrale Epitope gebildet, die extrazellulär lokalisiert sind und auch unabhängig von Tumoren entstehen. Das erste von Dalmau et al. beschriebene Epitop ist die NR1 Untereinheit von NMDA-Rezeptoren (4, 5). Nur zu etwa 50% ist danach das Auftreten der Antikörper mit einem Tumor, zumeist Teratome, vergesellschaftet. Mittlerweile ist bekannt, dass die NMDA-Rezeptor-Enzephalitis eine der häufigsten Ursachen von Enzephalitiden ist (6). Seit der Beobachtung von Dalmau et al. wurde eine Vielzahl von weiteren extrazellulären Zielantigenen im Gehirn entdeckt (7-10).

Trotz des großen wissenschaftlichen Erkenntniszuwachses birgt das Thema “autoimmune Enzephalitiden” noch viele offene Fragen.

Zwar konnte im Tiermodell simuliert werden, wie es im Zusammenhang mit Tumoren zur Bildung von Autoantikörpern kommen kann (11). Weshalb werden aber Antikörper auch bei Patienten ohne Neoplasie gebildet? Auftreten der Antikörper und Beginn der neurologischen Symptomatik stellen nur Anfangs- und Endglied der Pathogenese der autoimmunen Enzephalitiden dar - was passiert jedoch dazwischen? Wie gelangen Antikörper in das Gehirn? Welche Mechanismen führen zu der sehr diversen Klinik der autoimmunen Enzephalitiden? Welche Rolle spielen die weiteren Akteure des Immunsystems, wie etwa T-Zellen, Komplement oder Mikroglia?

Die Vielzahl der Autoantigene und der zugehörigen klinischen Syndrome, die in der kurzen Zeitspanne seit 2007 identifiziert wurden, lässt den Rückschluss zu, dass noch viele weitere krankheitsrelevante Autoantigene existieren und entdeckt werden können. Die bisher beschriebenen Autoantigene lassen sich in drei große Gruppen unterteilen - nukleäre/cytoplasmatische Antigene, intrazelluläre synaptische Antigene und extrazelluläre Antigene.

## **1.2 Bisher entdeckte neuronale Autoantigene**

### 1.2.1 Nukleäre und cytoplasmatische Antigene

Antikörper, die an nukleare und cytoplasmatische neuronale Antigene binden, treten meist im Zusammenhang mit einer Neoplasie auf. Da die Zielantigene sowohl in Neuronen als auch auf Krebszellen exprimiert werden, werden sie auch als onkoneuronale oder paraneoplastische Antikörper bezeichnet. Die daraus resultierenden Krankheiten werden unter dem Begriff “paraneoplastische Enzephalitiden” zusammengefasst (12).

Eins der am besten charakterisierten nukleären Antigene ist “Hu” (13). Die Mehrzahl der Patienten, die Antikörper gegen dieses Epitop bilden, leiden an einem kleinzelligen Bronchialkarzinom. Die Bandbreite der neurologischen Klinik ist dabei sehr groß. Die meisten Patienten werden mit einer sensorischen Neuropathie, Kleinhirndegeneration, limbischer Enzephalitis oder Hirnstammencephalitis vorstellig (14).

Antikörper gegen das Protein “Yo” (auch CDR1 und 2 genannt - cerebellar degeneration-related protein) werden fast ausschließlich bei Frauen mit Brustkrebs und anderen gynäkologischen Tumoren gefunden und gehen mit einer Kleinhirndegeneration einher (15, 16).

Antikörper gegen das Antigen “Ma2” werden dagegen vorwiegend bei gleichzeitigem Vorliegen eines Keimzelltumors des Hodens gebildet und treten folglich viel häufiger bei Männern auf. Klinisches Korrelat ist zumeist eine limbische Enzephalitis oder eine Enzephalopathie des Diencephalons oder Hirnstamms (17).

Weitere beschriebene Zielantigene sind “Collapsin response mediator protein 5”, Zinc finger protein ZIC 4, Gephyrin, Ri-Proteine, sowie Tr. (18-22).

Wie oben exemplarisch dargestellt, sind die paraneoplastischen neurologischen Symptome, die im Kontext von nukleären und cytoplasmatischen antineuronalen Antikörpern entstehen, sehr divers. Ob die jeweiligen Autoantikörper überhaupt eine pathogene Wirkung haben - zumal die Zielantigene sich im Inneren der Zelle befinden und somit für Antikörper nicht zugänglich sein sollten -, bleibt umstritten.

Zweifel an der pathogenen Wirkung der onkoneuronalen Antikörper basieren auf folgenden Beobachtungen: Klassische immunsuppressive Therapien zeigen meist keine wesentliche Wirkung auf das Krankheitsgeschehen paraneoplastischer autoimmuner Enzephalitiden (23-25).

Zudem zeigen Mäuse, die mit rekombinantem Hu immunisiert wurden und hohe Anti-Hu-Titer entwickelten, keine neurologischen Auffälligkeiten (26).

Dagegen wächst die Evidenz für eine T-Zell-vermittelte Pathogenese der paraneoplastischen Enzephalitiden: Bei Patientinnen mit Brust- oder Ovarialkarzinom und gleichzeitigem Vorliegen von Yo-Antikörpern und paraneoplastischer cerebellärer Degeneration konnten in Blutproben und Liquor Tumor-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden, die gegen das Yo-Protein gerichtet sind. Das Yo-Protein wird von den Tumorzellen und im Cytoplasma von cerebellären Purkinje-Zellen exprimiert (27-30).

Auch bei Anti-Hu-positiven Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom wurden T-Zellen festgestellt, die durch rekombinantes Hu-Protein aktiviert werden können (31), und post-mortem-Analysen der Hirne von Patienten mit Anti-Yo- und Anti-Hu- assoziierter paraneoplastischer Enzephalitis zeigen eine Infiltration mit T-Lymphozyten (32, 33).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Antikörper gegen intrazelluläre Antigene wohl eher eine Begleiterscheinung von Tumorerkrankungen darstellen und die Symptome der Enzephalitis eher auf das Einwirken von zytotoxischen T-Zellen zurückzuführen sind (34, 35).

### 1.2.2 Intrazelluläre synaptische Antigene

Autoantigene, die intrazellulär und an der Synapse lokalisiert sind, sind GAD65 (65 kDa Isoform von Glutamat Decarboxylase) und Amphiphysin.

GAD65-Antikörper wurden bei Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 1 und bei Patienten mit Stiff-Person-Syndrom (SPS) beschrieben. GAD65 wird in pankreatischen Betazellen und in GABAergen Neuronen im ZNS gebildet. Das Stiff-Person-Syndrom ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Erhöhung des Muskeltonus und schmerzhafte Muskelkrämpfe. Das Syndrom tritt idiopathisch oder paraneoplastisch auf, meist in Assoziation mit Mamma- oder Bronchialkarzinom. Im ZNS wirkt es als Enzym in presynaptischen Vesikeln, wo es aus Glutamat den inhibitorischen Neurotransmitter GABA bildet. Patienten mit SPS sprechen häufig gut auf Immuntherapien an, weshalb eine pathogene Wirkung der Antikörper vorstellbar ist. In vitro konnte gezeigt werden, dass Autoantikörper die enzymatische Aktivität von GAD65 inhibieren können und so ein GABA-Defizit bewirken. Wie aber erreichen die Antikörper ein Enzym, welches intrazellulär lokalisiert ist? Ein Erklärungsansatz besteht darin, dass Fragmente von

GAD65 während der Exozytose von GABA für eine kurze Zeit an der Zelloberfläche exponiert sind und hier die Antikörper binden könnten (36). Da jedoch bei Patienten mit Typ 1 Diabetes in mehreren Studien auch GAD65-spezifische T-Zellen nachgewiesen wurden und im Tiermodell gezeigt wurde, dass die Präsenz dieser T-Zellen unabhängig von Antikörpern zu einer letalen Enzephalomyelitis führen kann, wird eine synergistische Pathogenese, vermittelt durch T-Zellen und Antikörper, als wahrscheinlich angesehen (37).

Amphiphysin ist ein Phosphoprotein, welches auf der zytoplasmatischen Seite von präsynaptischen Vesikeln lokalisiert und an der Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt ist. Autoantikörper gegen dieses Protein treten ebenfalls beim paraneoplastischen Stiff-Person-Syndrom auf, insbesondere im Zusammenhang mit Brustkrebs, sowie bei sensorischer Neuropathie und Enzephalomyelitis. Im Tierversuch konnten durch passiven Transfer von Amphiphysin-Autoantikörpern Symptome des Stiff-Man-Syndroms provoziert werden und *in vitro* wurde eine Beeinträchtigung von GABAergen Signalwegen nachgewiesen. Bei Patienten lässt sich durch Plasmapherese und konsekutive Senkung der Antikörpertiter eine Besserung der klinischen Symptome erzielen (38). Deshalb geht man davon aus, dass auch diese Autoantikörper einen pathogenen Effekt haben. Wie die Antikörper das intrazelluläre Zielantigen binden, ist bislang unklar (39, 40).

### 1.2.3 Extrazelluläre Antigene

Wie in der Einführung bereits erwähnt, beschrieb Josep Dalmau 2007 zum ersten Mal neuronale Antikörper, die gegen ein extrazelluläres Epitop - die extrazelluläre Domäne des NMDA-Rezeptors gerichtet sind (4). Seit dieser Entdeckung werden ständig neue extrazelluläre Zielantigene identifiziert.

Bisher konnten pathogene Autoantikörper gegen folgende weitere Rezeptoren nachgewiesen werden: AMPA-Rezeptoren, D2R (Dopamin 2 Rezeptor), GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren, mGluR1 (metabotrope Glutamatrezeptoren vom Subtyp 1), mGluR5 (metabotrope Glutamatrezeptore 5) und GlyR (Glyzin-Rezeptoren).

Andere extrazelluläre Proteine, die von Autoantikörpern erkannt werden sind: Caspr2 (Contactin-associated protein-like 2), DPPX (dipeptidyl-peptidase-like protein-6), IgLON5, LGI1 (Leucine-rich, glioma-inactivated 1), Neurexin-3 alpha und VGKC (Voltage-gated potassium channel) (7-10, 41, 42).



Wodurch unterscheiden sich Enzephalitiden mit Antikörpern, deren Zielantigene auf der Oberfläche der Neurone liegen, von denen, deren Ziele im Inneren der Zellen lokalisiert sind?

Im Gegensatz zu Enzephalitiden mit intrazellulären Antigenen, bei denen die Pathogenese T-Zell-vermittelt zu sein scheint, wird angenommen, dass das Krankheitsgeschehen bei Enzephalitiden mit extrazellulären Antigenen direkt auf die Einwirkung der Antikörper zurückzuführen ist. Deshalb werden diese Erkrankungen auch als “Antikörper-vermittelte Enzephalitiden” bezeichnet.

Evidenz für eine direkte pathogene Wirkung der Antikörper lässt sich aus folgenden Beobachtungen mit NMDA-Rezeptor-Antikörpern ableiten:

- Neurone in Kultur, welche NMDA-Rezeptor-Antikörpern von Patienten ausgesetzt werden, zeigen eine Abnahme von postsynaptischen NMDA-Rezeptoren. Die Rezeptoren werden internalisiert. Entfernt man die Antikörper aus dem Medium, kann wieder eine Zunahme der Rezeptoren beobachtet werden. Die Internalisierung der Rezeptoren ist also reversibel und direkt abhängig von der Präsenz der Antikörper (43, 44).
- Post mortem Analysen der Gehirne von Patienten, die an NMDA-Rezeptor-Enzephalitis gestorben sind, zeigen kaum lymphozytäre Infiltrate und Ablagerungen von Komplement. Ablagerungen von Immunglobulinen sind jedoch großflächig präsent, mit einer Konzentrierung auf dem Hippocampus (45).
- Mäuse, die über einen Katheter Liquor von NMDA-Rezeptor-Enzephalitis-Patienten im Ventrikelsystem erhalten, zeigen ähnliche psychiatrische und motorische Beeinträchtigungen wie Menschen. Auch die histopathologischen Befunde, wie Ablagerungen von Antikörpern im Hippocampus, konnten reproduziert werden (46).
- Patienten sprechen in der Regel auf Immuntherapie an (Glukokortikoide, I.V. Immunglobulin, Plasmapherese, Rituximab) (44).
- Die Gabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie Ketamin führt zu ähnlichen Symptomen wie bei der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (47).

Für das Auftreten von Antikörper-vermittelten Enzephalitiden sind zwei Trigger bekannt: Herpes-Simplex-Enzephalitis und Tumore:

Etwa 30% der Patienten mit Herpes-Simplex-Enzephalitis entwickeln NMDA-Rezeptor-Antikörper (48, 49).

Eine Assoziation zu Tumoren besteht bei Antikörpern gegen extrazelluläre Antigene in weitaus weniger Fällen als bei Enzephalitiden mit intrazellulären Antigenen: Während bei Patienten mit Anti-Hu-Antikörpern in über 80% der Fälle (50) und bei Patienten mit Anti-Ma2-Antikörpern bei etwa 90% Tumore nachweisbar sind, weisen nur 58% der Patienten mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis und 27% der Patienten mit GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Enzephalitis Neoplasien auf (17). Bei zwei Antikörper-vermittelten Enzephalitiden - mit Antikörpern gegen D2R und Neurexin-3 $\alpha$  - konnte bislang sogar noch nie eine Assoziation zu einem Tumor nachgewiesen werden.

Wie auch bei den Enzephalitiden mit intrazellulären Antigenen, sind bestimmte Autoantikörper mit bestimmten Tumoren assoziiert. 50% der Patienten mit GABA<sub>B</sub>-Antikörpern und 56% der Patienten mit AMPA-Rezeptor-Antikörpern sind an Small Cell Lung Cancer (SCLC) erkrankt, GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antikörper sind mit Thymomen assoziiert und Antikörper gegen mGluR5 mit Hodgkin-Lymphom.

Aufbauend auf den genannten Beobachtungen wurde folgende Hypothese zur Pathogenese der Antikörper-vermittelten Enzephalitis entwickelt (51):

Dendritische Zellen nehmen Antigene auf, die durch Herpes-Virus-induzierte Zerstörung von Nervenzellen und apoptotische Tumorzellen exponiert werden. Die dendritischen Zellen wandern schließlich zu regionalen Lymphknoten und kommen dort mit naiven B-Zellen in Kontakt. Die naiven B-Zellen differenzieren sich nach Kontakt zu den Antigenen in Antikörper-produzierende Plasmazellen um. B-Gedächtniszellen dringen in das ZNS vor, werden durch den erneuten Kontakt zu den Antigenen restimuliert und entwickeln sich ebenso weiter zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Im ZNS entfalten die Antikörper ihre pathogene Wirkung durch verschiedene Mechanismen: Funktionelle Blockade des Antigens (GABA<sub>B</sub>-Rezeptor Antikörper), Internalisierung der Zielantigene (NMDA-Rezeptor-Antikörper) und Verhinderung von Protein-Protein-Interaktionen (Leucine-rich, glioma inactivated 1, LGI1-Antikörper).

Vermutlich in Analogie zu der geringeren Tumorbeteiligung bei Antikörper-vermittelten Enzephalitiden, sind bei dieser Erkrankungsgruppe jüngere Patienten eher als bei den paraneoplastischen Enzephalitiden betroffen. Beispielsweise liegt das mittlere Erkrankungsalter

der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis bei 21 Jahren und das bei mGluR5-Enzephalitis bei 29 Jahren (51).

Die Klinik der Antikörper-vermittelten Enzephalitiden hat eine große Bandbreite. Gemeinsames Merkmal der meisten Antikörper-vermittelten Enzephalitiden ist Gedächtnisverlust und Verwirrtheit. Je größer die beschriebenen Patientenkohorten, desto klarer lassen sich die klinischen Syndrome voneinander abgrenzen und lassen bereits vor der Antikörper-Diagnostik Rückschlüsse auf das jeweilige Zielantigen zu.

Typisch für die Klinik der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist ein dreiphasiger Verlauf. Die Krankheit beginnt mit einer Prodromalphase, die durch erhöhte Temperatur und Müdigkeit der Patienten gekennzeichnet ist. Darauf folgt eine schizophrenie-artige Episode, in der Patienten mit formalen Denkstörungen, Verhaltensänderungen, wahnhaften Ideen und Halluzinationen auffällig werden. Die letzte Phase ist gekennzeichnet durch Katatonie, Stupor und Mutismus und die Patienten sind häufig nicht ansprechbar.(44)

Häufiges Charakteristikum von GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Enzephalitis sind dagegen epileptische Anfälle, Patienten mit Antikörpern gegen D2R neigen zu Parkinsonismus und Dystonie, und Patienten mit CASPR2-Antikörpern werden häufig mit neuropathischen Schmerzen und einer erhöhten Erregbarkeit der Skelettmuskulatur klinisch apparent (10, 52-54).

### **1.3 Weitere Zellgruppen im Gehirn als Ziel für Autoantikörper - Gliazellen**

Die vorangehenden Abschnitte gaben einen Überblick über Autoantikörper, die gegen neuronale Antigene gerichtet sind. Aber welche anderen Zellen sind noch im Gehirn vorhanden? Und welche Zellen sollten folglich als mögliche Ziele von Autoantikörpern nicht außer Acht gelassen werden? Die Zellen des menschlichen Gehirns werden in zwei Gruppen untergliedert - Nervenzellen und Gliazellen. Es wird angenommen, dass es im Gehirn einen gleich hohen Anteil von Glia- und Nervenzellen gibt (55).

Die Masse der Gliazellen lässt sich unterteilen in drei hochspezialisierte Subgruppen - Oligodendrozyten, Mikroglia und Astrozyten, welche keinesfalls als passive Nachbarn der Neurone erachtet werden dürfen, sondern erheblichen Anteil an der Integrität des Nervensystems haben.

### Oligodendrozyten:

Oligodendrozyten bilden hauptsächlich die Myelinscheiden im ZNS. Dabei werden ihre lipidreichen Ausläufer um die Axone der Neurone gehüllt, um diese zu isolieren und eine schnelle Erregungsleitung zu ermöglichen. Neben den Myelin-bildenden Oligodendrozyten gibt es auch Satelliten-Oligodendrozyten, welche an der Regulation der Mikroumgebung der Neurone beteiligt sein könnten (56).

### Mikroglia:

Mikroglia werden gemeinhin als Makrophagen des ZNS betrachtet. Mittlerweile ist jedoch anerkannt, dass die Funktionen der Mikroglia weit umfassender sind als die Immunabwehr. So wurde gezeigt, dass sie unter anderem an der Regulation der Synaptogenese und der Neuroplastizität beteiligt sind (57).

### Astrozyten:

Es wird angenommen, dass es mindestens neun Subpopulationen von Astrozyten gibt, welche nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell äußerst divers sind (58). So konnte gezeigt werden, dass sie die Neurotransmission als Bestandteil der dreiteiligen Synapse beeinflussen, die Synaptogenese regulieren, Neurone bei verschiedenen Stoffwechselprozessen unterstützen und an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind (59, 60).

So verschieden und variabel die Funktionen der Neuroglia sind, so vielfältig können sie auch Krankheitsprozesse beeinflussen. So wird beispielsweise bei der Alzheimer-Erkrankung eine Hochregulierung und Aktivierung von astrozytären A2A-Rezeptoren beobachtet und führt zu einer Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung. Eine Mutation im CSF-1 Signalweg führt zu einer Reduktion von Mikroglia und ist beim Menschen mit präseniler Demenz assoziiert (61, 62).

#### 1.3.1 Autoantikörper gegen Gliazellen

Bislang konnten vier gliale Epitope mit klinischer Relevanz identifiziert werden: Aquaporin 4 (AQP 4), Myelin-Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG), SOX1 und GFAP.

Aquaporin 4 und MOG sind membranöse Proteine und folglich direkt zugänglich für intrathekale Antikörper. Dagegen ist SOX1 ein nukleäres und GFAP ein cytoplasmatisches Protein.

**Glial Fibrillary Acidic Protein (Saures Gliafasterprotein / GFAP)** gehört zu der Familie der Intermediärfilamente und ist neben Vimentin, Nestin und Synemin das wichtigste Intermediärfilament im Zytoskelett von reifen Astrozyten. (63).

Autoantikörper gegen GFAP wurden unter anderem nach Schädel-Hirn-Traumata (64), bei Kindern mit Autismus (65) und bei Gliom-Patienten (66) nachgewiesen. Auch hier besteht noch Ungewissheit, ob und in-wie-fern die Antikörper das Krankheitsgeschehen dieser Krankheiten beeinflusst.

Demgegenüber steht das Krankheitsbild der nekrotisierenden Meningoenzephalitis („Mopsenzephalitis“). Die nekrotisierende Meningoenzephalitis ist eine entzündliche Hirnerkrankung, die unbehandelt meist letal ist und vor allem bei kleinen Haushunden vorkommt. Ähnlich wie bei der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis beim Menschen sind bei dieser Erkrankung auch primär junge weibliche Tiere betroffen. Einer Nekrose in verschiedenen Hirnregionen, darunter die Großhirnrinde, der Hirnstamm und das Kleinhirn, geht eine Infiltration des Gehirns mit Lymphozyten voraus. Die betroffenen Tiere werden mit Krampfanfällen, Tremor und Charakteränderung auffällig. Während die Ursache der Erkrankung lange Zeit unklar war, wurden 2003 Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement auf Astrozyten nachgewiesen, sodass der Verdacht einer autoimmunen Pathogenese entstand. Schließlich konnte 2007 GFAP als Autoantigen der Antikörper im Liquor und Serum ausgemacht werden (67, 68).

2016 wurde das Äquivalent zur nekrotisierenden Meningoenzephalitis beim Menschen beschrieben - eine Meningoenzephalomyelitis, die mit GFAP-Autoantikörpern einhergeht (autoimmune GFAP-Astrozytopathie) (69).

**SOX1** ist ein Transkriptionsfaktor. Antikörper gegen SOX1 (Anti-Glial Nuclear Antibody) binden an die Nuklei der Bergmann-Gliazellen im Cerebellum und wurden zuerst bei Patienten mit paraneoplastischem Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom (LEMS) beschrieben (70). Sie treten bei 70% der Patienten mit paraneoplastischem LEMS auf, nicht aber bei Patienten mit idiopathischem LEMS. Insbesondere besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Antikörper und Small Cell Lung Cancer (SCLC). SCLC wird bei den meisten Patienten erst nach Auftreten des LEMS diagnostiziert. Deshalb werden in der Praxis Patienten mit LEMS und SOX1-Autoantikörpern besonders beobachtet, um SCLC so früh wie möglich nachzuweisen. Ob die Antikörper selbst auch pathogen sind, oder eher eine Begleiterscheinung, ist noch unklar (71).

**Aquaporin 4 (AQP 4)** ist der am häufigsten vorkommende Wasserkanal im ZNS und wird primär in perivaskulären astrozytären Ausläufern exprimiert. Antikörper gegen AQP 4 erzeugen in immunhistochemischen Färbungen eine Fluoreszenz der kleinen Hirngefäße, der Pia mater und Glia limitans. IgG Antikörper gegen AQP 4 sind hochspezifisch für Neuromyelitis Optica, eine demyelinisierende Erkrankung, die das Rückenmark und den Sehnerv betrifft (72). AQP 4 ist in der Plasmamembran der Astrozyten lokalisiert, sodass das Epitop für die Antikörper direkt zugänglich ist. Da in entzündlichen Läsionen Ablagerungen von Immunglobulin und Komplement vorhanden sind, Patienten gut auf immunsuppressive Therapien ansprechen und die Klinik der Patienten parallel zur Höhe der Antikörpertiter verläuft, geht man hier von einer Autoantikörpervermittelten Pathogenese aus (73).

**Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG)** gehört zu der Immunglobulin-Superfamilie und wird ausschließlich im Zentralen Nervensystem auf der Oberfläche von Myelinscheiden und auf Fortsätzen von Oligodendrozyten exprimiert. Die genaue Funktion von MOG ist noch unklar, allerdings wird aufgrund der extrazellulären Ig-Domäne vermutet, dass das Protein als Oberflächenrezeptor oder Zelladhäsionsmolekül agieren könnte (74, 75). Autoantikörper, die gegen natives MOG gerichtet sind, werden vornehmlich bei pädiatrischen ADEM-Patienten (Akute disseminierte Enzephalomyelitis) und AQP4 seronegativen Patienten mit NMOSD (Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder) nachgewiesen und sind mit einer guten Prognose assoziiert (76).

### 1.3.2 Autoantikörper und Multiple Sklerose

Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems und ist gekennzeichnet durch herdförmige Schädigungen von Myelin und Nervenzellen. In aktiven entzündlichen Läsionen im ZNS wird eine Akkumulation von T-Zellen, Plasmazellen, Immunglobulinen und Komplementfaktoren beobachtet (77). Ob die Erkrankung jedoch primär T- oder B- Zell- vermittelt ist, ist noch immer unklar.

Oligoklonale IgG Banden (OCB) im Liquor sind ein typischer Befund bei MS Patienten. OCBs sind allerdings auch häufig bei anderen entzündlichen und infektiösen ZNS-Erkrankungen, wie bei der Neuroborreliose und der Herpes-Simplex-Enzephalitis, nachweisbar. Während die oligoklonalen Immunglobuline bei infektiösen Erkrankungen in der Regel das krankheitsverursachende Antigen erkennen, ist die Mehrheit der Zielantigene der oligoklonalen Immunglobuline von MS-Patienten noch unklar (78, 79).

Während Antikörper gegen MOG und AQP4 mittlerweile zum Ausschluss einer Multiplen Sklerose genutzt werden, ist weiterhin unklar, welche Autoantikörper einen prädikativen oder diagnostischen Wert für die Multiple Sklerose haben. Da sich das entzündliche Geschehen der MS primär auf die weiße Substanz beschränkt, wird bei der Suche nach relevanten Antigenen ein besonderes Augenmerk auf die von Oligodendrozyten gebildeten Proteine der Myelinscheide gelegt.

Gegenstand zahlreicher Studien und Kandidaten als mögliche Zielantigene von Autoantikörpern sind folglich die beiden am häufigsten exprimierten Proteine im Myelin des ZNS: Proteolipidprotein (PLP) und Myelin Basic Protein (MBP) (80).

MBP ist vornehmlich auf der zytosolischen Seite der Oligodendrozytenmembran lokalisiert und bewirkt dort durch elektrostatische Kräfte die Adhäsion der gegenüberliegenden Membranen. So trägt MBP zur Formation der Myelinhauptlinie (Major dense line) bei und ist für die Bildung einer kompakten, mehrschichtigen Myelinscheide unerlässlich (80).

PLP ist ein hydrophobes Membranprotein, und es wird angenommen, dass das Protein ähnlich wie MBP an der Formierung einer kompakten Myelinscheide beteiligt ist (81).

Obwohl in den vergangenen Jahren viele neue Autoantigene im Gehirn entdeckt wurden und kommerzielle, standardisierte Testverfahren für viele dieser Antigene angeboten werden, kommt es immer noch häufig vor, dass die Klinik eines Patienten für eine Antikörper-assoziierte Enzephalitis spricht, obwohl gemäß etablierter Labordiagnostik alle bislang bekannten Autoantigene als Zielantigen ausgeschlossen werden können. Dies lässt erwarten, dass in den kommenden Jahren noch viele bislang unbekannte neuronale und gliale Autoantigene entdeckt und beschrieben werden.

## **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Die spezifischen Fragen, denen ich in meiner experimentellen Arbeit nachgegangen bin, ergaben sich im Wesentlichen aus den Erkenntnissen der Studie von Kreye et al.(82).

Diese hatten gezeigt, dass die alleinige Präsenz von monoklonalen Antikörpern, die gegen die NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors gerichtet sind, ausreichend ist, um eine Herunterregulation von NMDA-Rezeptoren zu bewirken, die sich morphologisch und elektrophysiologisch auf die Neurone auswirkt. Hierfür wurden mittels Durchfluss-Zytometrie CD27 und CD38 positive Antikörper-produzierende Zellen, und CD20 und CD27 positive B-Gedächtniszellen aus dem Liquor von acht Patientinnen mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis isoliert. Die einzelnen isolierten Zellen wurden anschließend wie beschrieben amplifiziert, sequenziert, und die schwere Kette und die zugehörige leichte Kette wurde geklont. Insgesamt wurden aus dem Liquor der acht Patientinnen 170 monoklonale Antikörper gewonnen. Entgegen den Erwartungen zeigten jedoch nur neun Antikörper Affinität zu NR1. Die restlichen 161 Antikörper banden auf Hirnschnitten an andere Strukturen, darunter Epitope im Endothel, auf Gliazellen, auf hippocampalen Körnerzellen, Purkinje-Zellen und Neuropil im Cerebellum und Hippocampus. In der Studie von Kreye et al. wurde nicht weiterverfolgt, gegen welche Epitope die rekombinanten monoklonalen Antikörper gerichtet waren, die also keine Reaktivität gegen NR1 gezeigt hatten.

Daraus ergab sich die Frage, ob, beziehungsweise inwiefern diese unterschiedlichen Antikörper zu der Pathogenese der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis beitragen, und ob sich dadurch die große Bandbreite der Klinik besser erklären lässt.

Folgende Ziele wurden im Rahmen der Dissertation verfolgt:

1. Entwicklung und Etablierung eines Protokolls zur Identifizierung der Zielantigene der rekombinanten monoklonalen Antikörper, welche in der Studie von Kreye et al. aus dem Liquor von Patientinnen mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis gewonnen wurden. Von den insgesamt 170 monoklonalen Antikörpern wurden für diese Arbeit exemplarisch zwei Antikörper ausgewählt, die auf Hirnschnitten ein ähnliches gliales Färbemuster zeigten. Es wurde folgenden Fragen nachgegangen



- Kann mithilfe von immunhistochemischen Doppelfärbungen die Gliazell-Subgruppe identifiziert werden, auf der das Zielepitop vorhanden ist? Lässt sich das Ergebnis in Zellkultur replizieren?
  - Unter welchen Bedingungen sollte die Immunpräzipitation durchgeführt werden, um eine möglichst hohe Konzentration des Zielantigens zu erlangen? Hiermit soll erreicht werden, dass mittels Gelelektrophorese Rückschlüsse über die Größe des Zielantigens gezogen werden können und eine möglichst reine Probe für die Massenspektrometrie erzielt wird.
  - Lässt sich mithilfe dieses Protokolls ein neues Gliazell-Epitop identifizieren?
2. Übertragung des Protokolls zur Identifizierung der Zielantigene der monoklonalen Antikörper auf native Antikörper, welche direkt aus dem Serum von Patienten gewonnen werden. Hier wurde mit Autoantikörpern einer Patientin gearbeitet, deren Klinik für eine autoimmune Enzephalitis sprach, mithilfe der Routine-Diagnostik allerdings nicht das Zielepitop gefunden werden konnte. Es stellten sich die nachstehenden Fragen:
- Liegen im Serum der Patientin hirnreaktive Autoantikörper vor, die die Klinik der Patientin erklären könnten? Gegen welche Strukturen sind sie gerichtet?
  - Eignet sich das Protokoll zur Identifizierung des Zielantigens der monoklonalen Antikörper auch für native Antikörper aus Serum? Lässt sich auch hier ein bislang unbekanntes Epitop demaskieren?

## 2. Material und Methodik

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien, die Arbeitsmethoden und die Arbeitsschritte beschrieben.

### 2.1 Monoklonale Antikörper

Die Gewinnung der monoklonalen Antikörper erfolgte nach Kreye et al. (82).

Die Konzentrationen der monoklonalen Antikörper wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt.

Es wurde mit dem "*Human IgA und IgG Development Kit*" von Mabtech gearbeitet.

Das Protokoll für Konzentrationsbestimmung von humanem IgG und IgA erstreckt sich über zwei Tage. Es wurden 96-Well-Platten verwendet. Diese wurden am ersten Tag mit 2 µg pro ml *MT145-Antikörper* (für IgG-Bestimmung), beziehungsweise mit *MT57-Antikörper* (für IgA-Bestimmung) in PBS beschichtet. In jedes Well wurden 100 µl gegeben und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Am zweiten Tag wurden die Plates zweimal mit 200 µl PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden die Wells mit jeweils 200 µl Inkubations-Puffer für eine Stunde blockiert. Nach der Inkubation wurden die Wells fünfmal mit PBS-*Tween* gewaschen. Es wurden Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:50000 mit den aufgereinigten Antikörpern und humanem Standard-IgG (und -IgA) aus dem Kit erstellt, gelöst in PBS. In jedes Well wurden 100 µl der Proben oder der Standard-Antikörper der Verdünnungsreihen gegeben und bei Raumtemperatur für zwei Stunden stehen gelassen. Danach wurden die Wells erneut fünfmal mit PBS-*Tween* gewaschen, jedes Well mit 100 µl *MT20-ALP-* (bei IgA) beziehungsweise *MT78-ALP-Antikörpern* (bei IgG), 1:1000 verdünnt in Inkubations-Puffer behandelt und eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Wells wieder fünfmal mit PBS-*Tween* gewaschen und mit jeweils 100 µl pNPP befüllt.

Die optische Dichte der Wells wurde in einem ELISA-Lesegerät nach fünf, zehn, fünfzehn und zwanzig Minuten gemessen. Für jede Probe wurde anschließend ein Mittelwert aus den verschiedenen Konzentrationen berechnet.

### Konzentrationen der Antikörper:

Monoklonaler IgG Antikörper A: 322ug/ml

Monoklonaler IgG Antikörper B: 589ug/ml

## 2.2 Immunhistochemie

### Hirnschnitte

Es wurde mit Kryoschnitten aus perfundiertem und nichtperfundiertem Gewebe gearbeitet.

Für die Herstellung der perfundierten Schnitte wurden die Tiere mit 4% *PFA* perfundiert und anschließend das Gehirn entnommen. Um das Gewebe zu entwässern, wurde es anschließend über Nacht zuerst in 15%, und dann in 30% *Sucrose* in PBS gelegt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gehirne anschließend in *2-Methylbutan* (-50°C) eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die nicht perfundierten Schnitte wurden die Gehirne direkt entnommen und sofort in -30°C kaltem *2-Methylbutan* eingefroren und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Vor Anfertigung der Schnitte wurde der Kryostat auf -24° gekühlt. Die Gehirne wurden in *Compound-Medium* im Kryostat fixiert und in 20µm-Schichten geschnitten. Die Schnitte wurden direkt auf Superfrost Slides gegeben und bis zur Färbung bei -80°C aufbewahrt.

### Färbung von Hirnschnitten

Zunächst wurden die Schnitte jeweils dreimal in phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen. Auf die Objektträger wurde anschließend Blockierungslösung geträufelt, sodass die Hirnschnitte vollständig mit der Lösung bedeckt waren. So wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde die Blockierungslösung von den Objektträgern entfernt und direkt danach die Erstantikörper, verdünnt mit Blockierungslösung, insgesamt 200 µl, auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4° Celsius mit den Antikörpern inkubiert. Am Folgetag wurden sie dreimal in PBS gewaschen und sofort mit den Zweitantikörpern, verdünnt mit Blockierungslösung, ebenfalls 200 µl, versehen. Die Schnitte wurden zwei Stunden bei Dunkelheit mit den Zweitantikörpern inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Zuletzt wurde auf die Hirnschnitte als Eindeckmedium *Immu-Mount* gegeben und mit einem Deckglas versehen. So wurden die Schnitte bei 4° Celsius und abgedunkelt gelagert, bis Aufnahmen der Färbungen angefertigt wurden.

Die Konzentration, mit der die Antikörper verwendet wurden, wird im Folgenden aufgelistet.

Erstantikörper:

Anti-GABAa: 1:200

Anti GFAP: 1:1000

Anti-MBP 1:200 (Santa Cruz)

Anti-MBP 1:50 (RDI)

Anti-NeuN 1:500

Monoklonale Antikörper: unverdünnt

Antikörper aus Plasma: 1:10

Zweitantikörper:

Anti-Human-IgA (FITC 488) 1:200

Anti-Human-IgA (Alexa Fluor 594) 1:500

Anti-Human-IgG (FITC 488) 1:200

Anti-Mouse-IgG (Alexa Fluor 594) 1:1000

Anti-Rabbit-IgG (Alexa Fluor 594) 1:1000

Färbung von Astrozyten

Das Protokoll der Astrozytenkultur ist weiter unten im Abschnitt “Immunpräzipitation” dargestellt.

Die Astrozyten wurden für fünf Minuten in *Methanol* bei -20° Celsius gegeben und fixiert. Danach wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Blockierungslösung bei Raumtemperatur versehen. Die Lösung wurde nach einer Stunde entfernt. Direkt im Anschluss wurden die Astrozyten mit den Erstantikörpern versehen. Antikörper wurden ebenfalls mit Blockierungslösung verdünnt, insgesamt 70 µl pro Well, und die Astrozyten damit über Nacht bei 4° Celsius inkubiert. Am Folgetag wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper, gelöst in 5 % normalem Ziegen Serum, 2 % Rinderalbumin in PBS, pro Well 300 µl, bei Dunkelheit und Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser wieder dreimal mit PBS gewaschen und anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur 300 µl *DAPI* (1 µg pro ml) exponiert. Zuletzt wurden die gefärbten Astrozyten dreimal mit PBS, sowie einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und mit *Immu-Mount* auf Objektträger gegeben.

Die Astrozyten wurden bei 4° Celsius und abgedunkelt bis zur Anfertigung der Aufnahmen gelagert.

### Fluoreszenzmikroskopie

Die Färbungen wurden mit einem CKX41 Cell Culture Microscope von Olympus beurteilt und aufgenommen. Konfokale- und Widefield-Aufnahmen wurden mit einem LEICA DMI8 Mikroskop gemacht.

### 2.3 Immunpräzipitation

Nachdem mittels Färbungen von Hirnschnitten und Zellen in Kultur gezeigt wurde, dass die Antikörper Reaktivität aufweisen, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt, um die Zielantigene zu isolieren. Die Immunpräzipitate wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt, um zu sehen, welche Größe das Zielantigen hat und teilweise mithilfe Massenspektrometrie analysiert.

### Gewebeaufbereitung

Direkt vor der Immunpräzipitation wurde das Rattenhirn-Lysat frisch erstellt. Die Ratten wurden mit *Isofluran* betäubt und per Genickbruch getötet. Das Hirn wurde direkt entnommen und in 5 ml Homogenisierungspuffer gegeben. Das so behandelte Gehirn wurde zehnmal bei 900 rpm mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend bei 4°C 10 Minuten lang bei 1.300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und auf Eis gekühlt, während das Pellet in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut bei 4°C 10 Minuten lang bei 2.600 rpm zentrifugiert wurde. Der neu entstandene Überstand wurde mit dem zuerst gewonnenen Überstand vermischt und zusammen eine Stunde bei 60.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde sodann dekantiert und das Pellet wieder in 2 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Da sich bei der Zentrifugation große und schwere Zellkomponenten, wie Bestandteile der Zellmembran oder Zellkerne, zuerst ablagern (Zellfraktionierung), wurden das resuspendierte Pellet und der Überstand separat für die Immunpräzipitation verwendet, um zusätzliche Hinweise über die Lokalisation des jeweiligen Zielantigen zu erhalten.

### Astrozytenkultur

Um eine höhere Konzentration eines möglichen Zielantigen zu erhalten, wurden die Immunpräzipitationen mit den monoklonalen Antikörpern, die auf Hirnschnitten ein astrozytäres Färbemuster zeigten, nicht nur mit Hirnhomogenat, sondern auch mit Astrozyten aus Kultur durchgeführt.

Hierfür wurden die Gehirne von drei 1-Tag-alten Ratten entfernt und in eine Schale mit CMF-HBSS transferiert. Mit einer Pinzette wurden jeweils die beiden Hemisphären abgetrennt und die Hirnhäute entfernt. Die beiden Hemisphären wurden anschließend in einem Tropfen *CMF-HBSS* aufgenommen und darin mit einer Schere kleingeschnitten. Alle Gewebestücke wurden dann in einem 50 ml-Tube mit 12 ml *CMF-HBSS* gepoolt und 1.5 ml 2.5% Trypsin und 1% DNase dazugegeben. Das 50 ml-Tube wurde für fünf Minuten in ein auf 37°C vorgeheiztes Wasserbad gestellt und gelegentlich hin- und hergeschwenkt.

Um das Gewebe weiter zu zerkleinern, wurde es zehnmal in einer 10 ml Pipette auf- und abpipettiert und danach wieder für zehn Minuten in das Wasserbad gegeben. Anschließend wurde das Gewebe mit einer 5 ml-Pipette auf- und abpipettiert, bis keine größeren Gewebestücke mehr erkennbar waren. Die Zellsuspension wurde sodann durch ein Sieb laufen gelassen und die gefilterte Suspension in ein 50 ml-Tube, welches 15 ml Glia-Medium enthielt, geschüttet. Um die Enzyme und die lysierten Zellen zu entfernen, wurde das Tube für 10 Minuten bei 120 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zell-Pellet wurde in 15-20 ml Glia-Medium resuspendiert. In einer Zählkammer wurde die Zelldichte bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von etwa 10<sup>6</sup> Zellen pro 75-cm<sup>2</sup>-Flasche ausgesät und das Volumen in den Flaschen auf 15 ml aufgefüllt. Nach einem Tag wurden die Flaschen geschüttelt, um lose Zellen zu lösen, das alte Medium aspiriert und durch neues Medium ersetzt. Nach zwei Tagen wurden die Zellen erneut mit neuem Medium versorgt. Nach sieben bis zehn Tagen waren die Astrozyten in der Regel konfluent, sodass sie für die Immunpräzipitation verwendet werden konnten.

Direkt vor der Immunpräzipitation wurden die Zell-Flaschen mit kaltem PBS gewaschen, die Zellen abgeschabt, und alles in einem 15 ml-Tube gepoolt. Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 3000rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zell-Pellet in NP40-Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu zerkleinern, wurde die Suspension zehnmal mit einer 30 g-Nadel aspiriert. Um grobe Zellreste zu entfernen, wurde erneut zweimal bei 1000 g und 4°Celsius zentrifugiert. Das entstandene Lysat wurde nun wie das Hirnhomogenat für die weitere Immunpräzipitation verwendet.

### Präzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden zunächst jeweils 100 µg Antikörper mit 40 µl *IgG/IgA-Beads* und 130 µl PBS für eine Stunde bei 24°C und 700 rpm inkubiert. Danach wurden 300 µl resuspendiertes Pellet beziehungsweise Überstand und 200 µl Homogenisierungspuffer zu den Beads gegeben. Alles zusammen wurde über Nacht bei 4°C auf dem Rotor inkubiert. Frischer Protease-Inhibitor und PMFS wurden abends dazugegeben. Am nächsten Tag wurden die Proben für vier Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Beads wurden dreimal mit 500 µl Homogenisierungspuffer gewaschen, erneut für eine Minute bei 2.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wieder entfernt. Zu den Beads wurden 10 µl SDS-Puffer gegeben und alles für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Beads bei -80°C gelagert.

### Gelelektrophorese:

Für die Gelelektrophorese wurden ein 4-prozentiges Sammelgel, sowie ein 10-prozentiges Trenngel angesetzt.

Jede Gel-Tasche wurde mit 40 µl Probe (Beads und SDS-Puffer), beziehungsweise 5 µl *Marker* befüllt und in die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gegeben. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bei 70 Volt laufen gelassen, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und danach 90 Minuten bei 130 Volt.

Die Proteinbanden wurden anschließend mittels Coomassie- und Silberfärbung des Gels visualisiert

### 2.4 Transfektion von HEK-Zellen mit GFAP

Mit einem Zell-basierten Assay wurden die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen und Immunpräzipitation überprüft. Die Transfektion der HEK-Zellen sowie die Aufnahmen der gefärbten Zellen wurden in Kooperation mit Dr. Nina Wenke durchgeführt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

HEK293T-Zellen wurden auf Deckgläser in einer 24-Well-Platte ausgesät und etwa einen Tag belassen, bis die Zellen zu 50% konfluent waren. GFAP DNA (1 µg) wurde mit 3 µg PEI (Polyethylenimine) und 100 µl 150 mM NaCl vermischt und zehn Minuten lang inkubiert. Danach wurde die DNA zu den HEK-Zellen gegeben. 48 Stunden später wurden die HEK-Zellen auf den Deckgläsern für zehn Minuten mit PFA bei Raumtemperatur versehen und so fixiert.

Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und mit 5% Normalem Ziegen Serum, 2% Rinderalbumin und 0,1% Triton X-100 in PBS präinkubiert. Um zu sehen, ob eine Reaktivität der monoklonalen Antikörper gegen GFAP vorliegt, wurden die Antikörper über Nacht bei 4°C zu den fixierten HEK-Zellen gegeben. Zuletzt wurden die Zellen am Folgetag dreimal mit PBS gewaschen und mit dem Zweitantikörper (Anti-Human-IgG, gelöst in Blockierungslösung) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.5 Antikörper aus Plasmapherese-Eluat

Zur Isolierung von humanen IgA Antikörpern wurde das Plasmapherese-Eluat bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Am Tag der Aufreinigung wurde das Plasma auf Eis langsam aufgetaut und schließlich mit einem 0,2 µl dichten Filter von groben Proteinaggregaten befreit.

Zunächst wurden 500 µl *Peptide M/Agarose* auf die Chromatographie-Säule gegeben und mit 5 ml Equilibrierungs- und Waschlösung equilibriert. Anschließend wurden 5 ml des gefilterten Plasmapherese-Eluats auf die Säule gegeben und gewartet, bis alles gemäß der Schwerkraft durch die Säule über die *Peptide M-Beads* gelaufen war. Um die *Peptide M-Beads* und die Säule von ungebundenen Plasmaproteinen zu befreien, wurden nach und nach insgesamt 20 ml Equilibrierungs- und Waschlösung auf die Säule gegeben.

In der Zwischenzeit wurden drei *Eppendorf-Tuben* mit 50 µl Neutralisierungs-Puffer gefüllt.

Zuletzt wurde auf die *Peptide M-Beads* auf der Säule dreimal hintereinander 500 µl Elutions-Puffer gegeben und der Durchfluss direkt in den bereitgestellten *Eppendorf-Tuben* mitsamt dem Neutralisierungs-Puffer aufgefangen.

Der Inhalt der drei Tubes wurde anschließend zusammengelegt und in eine Dialyse-Kassette injiziert. Die Kassette wurde über Nacht bei 4°C auf einem Rotor in 5 l PBS gegeben. Am nächsten Morgen wurde das Eluat aus der Kassette entfernt und bei -20°C gelagert.

Die Konzentration der aufgereinigten Antikörper betrug 4246 µg/ml (Konzentrationsbestimmung wie in Abschnitt 2.1)

Färbungen und Immunpräzipitation wurden wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben durchgeführt.



## 2.6 Western Blot

Es wurde orientierend getestet, ob - und bei welcher Proteingröße – die Antikörper auch an Proteine in elektrophoretisch aufgetrenntem Hirnmaterial binden.

### Gewebeaufbereitung

Es wurde mit Ratten- und Maushirnen gearbeitet. Die Hirne wurden zuerst in einen hypoosmotischen Puffer aufgenommen, und zwar jedes Hirn in ein Puffervolumen, das dem zehnfachen Gewicht des Gewebes entsprach. Anschließend wurde das Gewebe fünfzehnmal bei 900 rpm und dreimal bei 2.000 rpm gedounced. Das Homogenat wurde daraufhin 3 Minuten bei 2.500 rpm und 4° Celsius zentrifugiert und somit in einen Überstand und Pellet aufgeteilt. Der Überstand wurde anschließend für 10 Minuten bei 5.000 rpm und für 30 Minuten bei 80.000rpm zentrifugiert, ebenfalls bei 4° Celsius. Sodann wurde der Überstand dekantiert und aufgefangen und das Pellet mit Homogenisierungspuffer resuspendiert. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -20° Celsius aufbewahrt.

Vor Durchführung der Gelelektrophorese wurden Pellet und Überstand langsam auf Eis aufgetaut. Jeweils 5 µl wurden mit 25 µl destilliertem Wasser und 10 µl 4-fach SDS-Probenpuffer vermischt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95° Celsius erhitzt und anschließend auf Eis wieder abgekühlt.

Die Gelelektrophorese wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

### Blot:

Die *PDVF - Membran* wurde direkt vor dem Gebrauch für zehn Sekunden in Methanol equilibriert und anschließend in Transfer-Puffer gelegt.

Die *Blot-Kammer* wurde mit dem Gel, der *PDVF-Membran* und auf 4°C gekühltem Transfer-Puffer gefüllt und auf Eis bei 4°C bei 120 Volt 90 Minuten laufen gelassen. Anschließend wurde der Proteintransfer auf die Membran mit einer Ponceau-Färbung überprüft. Hierfür wurde die Membran für 5 Minuten in *Ponceau-Rot* gelegt und anschließend 10 Minuten in destilliertem Wasser, sowie in TBST gewaschen.

### Inkubation des Blots mit Antikörpern:

Des Weiteren wurde der Blot für eine Stunde mit *Milch-TBST* geblockt, die Milchlösung anschließend verworfen, und der Erstantikörper, gelöst in Milch-TBST, hinzugefügt. Der Blot wurde über Nacht bei 4°C auf einem Rotor mit dem Erst-Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot mit TBST gewaschen und mit dem HRP-gelabelten Zweitantikörper, gelöst in Milch-TBST, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Blot erneut mit TBST gewaschen.

Zuletzt wurde auf die Membran 1 ml *ECL- Arbeitslösung* geträufelt und nach zwei Minuten mit einer *ECL-Kamera* entwickelt.

### 2.7 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse des Immunpräzipitats wurde in Kooperation mit Dr. Caroline May (Ruhr Universität Bochum, Immune Proteomics) durchgeführt.

Die Spektrometrie und Auswertung der Daten erfolgte nach den Protokollen von Plum et al. und Molina et al. (83, 84). Nur die Gradientenlänge wurde modifiziert und betrug hier drei Stunden.

Die zelluläre Lokalisierung der am häufigsten identifizierten Proteine wurde auf der Uniprot Datenbank ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) recherchiert und mit den eigenen immunhistochemischen Färbungen verglichen.

## 2.8 Puffer und Lösungen

<p><b>Blockierungslösung</b>          PBS          0,1 % Triton          5 % normales Ziegenserum          2 % BSA</p>	<p><b>Elutionspuffer pH 2.7</b>          0,1 M Natrium-Citrat</p>
<p><b>Equilibrierungs/Waschpuffer          pH 7.2</b>          10 mM Natrium-Phosphat          150 mM Natrium-Chlorid</p>	<p><b>Glia-Medium</b>          Minimal Essential Medium (MEM)          0,6% wt/vol Glucose          100 µl Penicillin          100 mg Streptomycin          10% (vol/vol) Pferde Serum</p>
<p><b>High Salt Waschpuffer</b>          50 mM Tris (pH 7,5)          10 mM KOAc (Kaliumacetat)          2 mM Mg (OAc) (Magnesiumacetat)          200 mM KCl          1% NP40          1 mM DTT</p>	<p><b>Homogenisierungspuffer</b>          PBS          1:1000 Protease Inhibitor          1:200 PMSF</p>
<p><b>Hypoosmotischer Puffer</b>          4.5 ml Aqua dest          0.5 ml PBS          5 µl Proteaseinhibitor          25 µl PMSF</p>	<p><b>Inkubations-Puffer:</b>          PBS-Tween          0.1 % BSA</p>
<p><b>Laufpuffer/Elektrophoresepuffer (10-fach - Stock)</b>          144 g Glyzin          30.2 g Tris-Base          10 g SDS          0.9 l Aqua dest.</p>	<p><b>5% Milch in TBST</b>          10 g Milchpulver          190 ml TBST</p>
<p><b>Neutralisierung-Puffer pH 8</b>          1 M TRIS</p>	<p><b>NP40-Puffer:</b>          50 mM Tris          100 mM NaCl          0,1% NP40          Proteaseinhibitor</p>

<p><b>PBS-Tween:</b> 0.05 % Tween 20 PBS</p>	<p><b>Ponceau-Rot (0.1%)</b> 100 mg Ponceau-Rot 5 ml Essigsäure 95 ml Aqua dest.</p>
<p><b>Probenpuffer (4-fach)</b> 4 ml Glycerol 4,6 ml SDS (20%) 1,6 ml Tris (1M, pH 8) 500 mg DTT 10 mg Bromphenolblau</p>	<p><b>Sammelgelpuffer (pH 6,8)</b> 0,5 M TRIS 0,4% (w/v) SDS</p>
<p><b>4% Sammelgel</b> 3,7 ml H<sub>2</sub>O 1,5 ml Sammelgel-Puffer 1 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30 µl TEMED 30 µl APS</p>	<p><b>TBS (10-fach) pH 7.6</b> 4.24 g Tris-Base 26 g Tris-HCL 80 g Natriumchlorid 900 ml Aqua dest.</p>
<p><b>TBST</b> 200 ml 10-fach TBS 2 ml Tween-20 1800 ml Aqua dest.</p>	<p><b>Transferpuffer (10-fach-Stock)</b> 144 g Glyzin 30.2 g Tris-Base 0.9 l Aqua dest.</p>
<p><b>Transferpuffer (einfach)</b> 200 ml 10-fach Transferpuffer 200 ml Methanol 1.600 ml Aqua dest.</p>	<p><b>Trenngelpuffer (pH 8,8)</b> 1,5 M TRIS 0,4 % (w/v) SDS</p>
<p><b>10% Trenngel</b> 2 ml Aqua dest. 2 ml Trenngel-Puffer 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid 30 µl TEMED 30 µl APS</p>	

## 2.9 Materialien und Geräte

Es kamen folgende Materialien und Geräte zum Einsatz:

### Chemikalien

10-fach TBS	Carl Roth, Karlsruhe
2-Methylbutan	Carl Roth, Karlsruhe
30% Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Anti-GABA <sub>A</sub>	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX
Anti-GFAP	MilliporeSigma, Burlington, MA
Anti-Hase-IgG (Alexa Fluor 594)	Dianova, Hamburg
Anti-Human-IgA (FITC 488)	Dianova, Hamburg
Anti-Human-IgA (Alexa Fluor 594)	Dianova, Hamburg
Anti-Human-IgG (FITC 488)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Anti-Maus-IgG (Alexa Fluor 594)	Li-Cor, Lincoln, NE
Anti-MBP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX
Anti-MBP	RDI, San Jose, CA
Anti-NeuN	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
APS	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
CMF-HBSS	Biochrom, Berlin
DAPI	Carl Roth, Karlsruhe
DNase	Sigma Aldrich, St. Louis, MO

DTT	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Alfa Aesar, Ward Hill, MA
Glucose (0.6% wt/vol)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glyzin	Carl Roth, Karlsruhe
HRP-gelabelte Zweit-Antikörper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Immu-Mount	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Isofluran	Abbvie, North Chicago, IL
Marker/PageRuler Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Minimal Essential Medium (MEM)	Lonza, Basel, Schweiz
Natrium-Chlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-Citrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natrium-Phosphat	Bernd Kraft, Duisburg
Normales Ziegen Serum	Abcam, Cambridge, UK
NP40	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Peptide M/Agarose	InvivoGen, San Diego, CA
Pferdeserum	Abcam, Cambridge, UK
PMSF	AppliChem, Darmstadt
PEI (Polyethylenimine)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

Ponceau-Rot	Carl Roth, Karlsruhe
Proteaseinhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Sucrose	Alfa Aesar, Ward Hill, MA
TEMED	Bio Rad, Hercules, CA
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-HCL	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Chemsolute, Th. Geyer, Renningen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

### **Kits**

ECL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
PageBlueProteinStaining Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Silver Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA

### **Utensilien**

Spritzenfilter 0,2 µm	Carl Roth, Karlsruhe
24-Well-Platten	Greiner Bio-One, Kremsmünster
96-Well Platten	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Dialyse-Kassette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Human IgA und IgG Development Kit	Mabtech, Stockholm

PDVF - Membran	Bio Rad, Hercules, CA
Säule / Chromatography Columns	Bio Rad, Hercules, CA
Superfrost Slides	Fisher Scientific, Waltham, MA

### **Geräte**

Blot Kammer	Bio Rad, Hercules, CA
Cell Culture Microscope Olympus CKX41	Olympus, Tokio
Elektrophoresekammer	Bio Rad, Hercules, CA
ELISA-Lesegerät	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Konfokales Mikroskop DMI8	Leica, Wetzlar
Rotor	Neo-Lab, Heidelberg
Tischzentrifuge (Heraeus Fresco 21)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Wasserbad	Lauda-Brinkmann, Delran, NJ
Zentrifuge (Heraeus Megafuge 16R)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA



## 3. Ergebnisse

### 3.1 Monoklonale Antikörper

Die hier untersuchten zwei monoklonalen Antikörper wurden von Kreye et al. (82) aus dem Liquor von zwei Patientinnen (im Folgenden Patientin A und Patientin B genannt) mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis gewonnen. Sie wurden als exemplarische Antikörper für diese Arbeit ausgewählt, weil beide auf Hirnschnitten ein gliales Färbemuster aufwiesen (Abb. 1), sodass sich die Suche nach dem Zielantigen auf gliale Epitope beschränkte.

#### 3.1.1 Patientinnen

##### Patientin A (Pat. ID 003)

Patientin A war zum Zeitpunkt der Diagnose der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis 18 Jahre alt. Neben der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis wurde ein Ovarialkarzinom diagnostiziert. Eine Woche nach Symptombeginn wurde eine Lumbalpunktion durchgeführt. Der Titer der NMDA-Rezeptor-Antikörper betrug 1:100, es wurden oligoklonale Banden (OCB) festgestellt, die Zellzahl betrug 56/ $\mu$ l und der Eiweißgehalt betrug 225 mg/l. Ein Teil des Liquors wurde für spätere Forschungszwecke eingefroren. Die Patientin wurde auf der Intensivstation mit Plasmapherese behandelt.

Etwa ein Jahr später wurde im Rahmen der Studie von Kreye et al. die Liquorprobe aufgetaut. Aus dem Liquor der Patientin konnten 47 monoklonale Antikörper gewonnen werden, darunter Antikörper A. Zwei monoklonale Antikörper zeigten Reaktivität gegen NR1.

##### Patientin B (Pat. ID 011)

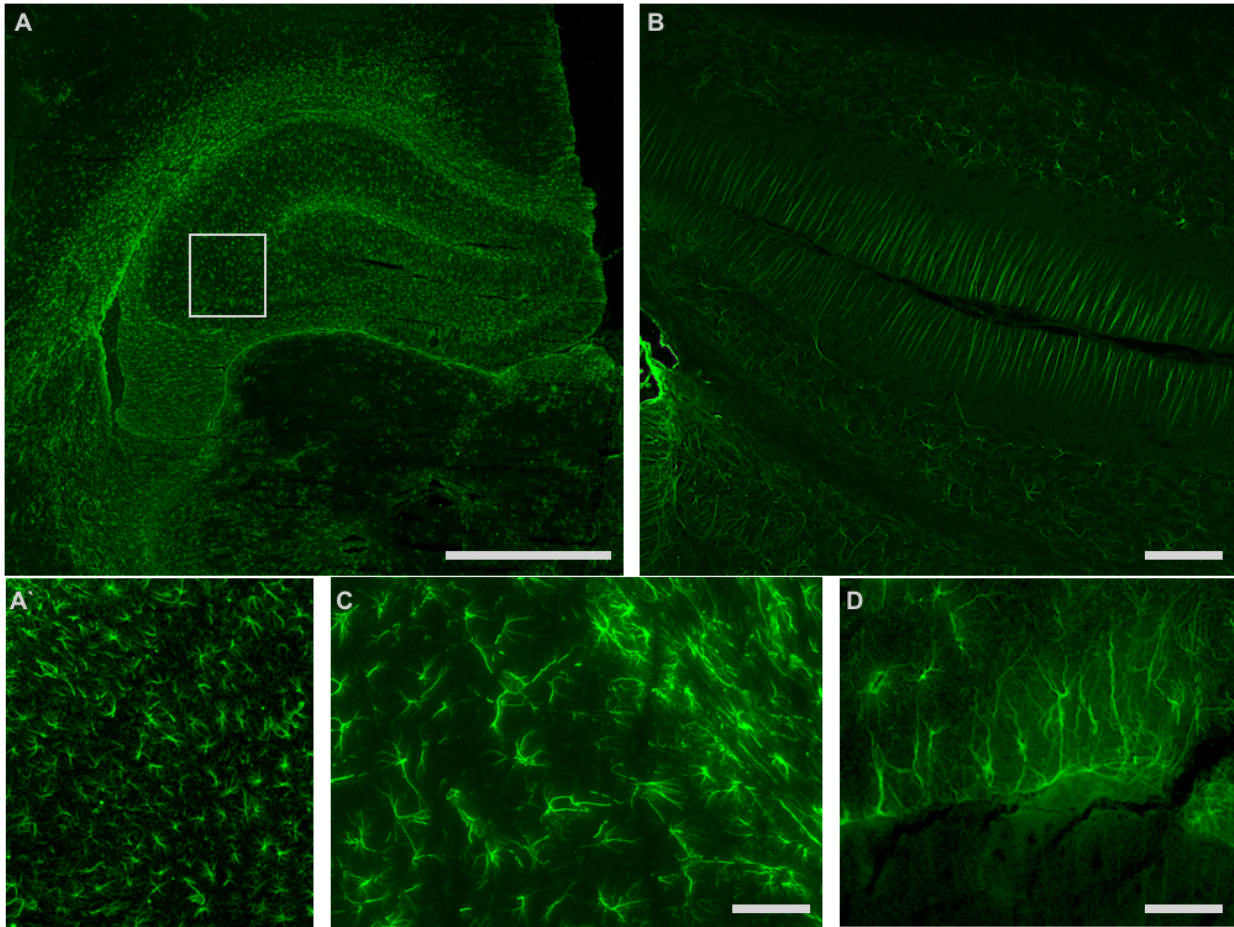
Die Patientin war zum Zeitpunkt der Diagnose der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis 34 Jahre alt; zusätzlich zu der Enzephalitis wurde ein Ovarialteratom gefunden. Die Lumbalpunktion erfolgte zwei Wochen nach Auftreten der Erstsymptome. Der NMDA-Rezeptor-Antikörpertiter betrug 1:32. Des Weiteren wurden OCBs, eine Zellzahl von 31/ $\mu$ l und ein Eiweißgehalt von 365 mg/l festgestellt. Die Therapie der Patientin bestand aus der Gabe von Methylprednisolon und Immunadsorption.

Die Liquorprobe wurde für vier Monate eingefroren, bevor sie zur weiteren Verwendung aufgetaut und reanalysiert wurde. Kreye et al. gewannen schließlich 18 monoklonale Antikörper, darunter Antikörper B.

### 3.1.2 Immunhistochemie

Beide Antikörper wiesen auf Hirnschnitten ein astrozytäres Färbemuster auf (Abb. 1). Der Befund wurde durch Färbungen von Astrozyten in Kultur bestätigt (Abb. 3). Mittels Doppelfärbungen konnte eine exakte Kolokalisation mit GFAP nachgewiesen werden (Abb. 2, Abb.3).

#### **Abbildung 1: Färbung von Hirnschnitten (Ratte) mit monoklonalen humanen Antikörpern**



Maßstabstreifen: A=1mm, B=100 µm, C+D=50 µm, PFA-perfundierte Ratte (Koronarschnitt)

**A:** Hippocampus, Antikörper A

**A':** Vergrößerter Bildausschnitt aus A

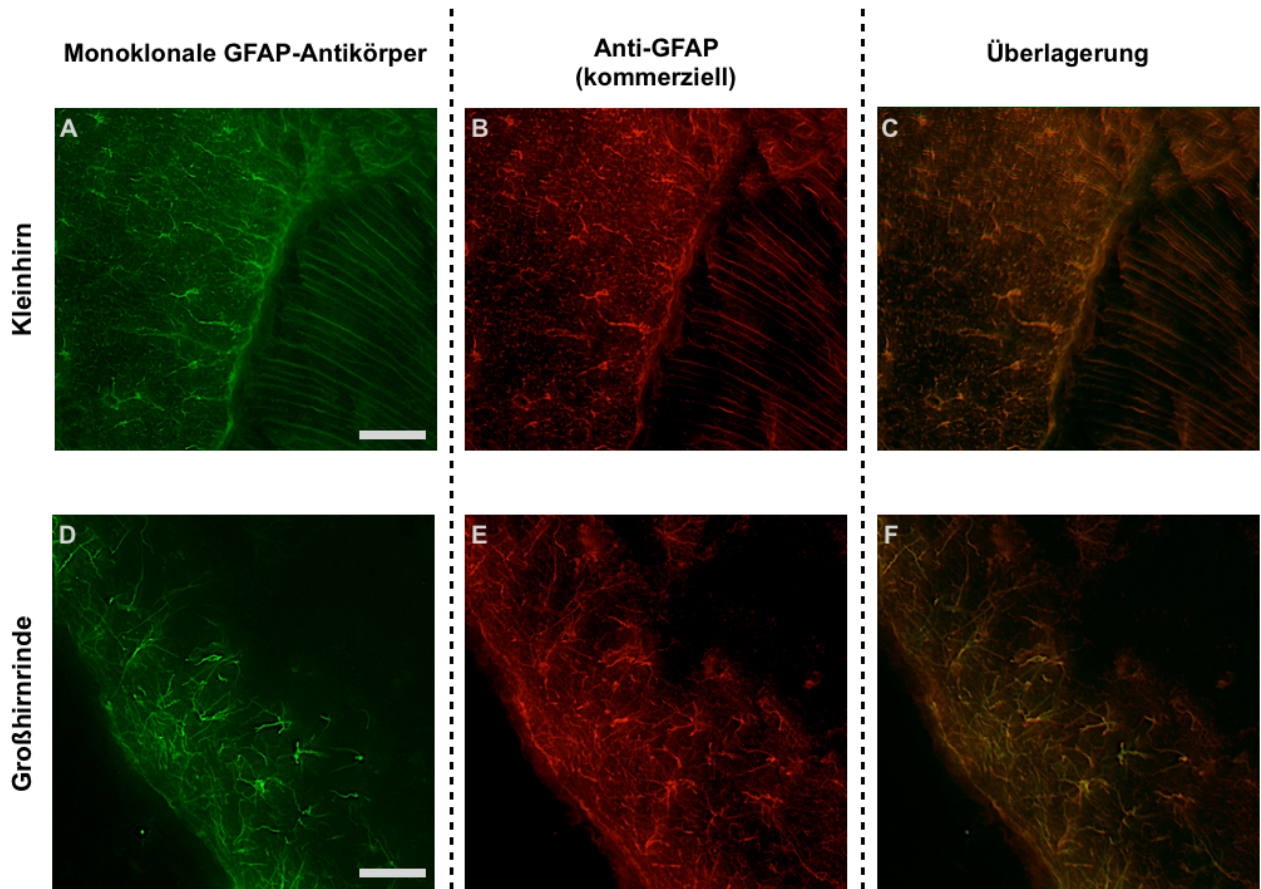
**B:** Kleinhirn, Antikörper A

**C:** Großhirn, Antikörper A

**D:** Kleinhirn, Antikörper B

Es zeigt sich eine Färbung von sternförmigen Zellen mitsamt ihrer Fortsätze in Großhirn, Hippocampus und Kleinhirn.

**Abbildung 2: Doppelfärbung von Hirnschnitten (Ratte) mit monoklonalen Antikörpern**



Maßstableisten: A+D= 50  $\mu$ m, PFA-perfundierte Ratte (Koronarschnitt)

A: Antikörper B

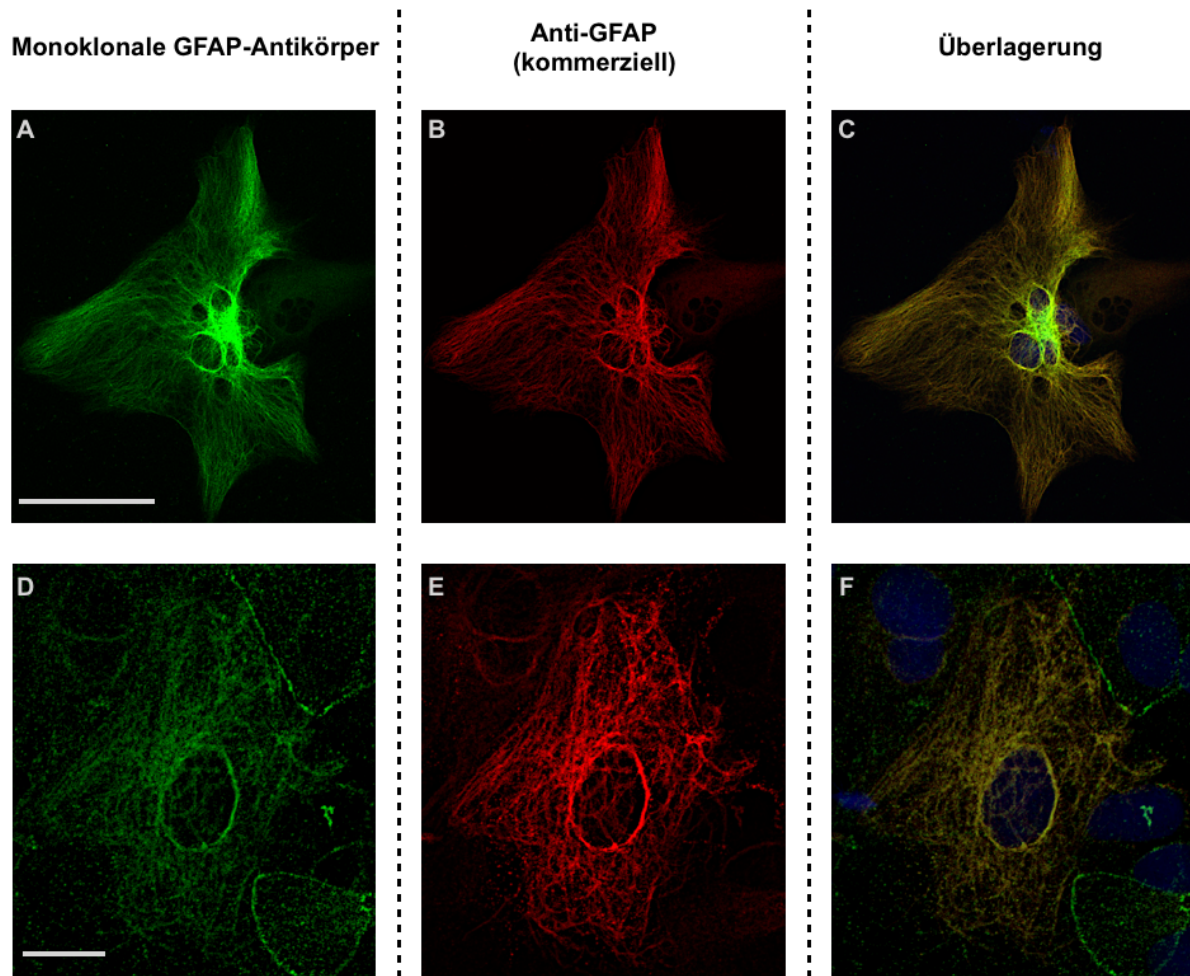
B, E: Rabbit Anti-GFAP 1:1000

D: Antikörper A

C, F: Überlagerung monoklonaler GFAP-Autoantikörper + Kommerzieller GFAP-Antikörper

Die Aufnahmen A und D zeigen, dass die monoklonalen Antikörper an typische sternförmige Astrozyten in Kleinhirn und Großhirnrinde binden. In den Abbildungen C und F ist erkenntlich, dass eine exakte Kolokalisation mit dem kommerziellen GFAP-Antikörper vorliegt.

### Abbildung 3: Färbung von kultivierten Astrozyten mit monoklonalen Antikörpern



Maßstableisten: A=10 µm, D=2 µm

A: Antikörper B

B, E: Rabbit Anti-GFAP 1:1000

D: Antikörper A

C, F: Überlagerung monoklonaler GFAP-Autoantikörper + Kommerzieller GFAP-Antikörper

Die Aufnahmen A und D zeigen, dass beide monoklonalen Antikörper an ein zytoskelettales Protein im Cytoplasma der Astrozyten binden. Nach Abbildungen C und F liegt eine exakte Kolokalisation der monoklonalen Antikörper und des kommerziellen GFAP-Antikörpers vor.

### 3.1.3 Immunpräzipitation, Gelelektrophorese

Nachdem mittels immunhistochemischer Färbungen gezeigt wurde, dass das Zielepitop der beiden monoklonalen Antikörper in Astrozyten lokalisiert ist, wurden nachfolgend Immunpräzipitationen durchgeführt, um die Größe des Zielantigens zu identifizieren.

Die Präzipitate wurden in einem Gel aufgetragen und elektrophoretisch nach Proteingröße aufgetrennt. Hierbei wurde nach dem von U.K. Laemmli eingeführten Puffersystem vorgegangen (85). Zuerst wurden die Proteinproben mit SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) und DTT (Dithiothreitol) vermischt und erhitzt. SDS bewirkt durch Spaltung der Wasserstoffbrücken die Aufhebung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine, DTT löst durch Aufbrechen der Disulfidbrückenbindungen die Quartärstruktur auf, sodass die Eigenschaften der Zielantigene auf die Größe beschränkt werden. Anschließend wurden die Proben in einem engporigen Trenngel gemäß dem Molekulargewicht separiert. Da die Größe des Zielantigens unbekannt war, wurde ein Trenngel mit einer mittelhohen Acrylamid-Konzentration (10%) gewählt, das eine effektive Auftrennung von Proteinen im einem relativ breiten Spektrum von 30 bis 120 kDa ermöglicht.

Ziel war es, zu kontrollieren, ob tatsächlich Protein an die jeweiligen Antikörper auf den Beads gebunden hatte, und anhand der Banden Rückschlüsse über die Größe des Zielepitops zu ziehen. Der Proteinnachweis in den Gelen erfolgte mittels Silber- oder Commassie-Färbung.

Bei den Gel-Färbungen wurde erkennbar, dass nicht nur ein Zielantigen aus dem Hirnhomogenat oder Zell-Lysat isoliert wurde, sondern dass begleitend eine Vielzahl weiterer Proteine mitgezogen wurden. Aus diesem Befund ergab sich die Frage, wie sich genauere Ergebnisse durch die Immunpräzipitation erzielen ließen.

#### **1. Auswahl eines Waschpuffers**

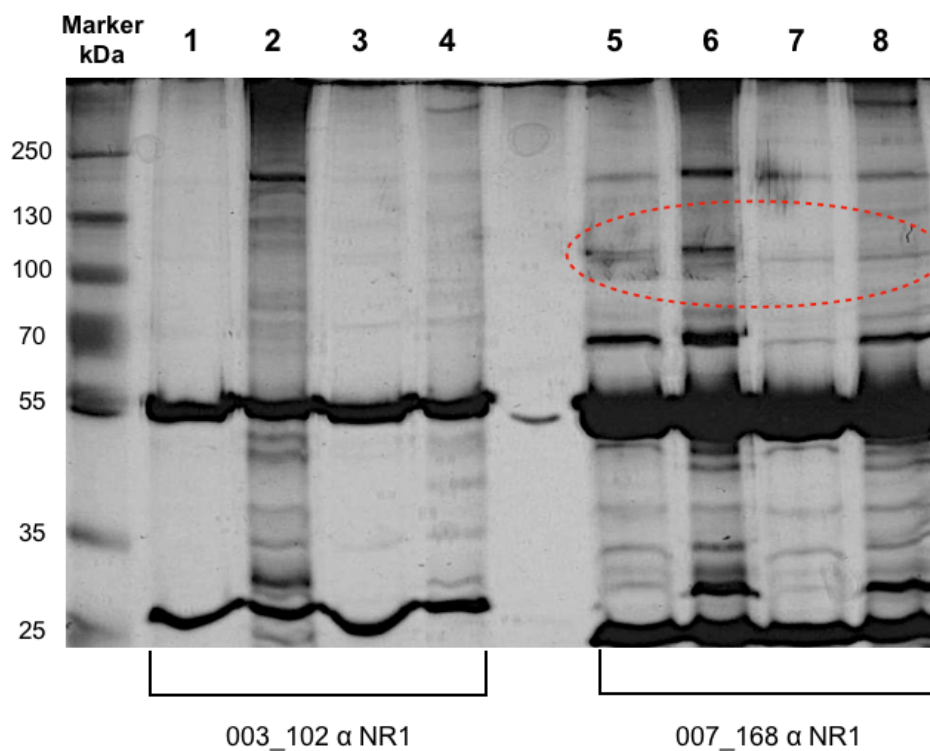
Nachdem die an Antikörper gekoppelten Beads über Nacht mit Hirn- beziehungsweise Astrozytenlysat inkubiert wurden, wurden die Beads dreimal mit 500 µl Homogenisierungspuffer gewaschen. Somit sollten die Beads von allen Proteinen des Lysats befreit werden, die nicht von den Antikörpern erkannt wurden.

Zunächst sollte herausgefunden werden, ob die Menge der unspezifisch gebundenen Proteine durch die Wahl eines anderen Waschpuffers reduziert werden kann und inwiefern der Puffer wiederum die Konzentration des Zielantigens beeinflusst. Hierfür wurde in einem Vorversuch

eine Immunpräzipitation mit zwei monoklonalen Antikörpern durchgeführt, deren Zielantigen, nämlich die NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors, bereits durch Kreye et al. mittels eines Zellbasierten Assays identifiziert wurde (Abb. 4) (82).

Nach der Inkubation der Antikörper mit Hirnlysat wurden die Beads entweder mit Homogenisierungspuffer oder mit einem hochsalzigen Puffer gewaschen. Homogenisierungspuffer besteht aus PBS und Protease-Inhibitoren und ist somit im Gegensatz zu dem hochsalzigen Puffer ein schwaches Detergens.

**Abbildung 4: Gelelektrophorese mit Gegenüberstellung verschiedener Waschpuffer**



- 1 + 5: Pellet, gewaschen mit High-Salt Waschpuffer
- 2 + 6: Pellet, gewaschen mit Homogenisierungspuffer
- 3 + 7: Überstand, gewaschen mit High-Salt Waschpuffer
- 4 + 8: Überstand, gewaschen mit Homogenisierungspuffer

In der Silberfärbung des Gels fällt auf, dass Spalten 2, 4, 6 und 8, deren Beads mit Homogenisierungspuffer gewaschen wurden, dunkler sind als die restlichen Spalten. Die Auswahl

des Puffers scheint also die Gesamtmenge an gebundenen Proteinen zu beeinflussen. Die prägnanten Proteinbanden bei 50 kDa und 25 kDa, welche die schwere und leichte Kette der Immunglobuline darstellen, sind dagegen in allen Spalten vergleichbar. Die Kopplung der Antikörper an die Beads ist also so stabil, dass sie auch bei mehrfachen Waschvorgängen mit hochsalzigem Puffer nicht beeinflusst wird.

Es zeigen sich in Spalten **5 - 8** Proteinbanden auf der Höhe von etwa 120 kDa, welche dem Zielantigen NR1 entsprechen. Erwartungsgemäß sind die Banden deutlicher ausgeprägt bei den Beads, die mit der resuspendierten Pellet - Lysatfraktion inkubiert wurden (Spalten **5,6**), denn Membranbestandteile wie beispielsweise Rezeptoren sedimentieren bei der Zentrifugation rasch und aggregieren als Pellet. Es bleibt unklar, weshalb Antikörper 003\_102, der auf transfizierten HEK-Zellen an NR1 gebunden hatte, bei dieser Präzipitation scheinbar nur geringfügig das Protein gebunden hat.

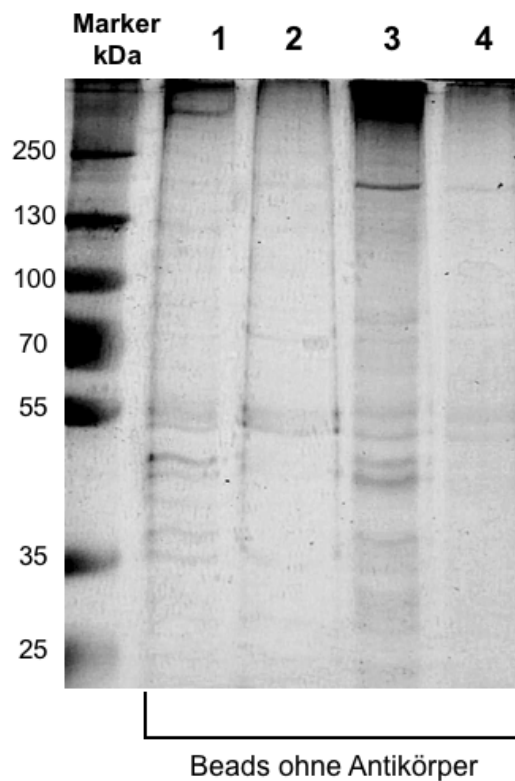
Vergleicht man die einzelnen Proteinbanden in Spalten **5 – 8**, so sieht man, dass die Banden der Proben, die mit Homogenisierungspuffer gewaschen wurden, insgesamt prominenter sind, jedoch scheint die Art des Waschpuffers nicht die tatsächliche Anzahl der Banden zu beeinflussen. Neben NR1 wurden also in allen Proben noch weitere Proteine mitgezogen.

Das Ziel, mittels stringenterer Waschbedingungen die Anzahl der Proteinbanden zu reduzieren, um die Suche nach dem Zielantigen zu erleichtern, konnte nicht erreicht werden. Wie dieses Gel und auch die nachfolgenden Gele zeigen, verringern sich mit dem hochsalzigen Puffer nicht nur unspezifisch gebundene Proteine, sondern auch die Konzentration des jeweiligen Zielantigens, in diesem Fall NR1. Aus diesem Grund wurde bei der Identifizierung des Zielantigens der Plasma-Antikörper ausschließlich mit Homogenisierungspuffer gearbeitet.

## **2. Unspezifische Bindung von Proteinen an Beads**

Um zu sehen, ob Proteine unspezifisch an die IgG-Beads binden, wurde eine Immunpräzipitation mit "leeren" Beads durchgeführt. Das heißt, die Beads wurden vor der Inkubation mit dem Hirnlysat nicht mit Antikörpern versehen. Die anderen Schritte der Präzipitation wurden wie im Protokoll beschrieben durchgeführt und die Proteinbanden anschließend mit Silber-Färbung des Gels visualisiert (Abb. 5).

### Abbildung 5: Gelelektrophorese zur Darstellung unspezifischer Proteinbindung an Beads



- 1: Pellet, gewaschen mit Homogenisierungspuffer
- 2: Pellet, gewaschen mit High-Salt Puffer
- 3: Überstand, gewaschen mit Homogenisierungspuffer
- 4: Überstand, gewaschen mit High-Salt Puffer

In der Silberfärbung des Gels zeigen sich in allen Spalten Proteinbanden, sodass eindeutig eine unspezifische Bindung von Protein an die Beads erfolgt, die zu einer Maskierung des gesuchten Zielantigens führen kann. Die Beads, die nur mit Homogenisierungspuffer gewaschen wurden, binden mehr Proteine als diejenigen, die mit dem aggressiveren High-Salt Puffer gewaschen wurden.

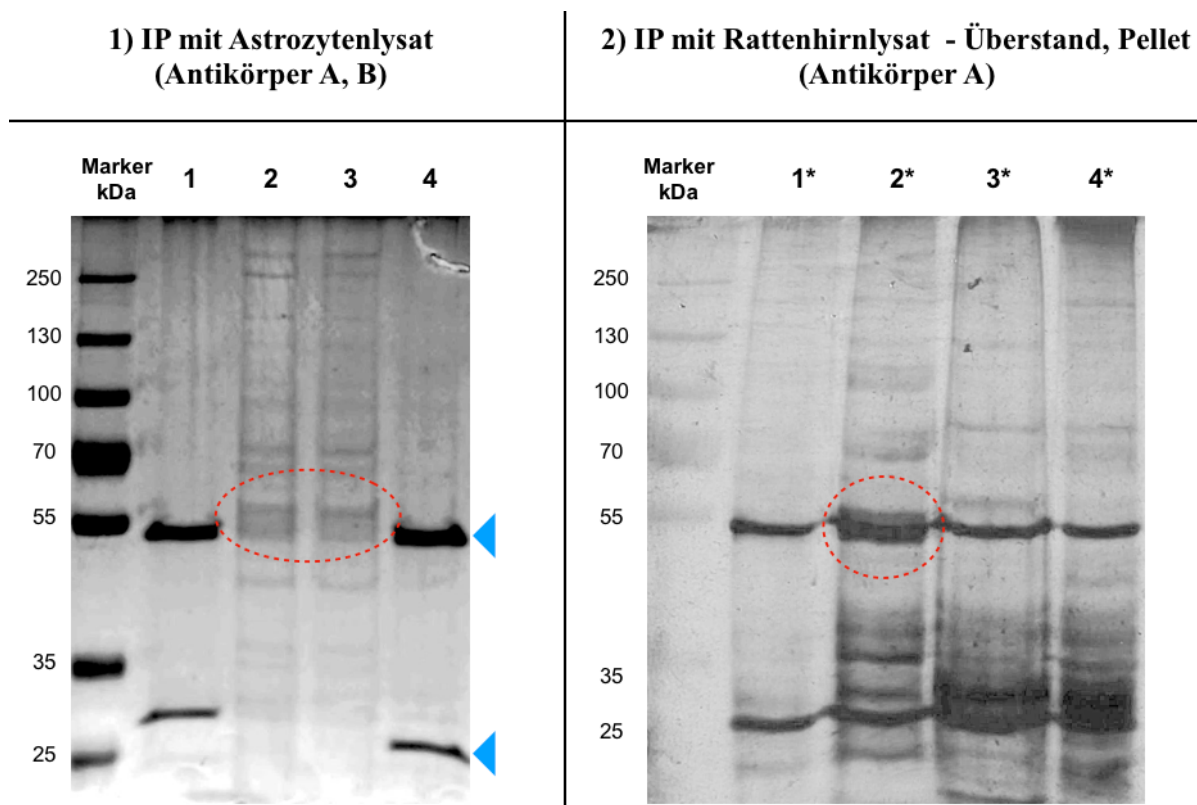
Um die Proteine, die eine Affinität zu den Beads aufweisen, zu reduzieren, wurde das Protokoll der Immunpräzipitation um folgenden Schritt erweitert: Bevor die an Antikörper gekoppelten Beads zu dem Hirnlysat gegeben wurden, wurde das Lysat mit 20  $\mu$ l IgG Beads bei 4°C auf einem Rotor vorinkubiert. Anschließend wurde das Gemisch nach einer Stunde bei 1300 rpm zentrifugiert, um die Beads von dem Lysat zu trennen. Das Lysat wurde dekantiert und für die weitere Präzipitation aufgefangen. Die Beads wurden mitsamt den unspezifisch gebundenen Proteinen verworfen.



### 3. Auswahl eines geeigneten Lysats

Die beiden monoklonalen Antikörper A und B wiesen in Färbungen von Hirnschnitten eine exakte Kolokalisation mit dem astrozytären Protein GFAP auf (Abb. 2). Dieser Befund konnte zusätzlich mittels Färbungen von Astrozyten in Kultur (Abb. 3) bestätigt werden. Folglich scheint die Konzentration des Zielantigens in Astrozyten am höchsten zu sein. Aus diesem Grund wurden mit den beiden monoklonalen Antikörpern Immunpräzipitationen mit Astrozytenlysat durchgeführt und mit Präzipitationen mit Rattenhirnlysat verglichen (Abb. 6).

**Abbildung 6: Gelelektrophorese zum Vergleich unterschiedlicher Lysate**



- 1: 5 µl Antikörper B (Überstand)
- 2: Präzipitat Antikörper B, Homogen.-Puffer
- 3: Präzipitat Antikörper A, Homogen.-Puffer
- 4: 5 µl Antikörper A (Überstand)

- 1\*: Antikörper A, Überstand, High-Salt Puffer
- 2\*: Antikörper A, Überstand, Homogen.-Puffer
- 3\*: Antikörper A, Pellet, High-Salt Puffer
- 4\*: Antikörper A, Pellet, Homogen.-Puffer

### **Gel 1 (Commassie-Färbung)**

**2 + 3:** Das erste Gel stellt dar, welche Proteine durch die Immunpräzipitation mit den beiden monoklonalen Antikörpern A und B isoliert wurden. Die Präzipitation wurde mit Astrozytenlysat durchgeführt. Es zeigen sich in beiden Spalten prominente Banden zwischen 50 und 55 kDa, welche einen Hinweis auf GFAP (49,88 kDa) als Zielepitop geben.

**1 + 4 Negativkontrolle:** Die blauen Pfeile weisen auf die schwere (50 kDa) und leichte (25 kDa) Kette der Immunglobuline. Die monoklonalen Antikörper sind im Überstand der transfizierten HEK-Zellen gelöst.

Da davon ausgegangen wurde, dass in diesem Überstand auch weitere unspezifische Proteine aus der Zellkultur vorliegen, wurde in den Spalten 1 und 4 der Überstand mitsamt den Antikörpern als Negativkontrolle aufgetragen. Neben den Banden, die die Ketten der Immunglobuline abbilden, waren keine weiteren Banden sichtbar. So stellte sich heraus, dass die Überstände sehr rein waren.

### **Gel 2 (Silberfärbung)**

Das Gel, welches nach der Immunpräzipitation mit Antikörper B durchgeführt wurde, sah identisch aus, sodass hier repräsentativ nur das Gel mit Antikörper A abgebildet ist.

**1\*:** In Spalte 1\* bestätigt sich der Befund, dass mit dem hochsalzigen Waschpuffer die Konzentration von relevanten Antigenen stark reduziert wird. Es sind keine markanten Banden zu erkennen.

**2\*:** Analog zu Spalten 2 und 3 des anderen Gels hebt sich auch hier eine Bande bei 50 bis 55 kDa hervor. Wie die Färbungen der kultivierten Astrozyten mit Antikörper A und B gezeigt haben, ist das Zielantigen, in diesem Fall GFAP, ein zytoplasmatisches Protein. Es ist demnach schlüssig, dass die Antikörper das Zielantigen in besonders hoher Konzentration im Überstand des Lysats erkannt hatten.

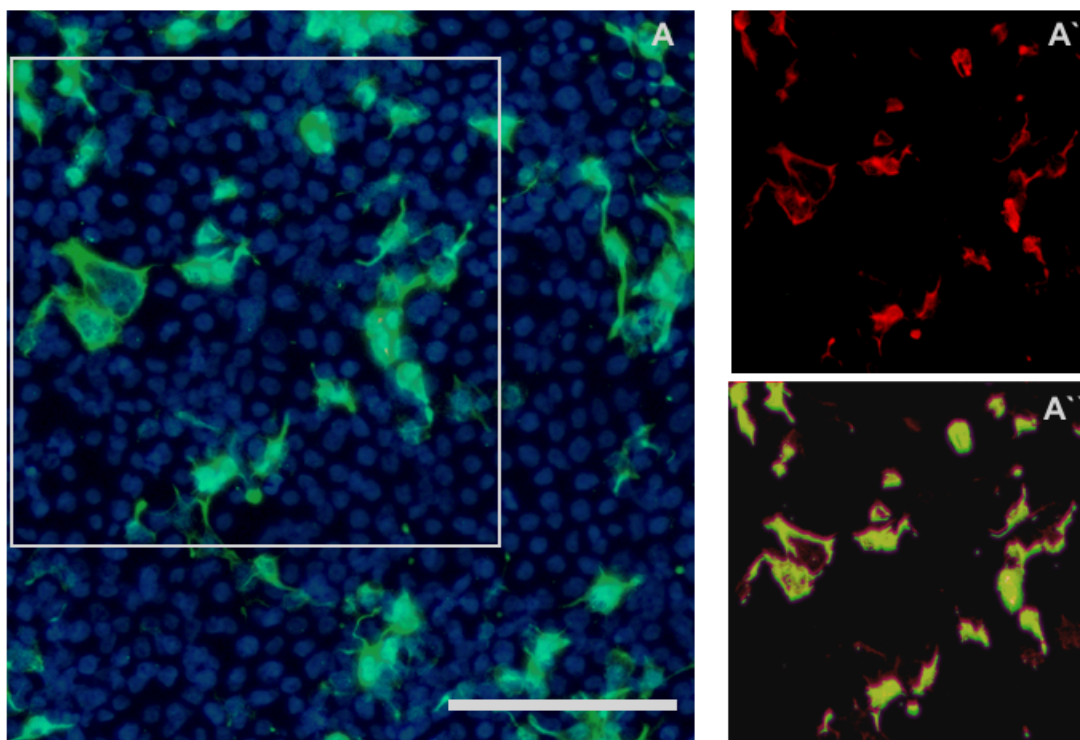
**3\* + 4\*:** In diesen beiden Spalten sieht man neben den Banden, die die schwere und leichte Kette der Immunglobuline darstellen, zahlreiche andere Proteinbanden, die aus dem Pellet des Hirnhomogenats mitgezogen wurden. Besonders im Bereich zwischen 25 bis 40 kDa fällt eine Dunkelfärbung des Gels auf. Da eine ähnliche Häufung von Banden nicht bei der Präzipitation mit Astrozytenlysat aufgetreten ist und das Antigen aufgrund des Färbemusters im Zytoplasma und somit im Überstand des Lysats erwartet wird, wurden diese Proteine zwischen 25 - 40 kDa als unspezifische Bindungen eingestuft.

Da sowohl die immunhistochemischen Färbungen als auch die Ergebnisse der Immunpräzipitation schlüssige Hinweise darauf gaben, dass GFAP das Zielantigen der beiden monoklonalen Antikörper ist, wurde auf eine massenspektrometrische Analyse der Präzipitate verzichtet und direkt ein Zell-basierter Assay zur Überprüfung der Ergebnisse durchgeführt.

### 3.1.4 Zell-basierter Assay

Mittels eines Zell-basierten Assays wurde der Verdacht bestätigt, dass es sich bei dem Zielantigen der monoklonalen Antikörper um GFAP handelt. HEK-Zellen wurden mit GFAP gemäß Standard-Protokoll transfiziert (86). Es zeigte sich eine deutliche Bindung der monoklonalen Antikörper an die transfizierten Zellen (Antikörper B, Abb. 7). Ein unabhängiges Labor bestätigte den Befund (Prof. Dr. med. Winfried Stöcker, Lübeck).

### Abbildung 7: Färbung von transfizierten HEK-Zellen mit monoklonalen Antikörpern



Maßstableiste: A=0,1 mm

A: Antikörper B, DAPI

A': Bildausschnitt aus A, Rabbit Anti-GFAP 1:1000

A'': Bildausschnitt aus A, Überlagerung Anti-GFAP und Antikörper B

## **3.2 Antikörper aus Plasmapherese-Eluat**

### 3.2.1 Patientin

Die Antikörper stammen aus dem Plasmapherese-Eluat einer 54-jährigen Patientin, die seit zwanzig Jahren an Multipler Sklerose litt. Nachdem bei der Patientin subakut ein rapider Verlust der kognitiven Fähigkeiten mit Demenz und Echolalie eintrat, wurde sie mit Verdacht auf einen neuen Krankheitsschub und zur Reevaluation ihres Krankheitsverlaufs in der Universitätsklinik vorgestellt.

Neben den kognitiven Symptomen wurde ein unsicheres Gangbild, eine Sehstörung mit Doppelbildern und eine Koordinationsstörung der Extremitäten festgestellt, und im MRT waren neue Läsionen sichtbar. Die Patientin erhielt eine Therapie mit Mitoxantron und Beta-1a Interferon. Während die motorischen Störungen durch die Therapie eingedämmt werden konnten, verschlechterten sich die kognitiven Leistungen der Patientin weiterhin.

Aufgrund der ungewöhnlichen Dominanz und Schwere der kognitiven Symptomatik wurde in Betracht gezogen, dass die Patientin zusätzlich zu der Multiplen Sklerose eine autoimmune Enzephalitis entwickelt haben könnte, woraufhin das Serum der Patientin auf anti-neuronale Autoantikörper getestet wurde. Sämtliche neuronale Autoantigene, die im Rahmen der Routinediagnostik überprüft wurden, waren negativ. Jedoch zeigte sich auf Färbungen von Hirnschnitten, dass IgA-Antikörper der Patientin an faserartige Strukturen banden (Abb. 8).

Nach Einleitung einer Immuntherapie mit Plasmaaustausch und Rituximab konnte die kognitive Symptomatik der Patientin stabilisiert werden. Der Therapieerfolg erhärtete den Verdacht auf eine sekundäre Autoimmunenzephalitis.

### 3.2.2 Immunhistochemie

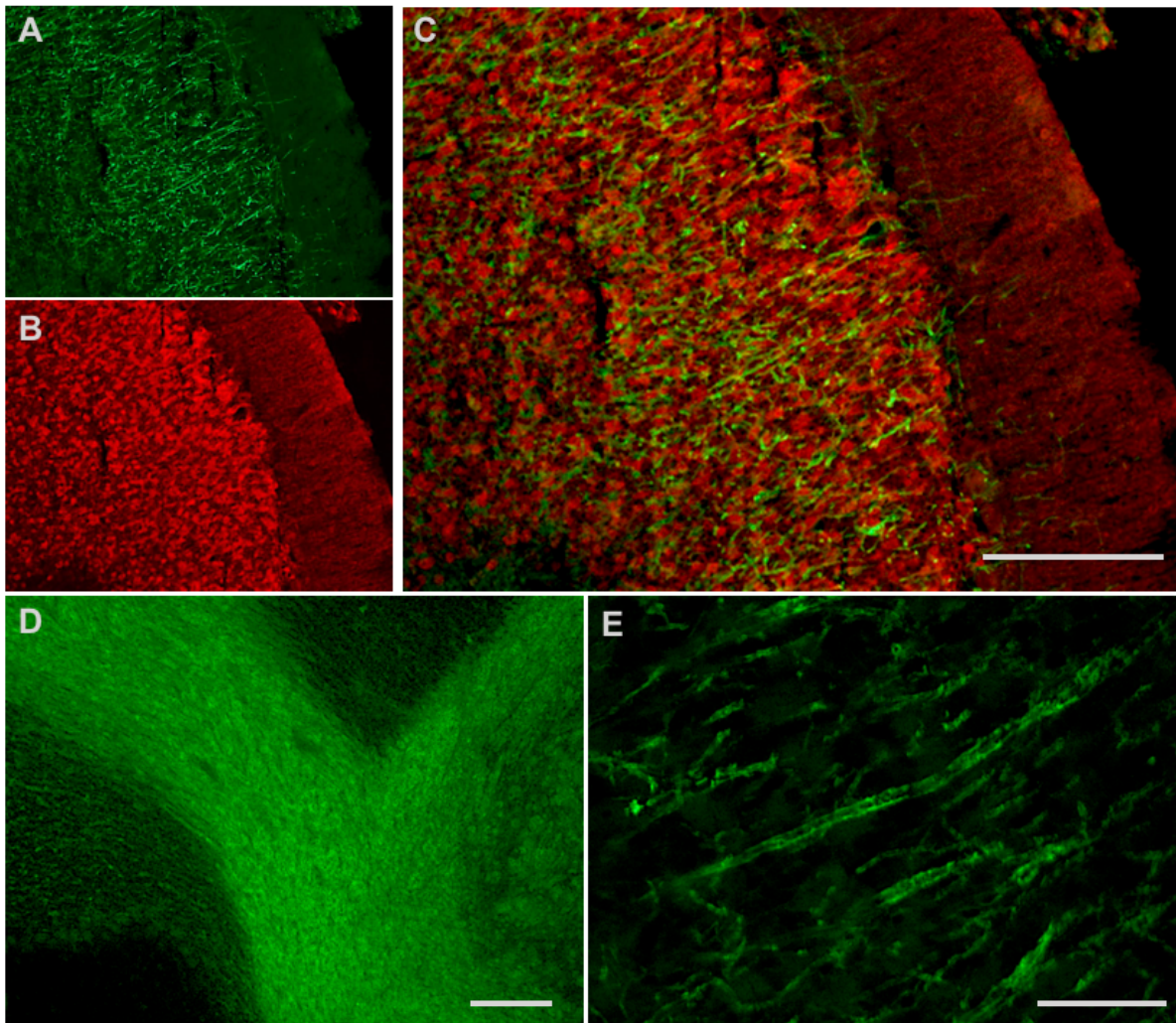
Um herauszufinden, ob im Serum der Patientin tatsächlich Hirn-reaktive Autoantikörper vorhanden sind, wurden zunächst Rattenhirnschnitte mit dem nativen Plasmapherese-Eluat inkubiert und mit fluoreszenzdierenden Zweitantikörpern gegen IgA und IgG versehen. Die Auswertung ergab, dass keine IgG-Antikörper aus dem Plasma an Rattenhirn gebunden hatten. Jedoch zeichnete sich eine deutliche Bindung von IgA Antikörpern an das Rattenhirn ab.

Um ein präziseres Färbeergebnis zu erzielen, wurden daraufhin das Plasmapherese-Eluat aufgereinigt und die IgA-Antikörper isoliert. In folgenden Färbungen von Maus- und Rattenhirnschnitten mit den isolierten IgA-Autoantikörpern zeigte sich ein feines Färbemuster der axonalen Fasern im Großhirn in parallelen Bahnen, sowie eine großflächige Bindung der

Antikörper an die Faserstränge im Marklager des Kleinhirns (Abb. 8). Die Somata der Nervenzellen blieben von der Färbung gänzlich ausgespart, sodass der Rückschluss gezogen wurde, dass es sich bei dem Zielantigen um ein axonales Protein oder einen Bestandteil von Myelin handelt (Abb. 8).

Antikörper gegen Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), eins der meist exprimierten Proteine in humanem Myelin, wurden bereits bei unterschiedlichen demyelinisierenden Erkrankungen beschrieben und konnten durch einen Zell-basierten Assay (Prof. Höftberger, Wien) ausgeschlossen werden.

**Abbildung 8: Färbung von Hirnschnitten (Ratte, Maus) mit nativen Antikörpern**



Maßstableisten: C+D = 100  $\mu$ m, E = 50  $\mu$ m. Abbildungen A+C (Bildausschnitte) wurden bereits veröffentlicht (121).

**A:** Kortex PFA-perfundierte Ratte, IgA-Patientin 1:10

**B:** Kortex PFA-perfundierte Ratte, Anti-GABA<sub>A</sub> (1:200)

**C:** Überlagerung A + B

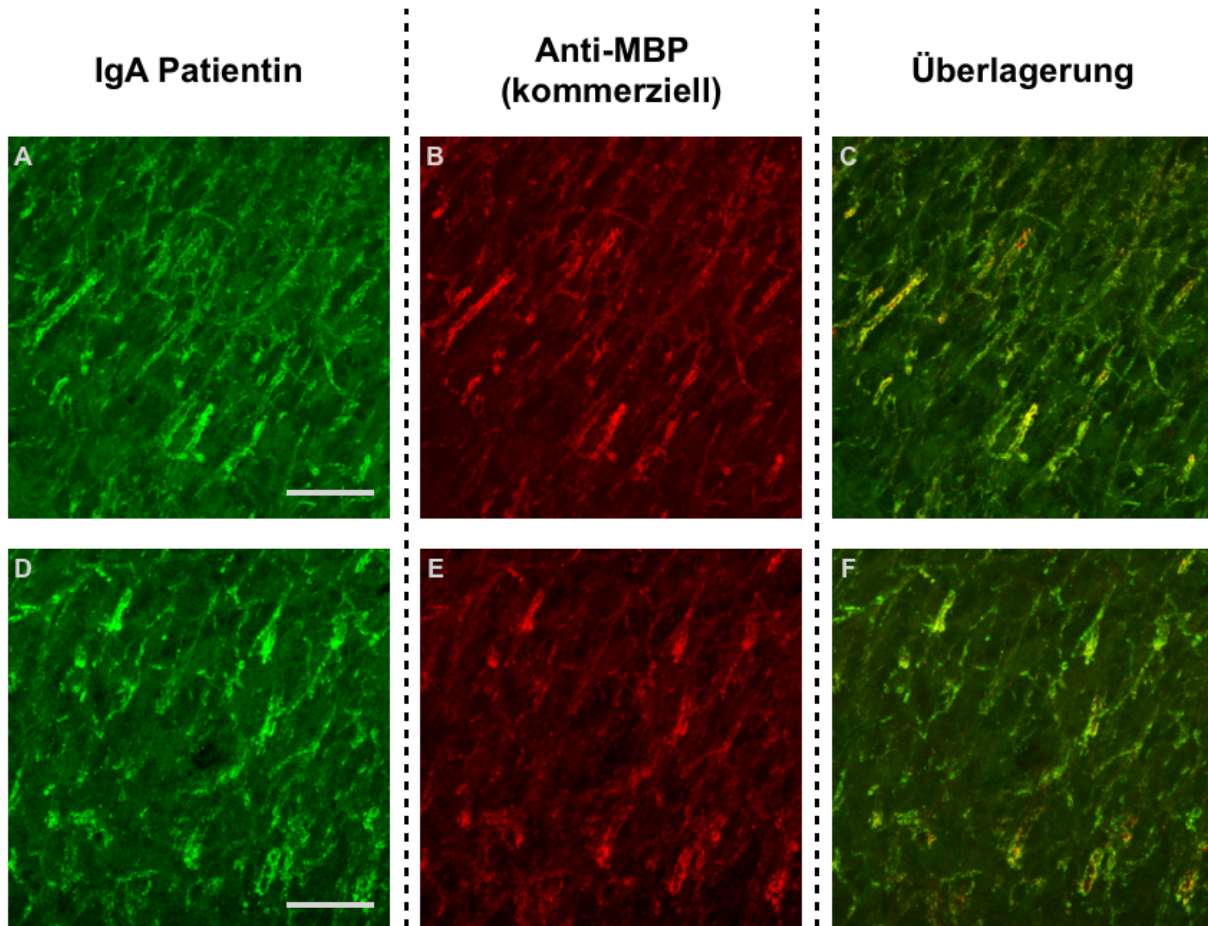
**D:** Kleinhirn Methanol-fixierte Maus, IgA Patientin 1:5

**E:** Kleinhirn PFA-perfundierte Ratte, IgA-Patientin 1:10

Abbildungen A und B zeigen, dass die Antikörper an axonale Fasern im Großhirn binden und dass die Somata der Nervenzellen ausgespart bleiben. Die Nahaufnahme in E demonstriert die parallele Färbung von Nervenfasern und lässt vermuten, dass die Antikörper ein Myelin-Epitop binden. Besonders markant hebt sich die Färbung des Marklagers im Kleinhirn hervor (D).

Nachfolgend wurde mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie Myelin Basic Protein als Zielantigen der nativen Autoantikörper identifiziert. Dieser Befund wurde durch immunhistochemische Doppelfärbungen und Färbungen von Hirnschnitten von MBP-Knockout-Mäusen bestätigt.

**Abbildung 9: Doppelfärbung von Hirnschnitten (Ratte) mit nativen Antikörpern**



Maßstableisten A+D= 20 µm, PFA-perfundierte Ratte, Kleinhirnrinde (Koronarschnitt). Abbildungen A-C (Bildausschnitte) wurden bereits veröffentlicht (121).

**A:** IgA Patientin 1:10

**B:** Santa Cruz Anti-MBP-Antikörper 1:200

**C:** Überlagerung A + B

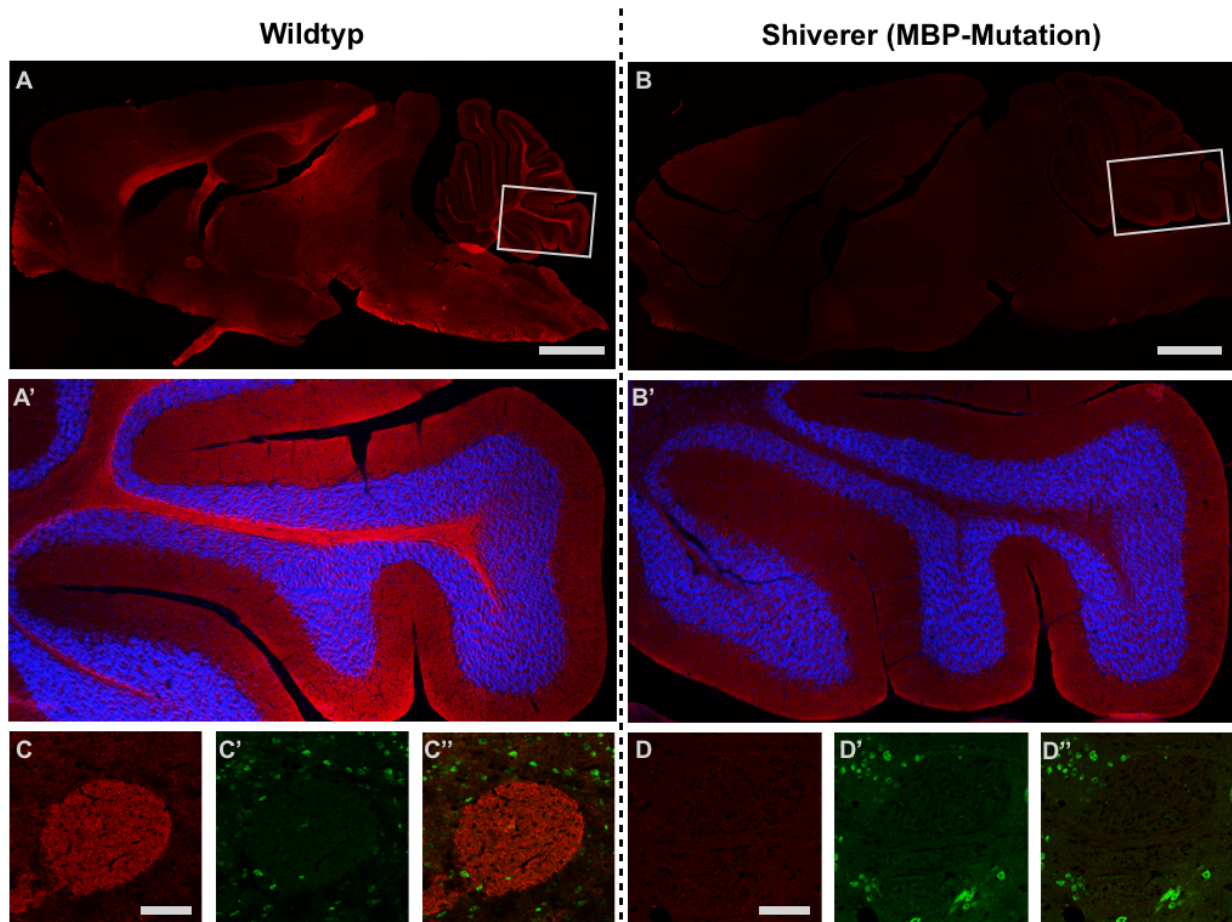
**D:** IgA Patientin 1:10

**E:** RDI Anti-MBP-Antikörper 1:50

**F:** Überlagerung A + B

Die Doppelfärbungen A-C und D-F zeigen, dass die Antikörper der Patientin mit zwei unterschiedlichen kommerziellen Antikörpern gegen Myelin Basic Protein kolokalisieren.

**Abbildung 10: Färbung von Hirnschnitten (Maus Wildtyp; Shiverer) mit nativen Antikörpern**



Maßstableisten A+B = 1mm, C+D = 50 µm, PFA-fixierte Maus, Wildtyp (A,C) und MBP Knockout mbpshi (B,D).  
Abbildungen A–D“ wurden bereits veröffentlicht (121).

**A:** IgA Patientin 1:10

**A’:** Vergrößerter Bildausschnitt aus A (Cerebellum) mit DAPI-Färbung

**B:** IgA Patientin 1:10

**B’:** Vergrößerter Bildausschnitt aus B (Cerebellum) mit DAPI-Färbung

**C:** Commissura Anterior, IgA Patientin 1:10

**C’:** NeuN-Antikörper 1:500

**C’’: Überlagerung C + C’**

**D:** Commissura anterior, IgA Patientin 1:10

**D’:** NeuN-Antikörper 1:500

**D’’: Überlagerung D + D’**



Abbildung A demonstriert die starke Bindung der IgA-Antikörper der Patientin an myelinreiche axonale Faserzüge, besonders gut sichtbar im Marklager des Kleinhirns. Die Bindung der Antikörper entfiel komplett bei MBP-Knockout-Mäusen (Shiverer Maus) (Abbildung B).

Abbildungen C und D zeigen die Faserstränge der Commissura anterior im Querschnitt. Während bei der Wildtyp-Maus in C die Patienten-Antikörper deutlich an die myelinisierten Umhüllungen der Nervenbahn binden, bleibt in der MBP-Knockout-Maus (D) die Bindung der Antikörper komplett aus.

Die Färbungen und Aufnahmen in Abb. 10 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jakob Kreye und PD Dr. rer. nat. Markus Höltje angefertigt.

## 4. Diskussion

### 4.1 GFAP als Autoantigen

Mithilfe von Doppelfärbungen von Hirnschnitten mit kommerziellen GFAP-Antikörpern und den beiden monoklonalen Antikörpern konnte zunächst gezeigt werden, dass das Zielepitop der Autoantikörper auf Astrozyten lokalisiert ist. Der Befund wurde mit der Färbung von Astrozyten in Kultur bestätigt. Mittels Immunpräzipitation und einem Zell-basierten Assay gelang schlussendlich die Identifikation von GFAP als Zielantigen der beiden monoklonalen Antikörper. Die Immunpräzipitation wurde experimentell unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt, um ein optimales Protokoll zur Identifizierung weiterer Zielantigene zu erhalten.

Wie in Kapitel 1.3 zu lesen ist, ist das Krankheitsbild einer GFAP-Autoantikörper-assoziierten Enzephalitis schon länger bei Kleinhunden bekannt ("Mopsenzephalitis") und wurde 2016 zum ersten Mal beim Menschen beschrieben (autoimmune GFAP-Astrozytopathie). Somit ist GFAP als Zielepitop von Autoantikörpern kein Novum mehr.

Interessant ist jedoch, dass es sich bei diesem Befund um die erste Beschreibung zweier monoklonaler Antikörper gegen GFAP aus Liquor handelt, und dass sie von Patientinnen stammen, bei denen eine NMDA-Rezeptor-Enzephalitis diagnostiziert wurde. Dies wirft viele relevante Fragen zu überlappenden autoimmunen Syndromen sowie zur Pathogenese der GFAP-Astrozytopathie und der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis auf.

#### 4.1.1 Technische Schritte zur Identifizierung von GFAP als Autoantigen

Nach Durchführung der Immunpräzipitationen, die zur Identifizierung von GFAP als Zielantigen der monoklonalen Antikörper geführt haben, ließen sich folgende **Rückschlüsse** ziehen:

- Die Verwendung von hochsalzigem Waschpuffer führt zu einer allgemeinen Reduktion der Proteine, die an die Beads und Antikörper gebunden haben. Da sich auch die Konzentration des Zielantigens verringert, ist es empfehlenswert, die Beads stattdessen mit niedrigsalzigem Homogenisierungspuffer zu waschen.
- Da auch die Beads an sich viele Proteine unspezifisch binden, ist es sinnvoll, eine Vorinkubation des jeweiligen Lysates mit Beads durchzuführen. Diese werden anschließend

per Zentrifugation entfernt und verworfen. So können vor der eigentlichen Präzipitation Proteine entfernt werden, die eine Affinität zu den Beads aufweisen und zu einer Verschattung des Zielantigens führen könnten. Dies ist insbesondere für Proben relevant, die auch massenspektrometrisch ausgewertet werden sollen.

- Um ein geeignetes Lysat für die Immunpräzipitation zu finden, ist es essenziell, sich an immunhistochemischen Färbungen der jeweiligen Antikörper zu orientieren. Gelingt auf Färbungen von Hirnschnitten die Identifizierung einer Zellpopulation, gegen die die Antikörper gerichtet sind, wie hier beispielsweise Astrozyten, sollte die Immunpräzipitation mit einem Lysat ebendieser Zellen durchgeführt werden.
- Um eine höhere Konzentration des Zielantigens zu erzielen, ist auch eine Auftrennung des Hirnhomogenats in Pellet und Überstand ratsam (Zellfraktionierung). Für Antikörper mit einem zytoplasmatischen Zielantigen, wie hier, eignet sich die Präzipitation mit Überstand. Ist das Zielantigen dagegen in der Membran lokalisiert oder ein Bestandteil des Zellkerns, gelingt der Nachweis eher, wenn man die Antikörper mit Pellet inkubiert.

#### 4.1.2 Bisherige beschriebene Autoantikörper gegen GFAP

Folgende Fallserien wurden zu der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie veröffentlicht:

- Fang et al. beschrieben 2016 eine Kohorte mit 16 Patienten (69).
- Flanagan et al. beschrieben in ihrer Studie 102 GFAP-Antikörper-positive Patienten (87).
- Long et al. untersuchten in ihrer Studie 19 Patienten retrospektiv (88).
- Yang et al. analysierten den Therapieerfolg und Krankheitsverlauf von sieben Patienten (89).
- Iorio et al. veröffentlichten eine Fallstudie, die 22 Patienten einschloss (90).
- Dubey et al. dokumentierten in einer prospektiven Studie den Krankheitsverlauf von 90 Patienten (91).
- Yang et al. veröffentlichten 2018 eine Studie, die 30 GFAP-IgG-positive Patienten eingeschlossen hatte und ein besonderes Augenmerk auf überlappende autoimmune Syndrome legte (92).
- Kimura et al. beschrieben die klinischen Charakteristika von 14 Patienten mit Anti-GFAP-IgGs im Liquor (93).

Zusätzlich wurden noch einige Fallstudien zu einzelnen Patienten mit autoimmuner GFAP-Astrozytopathie veröffentlicht: Li et al. beschrieben beispielsweise den Fall einer Patientin, die nach einer Herpes Simples Enzephalitis an der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie erkrankte (94) und Theroux et al. beschrieben den Verlauf eines pädiatrischen Patienten mit GFAP-Astrozytopathie, der im EEG mit stark ausgeprägten Delta-Brush-Wellen auffiel (95).

Die isolierten Immunglobuline aus der Studie von Flanagan et al. banden entweder ausschließlich an GFAP- $\alpha$  oder an GFAP- $\alpha$  und GFAP- $\epsilon$ . Das mittlere Erkrankungsalter ist 44 Jahre, und 54% der Patienten sind weiblich. 34% der Patienten hatten eine Neoplasie; die meisten davon wurden nach Auftreten der neurologischen Symptome entdeckt. Die häufigste Neoplasie war das Ovarialkarzinom.

Die häufigsten Symptome umfassen subakuten Gedächtnisverlust, Verwirrtheit, Tremor meningeale Symptome wie Kopfschmerzen, Photophobie, Papillenödem, Nackenschmerz, und myelopathische Symptome wie Schwäche und Taubheitsgefühl in den Extremitäten. Die beschriebenen Patienten sprachen insgesamt gut auf Immuntherapie an. Radiologisch zeigte die Mehrzahl der Patienten zwei charakteristische Zeichen: Periventrikuläres strahlenförmiges Gadolinium Enhancement und eine längslaufende T2-hyperintense Läsion im Rückenmark.

Etwa 40% der Patienten mit autoimmuner GFAP-Astrozytopathie weisen zusätzliche Autoantikörper gegen weitere zerebrale Epitope auf. Die häufigsten koexistierenden Antigene sind NMDA-Rezeptoren und AQP 4. (87, 91)

Martinez-Hernandez et al. screenen 2019 zwei Kohorten mit jeweils 646 und 200 Patienten mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis auf das Vorliegen zusätzlicher Autoantikörper und befanden, dass bei 30 Patienten neben NMDA-Rezeptor-Autoantikörpern auch gliale Antikörper vorlagen. Bei insgesamt 10 Patienten waren die zusätzlichen Autoantikörper gegen GFAP gerichtet (96).

#### 4.1.3 Pathogenität von GFAP-Autoantikörpern

Äquivalent zu den paraneoplastischen Enzephalitiden stellt sich auch bei Patienten mit GFAP-Autoantikörpern die Frage: Wie erreichen die Antikörper ihr Zielantigen, das im Cytoplasma lokalisiert ist, und können sie überhaupt eine pathogene Wirkung haben? Patienten mit

autoimmuner GFAP-Astrozytopathie sprechen in der Regel gut auf Immuntherapie an, was per se eine Antikörper-vermittelte Pathogenese plausibel macht (91).

Histopathologische Untersuchungen von Patienten mit positiven GFAP-Autoantikörpertitern zeigten eine perivaskuläre Infiltration von B-Lymphozyten (CD20+), Monozyten, Neutrophilen und aktivierte Mikroglia, sowie eine Infiltration des Hirnparenchyms mit T-Zellen (CD3+). Im perivaskulären Raum wurde eine Anhäufung von Antikörper-sekretierenden CD138-positiven Zellen gefunden. Das perivaskuläre Entzündungsgeschehen entspricht dem strahlenförmigen Gadolinium-Enhancement, das bei einigen Patienten mit autoimmuner GFAP-Astrozytopathie im MRT beobachtet wird. Bei allen Patienten wurden eine verringerte Menge von GFAP und AQP4 und ein Verlust von Astrozyten, Neuronen und Demyelinisierung in den entzündeten Gebieten festgestellt, wohingegen dieser Verlust bei einer Kontroll-Patientin mit GFAP-Antikörper-negativer Meningoenzephalomyelitis ausblieb (97).

Ähnliche Rückenmarksläsionen wie bei den Patienten mit autoimmuner GFAP-Astrozytopathie wurden bei der Alexander-Krankheit und bei Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders (NMOSD) (Antikörper gegen den astrozytären Wasserkanal Aquaporin 4) beschrieben (98, 99). Die Alexander-Krankheit ist mit Mutationen des GFAP-Gens assoziiert. Die Mutationen führen zu einer Überexpression von GFAP, zu intraplasmatischen Aggregaten von GFAP sowie zu Rosenthal-Fasern. Klinisch äußert sich die Erkrankung mit Megalenzephalie, Anfallsleiden, und mit einer beeinträchtigten geistigen und motorischen Entwicklung (100).

Während es noch keinen Nachweis gibt, dass GFAP-Autoantikörper direkt pathogen sind, konnte in einer transgenen Mauslinie mit cytotoxischen T-Zellen, die gegen GFAP gerichtet sind, nachgewiesen werden, dass diese T-Zellen das ZNS infiltrieren und dort zu Inflammation führen können (101). Neben pathogenen T-Lymphozyten, könnten weitere Akteure des Immunsystems am Krankheitsgeschehen beteiligt sein. Mikroglia und Cytokinfreisetzungen sind steroid-sensitiv. Falls Mikroglia an der Pathogenese der GFAP-Astrozytopathie beteiligt sind, könnte dadurch die klinische Besserung der Patienten erklärt werden.

Parallelen zu der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie weisen Anti-Ri-Antikörper (Type 2 antineuronal nuclear autoantibody, ANNA2) auf: Anti-Ri-Antikörper treten zumeist paraneoplastisch in Zusammenhang mit Brust- und Lungenkrebs auf. Wie auch GFAP ist das

Antigen im Inneren der Zelle lokalisiert, und häufig lassen sich zusätzlich zu den Anti-Ri-Antikörpern weitere Autoantikörper nachweisen, darunter auch Antikörper mit extrazellulären Zielepitopen (Neuronale Kalziumkanäle (P/Q-Typ, N-Typ), muskuläre Acetylcholin-Rezeptoren). Die Erkrankung hat eine Sonderposition unter den paraneoplastischen Enzephalitiden, da die Patienten ebenfalls häufig gut auf Immuntherapie ansprechen (102).

Wie lässt sich erklären, dass Patienten mit GFAP- und Ri-Autoantikörpern auf Therapien mit Kortikosteroiden und intravenösen Immunglobulinen ansprechen, obwohl eine pathogene Wirkung der Antikörper unklar ist?

Da beide Autoantikörper häufig parallel mit anderen Autoantikörpern vorkommen, könnte die positive Wirkung der Immunsuppression auf die Depletion der Autoantikörper mit extrazellulärem Zielepitop zurückzuführen sein. Dem Auftreten von Autoantikörpern mit intrazellulärem Zielantigen könnte ein bislang unbekannter, immuntherapie-responsiver Autoantikörper vorausgehen, der die Plasmamembran der Astrozyten beziehungsweise Neuronen angreift und so sekundär zur Exposition von GFAP/Ri führt.

Einen weiteren Erklärungsansatz dazu, wie Antikörper gegen ein intrazelluläres Antigen auch ohne Zusammenwirken mit anderen Antikörpern eine pathogene Wirkung entfalten können, liefert eine Studie von Rocchi et al. zu Synapsin1-Autoantikörpern (103). Synapsin1 ist ein intrazellulär lokalisiertes Phosphoprotein, das mit präsynaptischen Vesikeln assoziiert ist. Autoantikörper gegen das Protein wurden bei Patienten mit diversen neuropsychiatrischen Erkrankungen festgestellt, darunter auch bei Patienten mit limbischer Enzephalitis (104, 105).

Rocchi et al. zeigen, dass Autoantikörper gegen Synapsin1 über FcγII/III-Rezeptoren endozytotisch in Neurone aufgenommen werden, intrazellulär an Synapsin binden und dort zu einer Aggregation und Inaktivierung des Proteins führen.

Des Weiteren zeigt die Studie, dass die Exposition von kultivierten Neuronen mit Autoantikörpern gegen Synapsin1 zu einer reduzierten Anzahl an exzitatorischen und inhibitorischen Synapsen sowie zu einer verringerten Anzahl an synaptischen Vesikeln führt. In Synapsin1-Knockout-Neuronen blieb die Reduktion der Synapsen nach Inkubation mit den Antikörpern vollständig aus (103).

Ein ähnlicher Mechanismus – die rezeptorvermittelte, endozytotische Aufnahme in Astrozyten – wäre, bei GFAP-Autoantikörpern, wie auch bei anderen Autoantikörpern mit intrazellulärem Zielantigen, denkbar. Die Bindung an GFAP könnte daraufhin zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts und zu Funktionseinbußen der Astrozyten führen.

Die Zusammenschau der Befunde zeigt, dass das Auftreten von GFAP-Autoantikörpern spezifisch für das Krankheitsbild einer Meningoenzephalomyelitis ist und als Marker für dieses Krankheitsbild herangezogen werden kann. Noch ist unklar, ob GFAP-Autoantikörper eigenständig, ohne Mitwirkung anderer pathogener Akteure, zu dem Krankheitsbild der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie führen. Ein Zusammenspiel mit T-Zellen, Mikroglia und anderen Autoantikörpern erscheint ebenfalls plausibel.

#### 4.1.4 GFAP-Autoantikörper bei NMDA-Rezeptor-Enzephalitis

Aus der Literatur wird ersichtlich, dass der Befund dieser Studie - GFAP-Autoantikörper bei Patientinnen mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis - kein Einzelfall ist und dass bereits weitere überlappende autoimmune Syndrome mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis beschrieben wurden.

Stellen die GFAP-Autoantikörper, die im Rahmen dieser Studie bei zwei Patientinnen mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis identifiziert wurden, eine Begleiterscheinung dar, oder tragen sie als Krankheitsmodulatoren zur Pathogenese bei?

Ist das konkordante Auftreten von NMDA-Rezeptor-Antikörpern und anderen Autoantikörpern ein Zufall? Patienten mit autoimmuner GFAP-Astrozytopathie und NMDA-Rezeptor-Enzephalitis haben einen gemeinsamen Risikofaktor: Das Vorliegen eines Teratoms. Teratome exprimieren neben NMDA-Rezeptoren eine Vielzahl weiterer zerebraler Proteine, darunter GFAP und AQP 4 (106, 107). Deshalb scheint es nicht überraschend, dass in der Literatur bereits von Patienten mit mehreren parallel vorkommenden Autoantikörpern berichtet wurde.

Bislang wurde der klinische Verlauf von etwa 40 Patienten mit parallelem Vorkommen von GFAP- und NMDA-Rezeptor-Antikörpern beschrieben, primär in Studien zu der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie.

Im Gegensatz zu Patienten mit ausschließlich NMDA-Rezeptor-Antikörpern zeigten Patienten mit Antikörpern gegen NMDA und GFAP ebenfalls das bezeichnende Gadolinium Enhancement.

Während die meisten Patienten mit reiner NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ausschließlich enzephalitische Symptome aufweisen, wurde bei Patienten mit GFAP- und NMDA-Autoantikörpern mehrfach eine Meningoenzephalitis und Meningoenzephalomyelitis beschrieben (108).

Zusätzlich wurde in der Literatur, vor der Erstcharakterisierung von GFAP-Autoantikörpern, mehrfach von Patienten berichtet, die zwar NMDA-Rezeptor-Antikörper aufwiesen, sich jedoch mit atypischen Merkmalen wie prominenter Myelitis, T2-Hyperintensitäten im Rückenmark und periventrikulärem Gadolinium Enhancement präsentierten - also mit charakteristischen Merkmalen der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie (109-112). Es wäre aufschlussreich, eine Reanalyse des Antikörperspektrums dieser Patienten durchzuführen und zu prüfen, ob womöglich GFAP-Autoantikörper für die atypischen Merkmale verantwortlich sind.

Die Patientinnen aus dieser Studie, aus deren Liquor die beiden monoklonalen GFAP-Antikörper gewonnen wurden, weisen allerdings das gegenteilige klinische Szenario auf: Es lagen Antikörper-produzierende Lymphozyten vor, die Antikörper gegen NMDA-Rezeptoren und GFAP bilden, doch wurden die Patientinnen mit der typischen Klinik der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis auffällig. Es bleibt offen, ob GFAP-assoziierte Immunmechanismen zu der Symptomatik beigetragen haben und ob die charakteristischen Symptome der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie im späteren Krankheitsverlauf der Patientinnen stärker apparent geworden wären, wenn nicht rechtzeitig mit einer Immuntherapie begonnen worden wäre.

Bislang unbekannte Faktoren scheinen zu bewirken, dass entweder NMDA-Rezeptor-Antikörper oder GFAP-Autoantikörper-assoziierte Immunmechanismen stärker den klinischen Lauf beeinflussen. Da sich die Klinik der beiden Krankheitsbilder überlappt, ist eine klare Abgrenzung jedoch schwierig.

In Hinblick auf die enge Nachbarschaft und symbiotische Beziehung zwischen Astrozyten und Neuronen (Beispiel: Modell der tripartiten Synapse (113)) ist es unwahrscheinlich, dass sich beide Krankheitsgeschehen vollkommen unbeeinflusst voneinander zutragen.

Verschiedenste neurodegenerative, neuroinflammatorische und ischämische Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und ALS gehen ebenfalls mit Veränderungen von Astrozyten und GFAP einher. Astrozyten, die an Größe zunehmen, und die Expression von Proteinen wie GFAP,



Vimentin und Nestin hochregulieren, werden als “Reaktive Astrozyten” bezeichnet. Inwiefern reaktive Astrozyten Folge, Ursache oder Mitspieler von Krankheiten sind, ist zu weiten Teilen noch unklar (114).

Über folgende Mechanismen könnten sich die beiden Krankheitsgeschehen der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie und der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis gegenseitig beeinflussen:

- Da auch Astrozyten NMDA-Rezeptoren exprimieren, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Astrozyten ebenfalls durch die NMDA-Rezeptor-Antikörper angegriffen werden und dass GFAP sekundär freigesetzt oder exponiert wird, und so für pathogene Antikörper zugänglich wird (115). Abbau- und Spaltprodukte von GFAP werden unter anderem bei Schädel-Hirn-Traumata und Neuromyelitis-Optica-Spektrum-Erkrankungen freigesetzt und können als prognostischer Marker im Serum gemessen werden (116, 117). Eine Freisetzung von GFAP bei autoimmunen Enzephalitiden als Antwort auf das entzündliche Geschehen ist nicht auszuschließen und könnte zu der Bildung von GFAP-Autoantikörpern beitragen.
- Astrozyten sind integraler Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Werden diese Astrozyten durch T-Zellen oder Antikörper beschädigt, könnte die Schrankenfunktion aufgehoben werden und dies die Einwanderung von Entzündungszellen und Entzündungsfaktoren begünstigen. Ein prolongierter Krankheitsverlauf der Enzephalitis wäre die Folge (118).
- Astrozyten haben die wichtige Aufgabe, Glutamat aus dem Extrazellulärraum und synaptischen Spalt aufzunehmen und zu verarbeiten. Eine Störung der Astrozytenfunktion hätte folglich eine Anhäufung von Glutamat zur Folge. Zahlreiche Studien belegen einen toxischen Effekt von Glutamat auf neuronales Gewebe, der beispielsweise im Zusammenhang mit der Alzheimer-Demenz als wichtiger Faktor im Krankheitsgeschehen diskutiert wird (119).

Evidenz dafür, dass Antikörper gegen zusätzliche Epitope bei NMDA-Rezeptor-Enzephalitis Patienten einen krankheitsmodulierenden Effekt haben, ergibt sich aus der Studie von Titulaer et al.: Die Autoren beschrieben eine hohe Prävalenz von AQP4- und MOG- Antikörpern bei NMDA-Rezeptor-Enzephalitis-Patienten, die klinische und radiologische Zeichen für Demyelinisierung zeigten. Sie resümieren, dass Patienten mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis im Rahmen der Enzephalitis oder unabhängig davon Antikörper-assoziierte demyelinisierende Syndrome wie Neuromyelitis Optica entwickeln können. Die Autoren befanden, dass Patienten mit überlappenden autoimmunen Syndromen einer intensiveren immunsuppressiven Therapie

bedürfen und gleichzeitig häufiger unter persistierenden Defiziten leiden als reine NMDA-Rezeptor-Enzephalitis-Patienten. Die genauen Pathomechanismen sind noch unklar, jedoch vermuten die Autoren ähnlich wie bei der autoimmunen GFAP-Astrozytopathie ein Zusammenwirken von reversiblen Antikörper-vermittelten Effekten, Komplement und zytotoxischen T-Zellen (120).

#### 4.1.5 Schlussfolgerungen

Durch die vorliegende Studie konnte gezeigt werden, dass bei zwei Patientinnen mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis mindestens jeweils eine Plasmazelle im Liquor präsent war, die Antikörper gegen GFAP bildeten. Auch im Hinblick auf bisher veröffentlichte Fallstudien kann davon ausgegangen werden, dass dies kein Zufallsbefund ist und dass die tatsächliche Prävalenz von GFAP-Autoantikörpern bei Patienten mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis hoch ist.

Die vorangegangene Diskussion legt dar, dass zusätzliche Autoantikörper bei Patienten mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis durchaus als Krankheitsmodulatoren agieren können und dass es relevant ist, diese zu identifizieren, um Krankheitsverlauf und Therapieerfolg abzuschätzen.

Bei einem Verdacht auf eine Antikörper-vermittelte Enzephalitis wurde bislang mit Hilfe von Biochips, die transfizierte HEK-Zellen mit den häufigsten Autoantigenen enthalten, geprüft, ob Autoantikörper vorliegen. Routinemäßig wird dabei nach Antikörpern gegen NMDA-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren, LGI1, CASPR2 und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren gesucht und bei Verdacht auf eine paraneoplastische Enzephalitis nach Antikörpern gegen Hu, Yo, Ri, CV2, Ma, Amphiphysin, PCA-2, Tr, SOX1, Titin und Recoverin.

Bei dieser Sachlage sollte auch GFAP in diese Panels aufgenommen werden:

- Zum einen, weil GFAP-Autoantikörper mit einer eigenständigen Krankheit mit gesonderten Symptomen und Komplikationen einhergehen, die einer besonderen Überwachung bedürfen. 32% der Patienten mit autoimmuner GFAP-Astrozytopathie entwickeln beispielsweise ein Papillenödem - eine Komplikation, die bei Patienten mit anderen Antikörper-vermittelten Enzephalitiden noch nicht beschrieben wurde (108).

- Zum anderen sollte gezielt nach GFAP-Autoantikörpern gesucht werden, weil die Präsenz dieser Antikörper zusätzliche Rückschlüsse auf eine mögliche zugrundeliegende Neoplasie zulässt. Beispielsweise hatten 2% der Patienten der von Flanagan et al. beschriebenen Kohorte ein Gliom, wohingegen diese Neoplasie bei den mehr als 1500 beschriebenen Patienten mit NMDA-Rezeptor-Autoantikörpern nur einmal vorkam. Während 58% der Patienten mit NMDA-Rezeptor-Antikörpern ein Teratom haben, steigt die Wahrscheinlichkeit auf 71%, wenn neben den NMDA-Rezeptor-Antikörpern zusätzlich GFAP- und AQP4-Antikörper vorliegen. Je größer die beschriebenen Kohorten von Patienten mit Autoantikörpern, desto genauere Algorithmen können für die zugrundeliegenden Neoplasien entwickelt werden.

## 4.2 Myelin Basic Protein (MBP) als Autoantigen

Mittels immunhistochemischen Färbungen von Rattenhirnschnitten mit dem Plasmapherese-Eluat einer Patientin mit Multipler Sklerose konnte gezeigt werden, dass tatsächlich Autoantikörper vorhanden sind, die gegen ein Protein im ZNS gerichtet sind und die folglich die klinische Symptomatik der Patientin verursacht haben könnten. Doppelfärbungen zeigten, dass die IgA-Antikörper der Patientin gegen ein Myelin-assoziiertes Epitop gerichtet sind (Abb. 8). Aufbauend auf den Rückschlüssen, die aus den Experimenten mit den beiden monoklonalen Antikörpern gezogen wurden, wurde die Immunpräzipitation mit den nativen IgA-Antikörpern nach dem optimierten Protokoll durchgeführt. Ein Teil des entstandenen Präzipitates wurde massenspektrometrisch analysiert. Mit Massenspektrometrie wurde schließlich Myelin Basic Protein (MBP) als Zielantigen der IgA-Antikörper der Patientin identifiziert. Der Befund wurde durch immunhistochemische Doppelfärbungen und Färbung von Hirnschnitten von Myelin-Basic-Protein-Knockout Mäusen (Shiverer Mäuse) bestätigt (Abb. 9, 10).

Die Antikörper banden nicht an MBP auf Western Blots. Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteinproben aufgelöst. Da die Autoantikörper MBP in Hirnlysat binden, nicht aber auf Western Blots, wird davon ausgegangen, dass die Antikörper der Patientin MBP ausschließlich in nativer Form erkennen.

Die Erkenntnisse, die durch diese Studie gewonnen wurden, wurden 2019 in dem Artikel "IgA Autoantibodies Against Native Myelin Basic Protein in a Patient with MS" veröffentlicht (121).

### 4.2.1 Bisherige Studien zu MBP-Autoantikörpern

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden bereits vielfach Studien durchgeführt, die die Rolle von Autoantikörpern mit oligodendrozytären Zielantigenen an der Pathogenese der Multiplen Sklerose untersucht haben.

Tatsächlich wurden in früheren Studien Antikörper gegen u.a. MBP, Proteolipid Protein und Myelin-associated Glykoprotein nachgewiesen:

- Reindl. et al. fanden in einer Kohorte von 130 MS-Patienten, dass 38% der Patienten IgG-Antikörper gegen MOG und 28 % der Patienten Antikörper gegen MBP ausbilden. Weiter ergab ihre Studie, dass Anti-MOG-Immunglobuline häufig bereits in frühen Krankheitsstadien auftreten (36%), während MBP-Antikörper zu Beginn der Erkrankung selten sind (12%) und mit Fortschreiten der Krankheit akkumulieren (40% bei chronisch-progredienter MS). In der

Kontrollgruppe, bestehend aus Patienten mit anderen entzündlichen neurologischen Erkrankungen, zeigte sich jedoch, dass auch 53% dieser Patienten Antikörper gegen MOG und 47% Antikörper gegen MBP ausbildeten (122).

- Berger et al. untersuchten in einer Kohorte von 103 Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom, ob das Auftreten von Antikörpern gegen MOG oder MBP einen prediktiven Wert für den Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose hat. Die Studie ergab, dass die Krankheit nur bei 23% der seronegativen Patienten progredient war, und dass es in  $45.1 \pm 13.7$  Monaten zu weiteren demyelinisierenden Ereignissen kam, während bei den seropositiven Patienten mit Antikörpern gegen beide Epitope 95% nach  $7.5 \pm 4.4$  Monaten Rezidive erlitten (123).
- Rauer et al. untersuchten ebenfalls 45 Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom und kamen auch zu dem Ergebnis, dass Patienten mit Autoantikörpern früher zu Rezidiven neigten (5.5 Monate) als seronegative Patienten (25 Monate). Entgegen den Ergebnissen von Berger et al. bestand jedoch sowohl bei den seronegativen, als auch bei den seropositiven Patienten das gleiche Risiko, ein Rezidiv zu entwickeln. Auch fanden sie in einer gesunden Kontrollgruppe Antikörper gegen MOG bei 21% und gegen MBP bei 28% der Probanden (124).
- Kuhle et al. orientierten sich an dem Protokoll von Berger et al. (123). In ihrer Studie wurden 462 Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom eingeschlossen und über einen Zeitraum von 24 Monaten beobachtet. Hier zeigte sich keine Assoziation zwischen Auftreten von IgG oder IgM Autoantikörpern gegen MBP oder MOG (125).

Wie anhand der dargestellten Studien exemplarisch dargestellt, herrscht aufgrund teilweise widersprüchlicher Ergebnisse nach wie vor Uneinigkeit über die tatsächliche Rolle der Antikörper an der Pathogenese der MS und über ihren prädiktiven Wert für den Krankheitsverlauf.

Hinweise für eine Beteiligung von Antikörpern an der Pathogenese ergeben sich jedoch aus folgenden Beobachtungen:

- In humanen Hirnschnitten von MS-Patienten wurden B-Zellen nachgewiesen, die Antikörper gegen MBP und andere Myelin-Bestandteile bilden (126).

- In entzündlichen Läsionen der weißen Substanz befinden sich Ablagerungen von Immunglobulinen (127).
- Immunglobuline in entzündlichen Läsionen aktivieren das Komplement-System und können so zu einer Komplement-vermittelten Demyelinisierung führen (127).
- Antikörper, die an Myelin-Bestandteile wie MBP binden, fördern durch Opsonierung die Phagozytose durch Makrophagen (128).

#### 4.2.2 Autoantikörper gegen natives MBP

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, untersuchten bereits mehrere Studien die mögliche Rolle von Antikörpern gegen Myelin Basic Protein bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose, jedoch ohne übereinstimmende Ergebnisse.

Die zitierten Studien hatten gemeinsam, dass die Antikörper-Suchtests mittels Western Blot und ELISA durchgeführt wurden und somit lineare und denaturierte Epitope der myelinischen Proteine verwendet wurden.

Im Rahmen dieser Studie wurden dagegen IgA-Autoantikörper aus dem Serum einer MS-Patientin identifiziert, die ausschließlich natives MBP erkennen und nicht an lineare MBP Epitope in Western Blots binden. Dieser Befund ist interessant, da er annehmen lässt, dass bei den zahlreichen vorangegangenen Studien womöglich Patienten übersehen wurden, die ebenfalls Antikörper gegen lediglich native Myelin-Bestandteile ausgebildet hatten.

Betrachtet man die komplexe Struktur des Proteins, erscheint es einleuchtend, dass die Konformation ausschlaggebend für das Bindeverhalten von Antikörpern ist:

MBP ist ein intrinsisch ungeordnetes Protein. Durch diverse post-translationale Modifikationen (u.a. Phosphorylierung, Methylierung, Deiminierung) kann es unterschiedliche Konformationen annehmen und so Bindung mit multiplen Proteinen und Lipiden im Cytosol, im Cytoskelett und in der Membran eingehen (129). Zu den Bindungspartnern von MBP zählen - je nach Konformation - Ca(2+)-Calmodulin, Actin, Tubulin, MAP-Kinase und Proteine mit einer SH3-Domäne (80).

Hinweise darauf, dass es durchaus krankheits-modifizierende Autoantikörper gibt, die ausschließlich native Epitope erkennen, zeigen neuere Studien zu MOG-Antikörpern. Während

die Studienlage über deren Rolle analog zu MBP-Antikörpern lange uneindeutig war, ergaben sich eindeutiger Ergebnisse, nachdem man Patientenkohorten mittels Zell-basierter Assays gezielt nach Antikörpern gegen natives MOG gescreent hatte.

MOG Autoantikörper wurden auf diese Weise konstant nachgewiesen in einer Subgruppe von vornehmlich pädiatrischen ADEM-Patienten (Akute disseminierte Enzephalomyelitis), bei AQP4 seronegativen Patienten mit NMOSD (Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder) und bei Patienten mit monophasischer oder rekurrenter isolierter Optikusneuritis (ON) und Transverser Myelitis. Meist gehören die MOG-Antikörper zu der IgG1-Subklasse (130-134). Etwa 27% der pädiatrischen Patienten mit demyelinisierenden Erkrankungen sind MOG-IgG seropositiv, während bei Erwachsenen nur etwa 4% MOG-IgG seropositiv sind. Bei erwachsenen Patienten mit MS stellt eine Seropositivität eine Ausnahme dar (135).

Eine weitere wichtige Beobachtung mehrerer Studien betrifft die Dynamik des Auftretens der Antikörper: Bei Episoden mit akuter Demyelinisierung, wie etwa bei ADEM oder CIS, sind die Antikörper nur vorübergehend nachweisbar, und ein Rückgang der Antikörper-Titer ist assoziiert mit einem besseren klinischen Verlauf. Persistierend hohe Antikörper-Titer korrelieren dagegen mit fortlaufender Krankheitsaktivität, wie beispielsweise bei wiederkehrender ON, multiphasischem ADEM oder pädiatrischer MS.(130, 131, 136, 137)

Ergebnisse aus Studien mit Tieren und Zellkultur lassen ebenfalls darauf schließen, dass ein besonderes Augenmerk auf Autoantikörper gegen nativ gefaltete myelinische Proteine gelegt werden sollte:

- Nur Antisera von Mäusen, die mit unmodifiziertem humanem MOG geimpft werden, wirken enzephalitogen (138).
- Nur Antikörper, die gegen unmodifiziertes humanes MOG gerichtet sind, zeigen Reaktivität gegen Oligodendrozyten in Kultur und induzieren Veränderungen der Zellmorphologie (138).
- In Untersuchungen an Affen mit EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) zeichnet sich ab, dass das Komplement-System nur in Assoziation mit konformationalen Antikörpern aktiviert wird, während die Aktivierung der Mikroglia bei konformationalen und linearen Antikörpern auftrat (139).

### 4.2.3 Schlussfolgerungen

In dieser Studie wurden IgA-Autoantikörper gefunden, welche gegen MBP gerichtet sind und aus dem Serum einer Patientin mit Multipler Sklerose und schwerer kognitiver Symptomatik stammen. Die Antikörper banden an regelrecht gefaltetes MBP, nicht aber an lineares, denaturiertes MBP (121).

Nach vielen nicht beweiskräftigen Studien, in denen Patientenseren auf Antikörper gegen MBP in linearer Form gescreent wurden, verdeutlicht unser Ergebnis, dass die Debatte um die Rolle von MBP-Antikörpern bei demyelinisierenden Erkrankungen noch aktuell ist.

Die rasch voranschreitende kognitive Beeinträchtigung der Patientin konnte nach Einleitung einer Therapie mit Plasmapherese und Rituximab stabilisiert werden, weshalb eine Mitwirkung der Autoantikörper an der Pathogenese plausibel erscheint.

Angesichts der zahlreichen Bindungspartner von MBP gibt es zunehmende Evidenz für eine aktive Rolle des Proteins in der Signaltransduktion während der Entwicklung der Myelinscheide und bei Remyelinisierungsprozessen (80). Kommt es zu einer Schädigung des Proteins, wie beispielsweise bei dieser Patientin durch Autoantikörper, machen die vielfältigen Konformationen und Funktionen von MBP deutliche Funktionsverluste des ZNS naheliegend.

Die Studie umfasst nur eine Patientin, weshalb es schwierig ist, weiterreichende Rückschlüsse zu ziehen. Im Hinblick auf die Ergebnisse aus den neueren Studien zu MOG-Autoantikörpern wird jedoch ersichtlich, dass es aufschlussreich wäre, größere Patientenkollektive mittels Zell-basierter Assays und konformationaler MBP-Epitopen zu untersuchen.

Ähnlich wie bei MOG wäre zu eruieren, inwiefern MBP-Autoantikörper in die Pathogenese eingreifen und ob sie ebenfalls als Biomarker für die Prognose dienen könnten oder eine Subgruppe von demyelinisierenden Erkrankungen definieren.

Wie wichtig die Etablierung von Biomarkern für demyelinisierende Erkrankungen ist, zeigt das Beispiel der Neuromyelitis Optica. Lange Zeit wurde die Erkrankung als ein Subtyp der Multiplen Sklerose angesehen. Dies änderte sich, als 2005 AQP4-Antikörper als hochspezifischer Marker für die Krankheit identifiziert wurden und seither die sichere Abgrenzung zu anderen demyelinisierenden Erkrankungen möglich ist (72). Patienten kann seither eine genauere Prognose gegeben und eine spezifischere Therapie gewährleistet werden.



### **4.3 Weiterführende Schritte und Fragen**

#### Größere Patientenkohorten und zeitlicher Verlauf

In dieser Studie wurden Antikörper von einzelnen Patientinnen charakterisiert. Interessant wäre es nun, herauszufinden, ob diese Patientinnen exemplarisch für größere Patientenskollektive stehen.

Analog zu der Patientin mit Autoantikörpern gegen natives MBP, würde bei einem Screening nach diesen Antikörpern ein besonderes Augenmerk auf MS Patienten liegen, die ebenfalls durch gravierende kognitive Beeinträchtigung apparent werden. Könnte MBP in der Pathogenese einer solchen Sub-Patientengruppe eine Rolle spielen? Mazza et al. untersuchten die Bindung von autoreaktiven T-Zellen von MS-Patienten an MBP über einen Zeitraum von 18 Monaten und fanden heraus, dass die Bindung an das Antigen fluktuierend ist: Manche Patienten wiesen zum ersten Zeitpunkt eine autoreaktive Bindung an MBP auf, zum nächsten Zeitpunkt nicht mehr, oder die T-Zellen erkannten zu einem späteren Zeitpunkt ein anderes Epitop von MBP (140). In einer größeren Patientenkohorte ließe sich auch nachvollziehen, ob eine ähnliche Dynamik beim Auftreten der MBP-reaktiven Autoantikörper vorliegt.

Da die Prävalenz von GFAP-Autoantikörpern bei Patienten mit NMDA-Rezeptor-Enzephalitis und bei anderen neurologischen Erkrankungen noch weitgehend unbekannt ist, wäre auch hier eine größere Studie aufschlussreich - auch um besser zu verstehen, inwieweit die Autoantikörper eigenständige "Aggressoren" sind.

Dazu wäre es hilfreich, in einer Studie mit einer größeren Patientenkohorte zu verfolgen, in welcher zeitlichen Abfolge Autoantikörper bei überlappenden autoimmunen Syndromen auftreten. Entwickeln sich GFAP-Autoantikörper als Folge einer NMDA-Rezeptor-Enzephalitis? Oder begünstigt die Präsenz von GFAP-Antikörpern das Entstehen von weiteren Autoantikörpern?

Mit größeren Fallzahlen ließe sich herausfinden, ob Antikörper gegen GFAP und natives MBP als Biomarker zur Diagnose von Subgruppen oder zur Abschätzung der Prognose von zukünftigen Krankheitsverläufe geeignet wären, wie beispielsweise MOG-Autoantikörper.

### Immundominante Domäne

MBP-reaktive T-Zellen binden vornehmlich an die Domäne zwischen den Aminosäuren 84 - 102 des Proteins (141), und Antikörper, welche aus post-mortem Hirngewebe von MS Patienten stammen, binden vor allem an die Domäne zwischen den Aminosäuren 84 - 95 (142). Es sollte daher weiter verfolgt werden, gegen welche Domäne die hier beschriebenen IgA-Antikörper der Patientin gerichtet sind.

Bis jetzt konnten zehn Isoformen von GFAP identifiziert werden. Die predominante GFAP Form in adulten Astrozyten ist GFAP $\alpha$ ; GFAP $\delta$  und GFAP $\epsilon$  werden vornehmlich in neuronalen Vorläuferzellen und unreifen Astrozyten exprimiert. Flanagan et al. beschrieben in ihrer Studie zu GFAP-Autoantikörpern eine vornehmliche Bindung an GFAP- $\alpha$  oder an GFAP- $\alpha$  und GFAP- $\epsilon$  (87). Hier wäre es lohnend herauszufinden, gegen welche Isoform die hier vorliegenden monoklonalen Antikörper gerichtet sind, und ferner, an welche Domäne des Proteins sie binden und ob GFAP ebenso wie MBP eine immundominante Domäne aufweist.

### Validierung im Tiermodell

Bislang wurden im Tiermodell “immunologisch isolierte” Erkrankungen, wie etwa die Neuromyelitis Optica mit Antikörpern ausschließlich gegen AQP4, oder die NMDA-Rezeptor-Enzephalitis mit Antikörpern ausschließlich gegen NMDA-Rezeptoren nachgebildet. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, injizierten Planagumà et al. (46) Liquor mit NMDA-Rezeptor-Antikörpern in das Ventrikelsystem von Mäusen und konnten so die klinischen und pathologischen Merkmale der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis nachbilden. Wie würden sich die Tiere verhalten, wenn zusätzlich GFAP-Autoantikörper präsent wären? Welche Faktoren entscheiden darüber, ob es zu einer autoimmunen GFAP-Astrozytopathie oder zu einer NMDA-Rezeptor-Enzephalitis kommt?

Hinsichtlich der Antikörper gegen konformationales MBP wäre es aufschlussreich, die aufgereinigten Antikörper in gesunde Tiere und in Tiere mit EAE zu injizieren. In Analogie zu der Studie von Marta et al. (138) könnten parallel Antikörper gegen lineares MBP injiziert werden, um zu überprüfen, ob hier im Vergleich zu den Antikörpern gegen natives MBP eine pathologische Reaktion ausbleibt. Gibt es Verhaltensauffälligkeiten nach Injektion? Zeigen gesunde Tiere und Tiere mit EAE eine ähnliche Reaktion? Oder bedarf es einer vorherigen entzündlichen Schädigung des ZNS durch EAE, damit die Antikörper an das Zielantigen binden können? Sofern die Tiere eine Reaktion zeigen, lässt sich - wie bei der Patientin - ebenfalls eine primär kognitive Symptomatik feststellen?

## Elektrophysiologie

Um nachzuweisen, dass die Autoantikörper gegen GFAP und MBP funktionell sind, könnten elektrophysiologische Testungen vorgenommen werden - in vivo und in vitro. Folgende Fragen wären zu beantworten:

Inwiefern beeinflusst die Exposition von Hirnschnitten oder gemischten Astrozyten/Neuronen-Kulturen mit den monoklonalen GFAP-Antikörpern die Erregungsbildung und Weiterleitung von Neuronen? Lässt sich ein pathologischer Effekt erkennen?

Ein Aspekt, der bislang kaum Beachtung fand, ist die Rolle der Gliazellen bei der NMDA-Rezeptor-Enzephalitis. Astrozyten, wie auch Oligodendrozyten exprimieren NMDA-Rezeptoren (115, 143).

Matute et al. untersuchten den Einfluss von humanen NMDA-Rezeptor-Autoantikörpern auf Oligodendrozyten in vitro. Im Kalzium-Imaging zeigte sich, dass die Autoantikörper eine verminderte Aktivität der Rezeptoren nach Stimulation mit Agonisten bewirkten. Dies resultierte wiederum in einer verminderten oligodendrozytären Expression von GLUT1 (Glukose Transporter 1), ein Transportprotein, das für die axonale Versorgung mit Laktat essentiell ist (143, 144).

Die Aktivierung von astrozytären NMDA-Rezeptoren ist ebenfalls notwendig für das Überleben der benachbarten Neurone (115). Verhalten sich Astrozyten ähnlich wie Oligodendrozyten, wenn sie mit NMDA-Autoantikörpern exponiert werden? Resultiert die Inkubation von Astrozyten mit NMDA-Rezeptor-Antikörpern auch in einer verminderten Aktivität der NMDA-Rezeptoren? Und wie beeinflusst dies wiederum das Signalverhalten der Neurone? Auch hier könnten elektrophysiologische Tests aufschlussreich sein.

Mittels in vivo - Ableitungen ließe sich auch nachvollziehen, wie lange Antikörper gegen natives MBP im Gehirn präsent sein müssen, bis die Nervenweiterleitung beeinträchtigt wird.

Schlussendlich wurde im Rahmen dieser Studie ein Protokoll entwickelt, das die zuverlässige Bestimmung der Zielantigene von monoklonalen Autoantikörpern erlaubt.

Nachdem die einzelnen Schritte der Immunpräzipitation optimiert wurden, gelang die Identifizierung des Antigens von zwei der insgesamt 161 monoklonalen Antikörpern mit unbekanntem Zielepitop aus der Studie von Kreye et al. (82). Die Erkenntnis, dass bei mindestens zwei der acht Patientinnen mit NMDA-Rezeptor Enzephalitis Antikörper-sekretierende Zellen im Liquor mit dem Zielantigen GFAP präsent waren, legt nahe, dass autoimmune Phänomene, die parallel Nerven- und Gliazellen betreffen, keine Seltenheit zu sein scheinen - eine Tatsache, die in bisherigen Studien zu autoimmunen Enzephalitiden noch wenig Beachtung fand.

Mit der Entwicklung eines geeigneten Protokolls steht nun auch ein Verfahren zur Verfügung, um die vielen Zielepitope der anderen monoklonalen Antikörper von Kreye et al. zu demaskieren, die an bislang unbekannte Epitope auf Endothel, Purkinje-Zellen, Neuropil und hippocampalen Körnerzellen binden. Es ist zu erwarten, dass dadurch im Verlauf noch viele weitere interessante Erkenntnisse zu überlappenden Autoantikörpern gewonnen werden können.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass das Protokoll gleichermaßen zur Identifizierung der Zielantigene von Autoantikörpern aus Serum angewendet werden kann. In diesem Rahmen wurde natives Myelin Basic Protein als Zielepitop und zentraler “Krankheitsmodulator” bei einer Patientin mit Multipler Sklerose charakterisiert. Angesichts der wichtigen Frage nach der Rolle glialer Antikörper an der Pathogenese der Multiplen Sklerose, zeigt diese Studie, dass bei der Suche nach relevanten Autoantigenen die dreidimensionale (konformationale) Struktur der Proteine besonders berücksichtigt werden muss.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Wilkinson PC. Serological Findings in Carcinomatous Neuromyopathy. *The Lancet*. 1964, 283(7346):1301-3.
2. Schulz P, Prüss H. “Hirnsymptome bei Carcinomatose” — Hermann Oppenheim and an Early Description of a Paraneoplastic Neurological Syndrome. *Journal of the History of the Neurosciences*. 2015;24(4):371-7.
3. Denny-Brown D. Primary Sensory Neuropathy with Muscular Changes associated with Carcinoma. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 1948;11(2):73-87.
4. 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. *Annals of neurology*. 2007;61(1):25-36.
5. 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. *The Lancet Neurology*. 2008;7(12):1091-8.
6. 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. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54(7):899-904.
7. 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. *Annals of neurology*. 2009;65(4):424-34.

8. Lai M, Huijbers MG, 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. *The Lancet Neurology*. 2010;9(8):776-85.
9. 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 GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *The Lancet Neurology*. 2010;9(1):67-76.
10. Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, Wilson C, Jacobs D, Lai M, Walker RW, Graus F, Bataller L, Illa I, Markx S, Strauss KA, Peles E, Scherer SS, Dalmau J. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Annals of neurology*. 2011;69(2):303-11.
11. Kazarian M, Calbo J, Proost N, Carpenter CL, Berns A, Laird-Offringa IA. Immune response in lung cancer mouse model mimics human anti-Hu reactivity. *Journal of neuroimmunology*. 2009;217(1):38-45.
12. Raspotnig M, Vedeler CA, Storstein A. Onconeural antibodies in patients with neurological symptoms: detection and clinical significance. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum*. 2011(191):83-8.
13. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology*. 1985;35(4):538.
14. Sillevs Smitt P, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, van Putten W, Hooijkaas H, Vecht C. Survival and outcome in 73 anti-Hu positive patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *Journal of neurology*. 2002;249(6):745-53.
15. Peterson K, Rosenblum MK, Kotanides H, Posner JB. Paraneoplastic cerebellar degeneration. I. A clinical analysis of 55 anti-Yo antibody-positive patients. *Neurology*. 1992;42(10):1931-7.

16. Rojas I, Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, Delattre JY, Ramon JM, Dalmau J, Posner JB. Long-term clinical outcome of paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. *Neurology*. 2000;55(5):713-5.
17. Dalmau J, Graus F, Villarejo A, Posner JB, Blumenthal D, Thiessen B, Saiz A, Meneses P, Rosenfeld MR. Clinical analysis of anti-Ma2-associated encephalitis. *Brain : a journal of neurology*. 2004;127(Pt 8):1831-44.
18. Butler MH, Hayashi A, Ohkoshi N, Villmann C, Becker CM, Feng G, De Camilli P, Solimena M. Autoimmunity to gephyrin in Stiff-Man syndrome. *Neuron*. 2000;26(2):307-12.
19. Yu Z, Kryzer TJ, Griesmann GE, Kim K, Benarroch EE, Lennon VA. CRMP-5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma-related autoimmunity. *Annals of neurology*. 2001;49(2):146-54.
20. Bernal F, Shams'ili S, Rojas I, Sanchez-Valle R, Saiz A, Dalmau J, Honnorat J, Sillevs Smitt P, Graus F. Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Neurology*. 2003;60(2):230-4.
21. Bataller L, Wade DF, Graus F, Stacey HD, Rosenfeld MR, Dalmau J. Antibodies to Zic4 in paraneoplastic neurologic disorders and small-cell lung cancer. *Neurology*. 2004;62(5):778-82.
22. Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, Rosenblum MK, Wray SH, Schold Jr SC, Glantz MJ, Jaeckle KA, Biran H, Lesser M, Paulsen WA, River ME, Posner JB. Anti-Ri: An antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Annals of neurology*. 1991;29(3):241-51.
23. Graus F, Vega F, Delattre JY, Bonaventura I, Rene R, Arbaiza D, Tolosa E. Plasmapheresis and antineoplastic treatment in CNS paraneoplastic syndromes with antineuronal autoantibodies. *Neurology*. 1992;42(3 Pt 1):536-40.

24. Uchuya M, Graus F, Vega F, Rene R, Delattre JY. Intravenous immunoglobulin treatment in paraneoplastic neurological syndromes with antineuronal autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996;60(4):388-92.
25. Keime-Guibert F, Graus F, Fleury A, Rene R, Honnorat J, Broet P, Delattre JY. Treatment of paraneoplastic neurological syndromes with antineuronal antibodies (Anti-Hu, anti-Yo) with a combination of immunoglobulins, cyclophosphamide, and methylprednisolone. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;68(4):479-82.
26. Silveis Smitt PA, Manley GT, Posner JB. Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. *Neurology*. 1995;45(10):1873-8.
27. Corradi JP, Yang C, Darnell JC, Dalmau J, Darnell RB. A post-transcriptional regulatory mechanism restricts expression of the paraneoplastic cerebellar degeneration antigen cdr2 to immune privileged tissues. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(4):1406-15.
28. 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.
29. Tanaka M, Tanaka K, Tokiguchi S, Shinozawa K, Tsuji S. Cytotoxic T cells against a peptide of Yo protein in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibody. *Journal of the Neurological Sciences*. 1999;168(1):28-31.
30. Albert ML, Austin LM, Darnell RB. Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Annals of neurology*. 2000;47(1):9-17.
31. Benyahia B, Liblau R, Merle-Beral H, Tourani JM, Dalmau J, Delattre JY. Cell-mediated autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu antibodies. *Annals of neurology*. 1999;45(2):162-7.



32. Graus F, Ribalta T, Campo E, Monforte R, Urbano A, Rozman C. Immunohistochemical analysis of the immune reaction in the nervous system in paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology*. 1990;40(2):219-22.
33. Giometto B, Marchiori\* GC, Nicolao P, Scaravilli T, Lion A, Bardin\* PG, Tavolato B. Sub-acute cerebellar degeneration with anti-Yo autoantibodies: immunohistochemical analysis of the immune reaction in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1997;23(6):468-74.
34. Voltz R, Dalmau J, Posner JB, Rosenfeld MR. T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology*. 1998;51(4):1146-50.
35. Bien CG, Bauer J. T-cells in human encephalitis. *Neuromolecular medicine*. 2005;7(3):243-53.
36. Alexopoulos H, Dalakas MC. A critical update on the immunopathogenesis of Stiff Person Syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(11):1018-25.
37. Burton AR, Baquet Z, Eisenbarth GS, Tisch R, Smeyne R, Workman CJ, Vignali DA. Central nervous system destruction mediated by glutamic acid decarboxylase-specific CD4+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(9):4863-70.
38. Wessig C, Klein R, Schneider MF, Toyka KV, Naumann M, Sommer C. Neuropathology and binding studies in anti-amphiphysin-associated stiff-person syndrome. *Neurology*. 2003;61(2):195-8.
39. Pittock SJ, Lucchinetti CF, Parisi JE, Benarroch EE, Mokri B, Stephan CL, Kim K-K, Kilimann MW, Lennon VA. Amphiphysin autoimmunity: Paraneoplastic accompaniments. *Ann Neurol*. 2005;58(1):96-107.
40. Geis C, Weishaupt A, Hallermann S, Grunewald B, Wessig C, Wulsch T, Reif A, Byts N, Beck M, Jablonka S, Boettger MK, Uceyler N, Fouquet W, Gerlach M, Meinck HM, Siren

AL, Sigrist SJ, Toyka KV, Heckmann M, Sommer C. Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain : a journal of neurology*. 2010;133(11):3166-80.

41. Sillevs Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, Henzen-Logmans S, Vecht C, De Zeeuw C, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto R. Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *The New England journal of medicine*. 2000;342(1):21-7.

42. Hutchinson M, Waters P, McHugh J, Gorman G, O'Riordan S, Connolly S, Hager H, Yu P, Becker CM, Vincent A. Progressive encephalomyelitis, rigidity, and myoclonus: a novel glycine receptor antibody. *Neurology*. 2008;71(16):1291-2.

43. Prüss H, Dalmau J, Harms L, Höltje 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.

44. Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet neurology*. 2011;10(1):63-74.

45. Tüzün 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 neuropathologica*. 2009;118(6):737-43.

46. Planagumà J, Leypoldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García 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 : a journal of neurology*. 2015;138(1):94-109.

47. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist,

ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. Archives of general psychiatry. 1994;51(3):199-214.

48. Prüss H, Finke C, Höltje 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 K-P. N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in herpes simplex encephalitis. Annals of neurology. 2012;72(6):902-11.

49. Armangue T, Spatola M, Vlagea 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. Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: a prospective observational study and retrospective analysis. The Lancet Neurology. 2018;17(9):760-72.

50. Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, Escaramis G, Delattre JY. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. Brain : a journal of neurology. 2001;124(Pt 6):1138-48.

51. Dalmau J, Graus F. Antibody-Mediated Encephalitis. The New England journal of medicine. 2018;378(9):840-51.

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 : a journal of neurology. 2012;135(11):3453-68.

53. Höftberger R, Titulaer MJ, Sabater L, Dome B, Rózsás A, Hegedus B, Hoda MA, Laszlo V, Ankersmit HJ, Harms L, Boyero S, de Felipe A, Saiz A, Dalmau J, Graus F. Encephalitis and GABAB receptor antibodies: novel findings in a new case series of 20 patients. Neurology. 2013;81(17):1500-6.

54. 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, Sillevs-Smitt P, Titulaer MJ, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *The Lancet Neurology*. 2014;13(3):276-86.
55. Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of comparative neurology*. 2009;513(5):532-41.
56. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol Rev*. 2001;81(2):871-927.
57. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annual review of immunology*. 2014;32:367-402.
58. Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain research reviews*. 2010;63(1-2):2-10.
59. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience*. 2006;7(1):41-53.
60. Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(9):a020370.
61. Paloneva J, Kestilä M, Wu J, Salminen A, Böhling T, Ruotsalainen V, Hakola P, Bakker ABH, Phillips JH, Pekkarinen P, Lanier LL, Timonen T, Peltonen L. Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nature Genetics*. 2000;25:357.

62. Orr AG, Hsiao EC, Wang MM, Ho K, Kim DH, Wang X, Guo W, Kang J, Yu GQ, Adame A, Devidze N, Dubal DB, Masliah E, Conklin BR, Mucke L. Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. *Nature neuroscience*. 2015;18(3):423-34.
63. Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(13):5178-82.
64. Zhang Z, Zoltewicz JS, Mondello S, Newsom KJ, Yang Z, Yang B, Kobeissy F, Guingab J, Glushakova O, Robicsek S, Heaton S, Buki A, Hannay J, Gold MS, Rubenstein R, Lu XC, Dave JR, Schmid K, Tortella F, Robertson CS, Wang KK. Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products. *PloS one*. 2014;9(3):e92698.
65. Singh VK, Warren R, Averett R, Ghaziuddin M. Circulating autoantibodies to neuronal and glial filament proteins in autism. *Pediatric neurology*. 1997;17(1):88-90.
66. Wei P, Zhang W, Yang LS, Zhang HS, Xu XE, Jiang YH, Huang FP, Shi Q. Serum GFAP autoantibody as an ELISA-detectable glioma marker. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013;34(4):2283-92.
67. Shibuya M, Matsuki N, Fujiwara K, Imajoh-Ohmi S, Fukuda H, Pham NT, Tamahara S, Ono K. Autoantibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluids from Pug dogs with necrotizing meningoencephalitis. *The Journal of veterinary medical science*. 2007;69(3):241-5.
68. Levine JM, Fosgate GT, Porter B, Schatzberg SJ, Greer K. Epidemiology of necrotizing meningoencephalitis in Pug dogs. *Journal of veterinary internal medicine*. 2008;22(4):961-8.
69. Fang B, McKeon A, Hinson SR, Kryzer TJ, Pittock SJ, Aksamit AJ, Lennon VA. Autoimmune Glial Fibrillary Acidic Protein Astrocytopathy: A Novel Meningoencephalomyelitis. *JAMA Neurol*. 2016;73(11):1297-307.

70. Lipka AF, Verschuuren JJGM, Titulaer MJ. SOX1 antibodies in Lambert–Eaton myasthenic syndrome and screening for small cell lung carcinoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1275(1):70-7.
71. Lipka AF, Verschuuren JJGM, Titulaer MJ. SOX1 antibodies in Lambert–Eaton myasthenic syndrome and screening for small cell lung carcinoma. 2012;1275(1):70-7.
72. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *The Journal of experimental medicine.* 2005;202(4):473-7.
73. Jarius S, Paul F, Franciotta D, Waters P, Zipp F, Hohlfeld R, Vincent A, Wildemann B. Mechanisms of Disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nature Clinical Practice Neurology.* 2008;4:202.
74. Brunner C, Lassmann H, Waehneldt TV, Matthieu JM, Lington C. Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *Journal of neurochemistry.* 1989;52(1):296-304.
75. Pham-Dinh D, Mattei MG, Nussbaum JL, Roussel G, Pontarotti P, Roeckel N, Mather IH, Artzt K, Lindahl KF, Dautigny A. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):7990-4.
76. Reindl M, Waters P. Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nature Reviews Neurology.* 2019;15(2):89-102.
77. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine.* 2006;354(9):942-55.

78. Vandvik B, Norrby E, Nordal HJ, Decré M. Oligoclonal Measles Virus-Specific IgG Antibodies Isolated from Cerebrospinal Fluids, Brain Extracts, and Sera from Patients with Subacute Sclerosing Panencephalitis and Multiple Sclerosis. 1976;5(8):979-92.
79. Sauerbrei A, Eichhorn U, Hottenrott G, Wutzler P. Virological diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Journal of Clinical Virology*. 2000;17(1):31-6.
80. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2006;63(17):1945-61.
81. Jahn O, Tenzer S, Werner HB. Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. *Molecular neurobiology*. 2009;40(1):55-72.
82. 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 : a journal of neurology*. 2016;139(Pt 10):2641-52.
83. Plum S, Helling S, Theiss C, Leite REP, May C, Jacob-Filho W, Eisenacher M, Kuhlmann K, Meyer HE, Riederer P, Grinberg LT, Gerlach M, Marcus K. Combined enrichment of neuromelanin granules and synaptosomes from human substantia nigra pars compacta tissue for proteomic analysis. *Journal of proteomics*. 2013;94:202-6.
84. Molina M, Steinbach S, Park YM, Yun SY, Di Lorenzo Alho AT, Heinsen H, Grinberg LT, Marcus K, Leite RE, May C. Enrichment of single neurons and defined brain regions from human brain tissue samples for subsequent proteome analysis. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*. 2015;122(7):993-1005.
85. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.

86. Prüss H, Leubner J, Wenke NK, Czirják GÁ, Szentiks CA, Greenwood AD. Anti-NMDA Receptor Encephalitis in the Polar Bear (*Ursus maritimus*) Knut. *Scientific Reports*. 2015;5(1):12805.
87. Flanagan EP, Hinson SR, Lennon VA, Fang B, Aksamit AJ, Morris PP, Basal E, Honorat JA, Alfugham NB, Linnoila JJ, Weinshenker BG, Pittock SJ, McKeon A. Glial fibrillary acidic protein immunoglobulin G as biomarker of autoimmune astrocytopathy: Analysis of 102 patients. *Ann Neurol*. 2017;81(2):298-309.
88. Long Y, Liang J, Xu H, Huang Q, Yang J, Gao C, Qiu W, Lin S, Chen X. Autoimmune glial fibrillary acidic protein astrocytopathy in Chinese patients: a retrospective study. *Eur J Neurol*. 2018;25(3):477-83.
89. Yang X, Liang J, Huang Q, Xu H, Gao C, Long Y, Xiao X. Treatment of Autoimmune Glial Fibrillary Acidic Protein Astrocytopathy: Follow-Up in 7 Cases. *Neuroimmunomodulation*. 2017;24(2):113-9.
90. Iorio R, Damato V, Evoli A, Gessi M, Gaudino S, Di Lazzaro V, Spagni G, Sluijs JA, Hol EM. Clinical and immunological characteristics of the spectrum of GFAP autoimmunity: a case series of 22 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(2):138-46.
91. Dubey D, Hinson SR, Jolliffe EA, Zekeridou A, Flanagan EP, Pittock SJ, Basal E, Drubach DA, Lachance DH, Lennon VA, McKeon A. Autoimmune GFAP astrocytopathy: Prospective evaluation of 90 patients in 1 year. *Journal of neuroimmunology*. 2018;321:157-63.
92. Yang X, Xu H, Ding M, Huang Q, Chen B, Yang H, Liu T, Long Y, Gao C. Overlapping Autoimmune Syndromes in Patients With Glial Fibrillary Acidic Protein Antibodies. *Front Neurol*. 2018;9(251).
93. Kimura A, Takekoshi A, Yoshikura N, Hayashi Y, Shimohata T. Clinical characteristics of autoimmune GFAP astrocytopathy. *Journal of neuroimmunology*. 2019;332:91-8.



94. Li J, Xu Y, Ren H, Zhu Y, Peng B, Cui L. Autoimmune GFAP astrocytopathy after viral encephalitis: A case report. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2018;21:84-7.
95. Theroux LM, Goodkin HP, Heinan KC, Quigg M, Brenton JN. Extreme delta brush and distinctive imaging in a pediatric patient with autoimmune GFAP astrocytopathy. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2018;26:121-3.
96. Martinez-Hernandez E, Guasp M, García-Serra A, Maudes E, Ariño H, Sepulveda M, Armangué T, Ramos AP, Ben-Hur T, Iizuka T, Saiz A, Graus F, Dalmau J. Clinical significance of anti-NMDAR concurrent with glial or neuronal surface antibodies. *Neurology*. 2020;94(22):e2302.
97. Long Y, Liang J, Xu H, Huang Q, Yang J, Gao C, Qiu W, Lin S, Chen X. Autoimmune glial fibrillary acidic protein astrocytopathy in Chinese patients: a retrospective study. 2018;25(3):477-83.
98. Farina L, Pareyson D, Minati L, Ceccherini I, Chiapparini L, Romano S, Gambaro P, Fancellu R, Savoiaro M. Can MR imaging diagnose adult-onset Alexander disease? *AJNR American journal of neuroradiology*. 2008;29(6):1190-6.
99. Flanagan EP, Kaufmann TJ, Krecke KN, Aksamit AJ, Pittock SJ, Keegan BM, Giannini C, Weinshenker BG. Discriminating long myelitis of neuromyelitis optica from sarcoidosis. *Ann Neurol*. 2016;79(3):437-47.
100. Messing A, Brenner M, Feany MB, Nedergaard M, Goldman JE. Alexander disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(15):5017-23.
101. Sasaki K, Bean A, Shah S, Schutten E, Huseby PG, Peters B, Shen ZT, Vanguri V, Liggitt D, Huseby ES. Relapsing-remitting central nervous system autoimmunity mediated by GFAP-specific CD8 T cells. *Journal of immunology*. 2014;192(7):3029-42.

102. Pittock SJ, Lucchinetti CF, Lennon VA. Anti-neuronal nuclear autoantibody type 2: paraneoplastic accompaniments. *Annals of neurology*. 2003;53(5):580-7.
103. Rocchi A, Sacchetti S, De Fusco A, Giovedi S, Parisi B, Cesca F, Hölzje M, Ruprecht K, Ahnert-Hilger G, Benfenati F. Autoantibodies to synapsin I sequester synapsin I and alter synaptic function. *Cell Death Dis*. 2019;10(11):864-.
104. Piegras J, Hölzje M, Otto C, Harms H, Satapathy A, Cesca F, Benfenati F, Gitler D, Pich A, Zander JF, Ahnert-Hilger G, Ruprecht K. Intrathecal immunoglobulin A and G antibodies to synapsin in a patient with limbic encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2(6):e169.
105. Hölzje M, Mertens R, Schou MB, Saether SG, Kochova E, Jarius S, Prüss H, Komorowski L, Probst C, Paul F, Bellmann-Strobl J, Gitler D, Benfenati F, Piegras J, Ahnert-Hilger G, Ruprecht K. Synapsin-antibodies in psychiatric and neurological disorders: Prevalence and clinical findings. *Brain Behav Immun*. 2017;66:125-34.
106. Calame JJ, Schaberg A. Solid teratomas and mixed Müllerian tumors of the ovary: A clinical histological, and immunocytochemical comparative study. *Gynecologic Oncology*. 1989;33(2):212-21.
107. Frasquet M, Bataller L, Torres-Vega E, Duran-Moreno M, Garcia-Verdugo JM, Sevilla T, Rivas S, Perez-Miralles F, Simo-Castello M, Casanova B. Longitudinally extensive transverse myelitis with AQP4 antibodies revealing ovarian teratoma. *Journal of neuroimmunology*. 2013;263(1-2):145-7.
108. Flanagan EP, Hinson SR, Lennon VA, Fang B, Aksamit AJ, Morris PP, Basal E, Honorat JA, Alfugham NB, Linnoila JJ, Weinshenker BG, Pittock SJ, McKeon A. Glial fibrillary acidic protein immunoglobulin G as biomarker of autoimmune astrocytopathy: Analysis of 102 patients. 2017;81(2):298-309.

109. Taylor RB, Mason W, Kong K, Wennberg R. Reversible paraneoplastic encephalomyelitis associated with a benign ovarian teratoma. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 1999;26(4):317-20.
110. Krueger MC, Koch TK, Bourdette DN, Chabas D, Waubant E, Mueller S, Moscarello MA, Dalmau J, Woltjer RL, Adamus G. NMDA Receptor Encephalitis Mimicking Seronegative Neuromyelitis Optica. *Neurology*. 2010;74(18):1473.
111. Lekoubou A, Viaccoz A, Didelot A, Anastasi A, Marignier R, Ducray F, Rogepond V, Honnorat J. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis with acute disseminated encephalomyelitis-like MRI features. *European Journal of Neurology*. 2012;19(2):e16-e7.
112. Outteryck O, Baille G, Hodel J, Giroux M, Lacour A, Honnorat J, Zéphir H, Vermersch P. Extensive myelitis associated with anti-NMDA receptor antibodies. *BMC neurology*. 2013;13:211.
113. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*. 2009;32(8):421-31.
114. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. 2017;46(6):957-67.
115. Jimenez-Blasco D, Santofimia-Castaño P, Gonzalez A, Almeida A, Bolaños JP. Astrocyte NMDA receptors activity sustains neuronal survival through a Cdk5–Nrf2 pathway. *Cell Death And Differentiation*. 2015;22:1877.
116. Watanabe M, Nakamura Y, Michalak Z, Isobe N, Barro C, Leppert D, Matsushita T, Hayashi F, Yamasaki R, Kuhle J, Kira J-i. Serum GFAP and neurofilament light as biomarkers of disease activity and disability in NMOSD. *Neurology*. 2019;93(13):e1299.
117. Okonkwo DO, Yue JK, Puccio AM, Panczykowski DM, Inoue T, McMahon PJ, Sorani MD, Yuh EL, Lingsma HF, Maas AIR, Valadka AB, Manley GT, Transforming R, Clinical

Knowledge in Traumatic Brain Injury I. GFAP-BDP as an acute diagnostic marker in traumatic brain injury: results from the prospective transforming research and clinical knowledge in traumatic brain injury study. *J Neurotrauma*. 2013;30(17):1490-7.

118. Cabezas R, Avila M, Gonzalez J, El-Bachá RS, Báez E, García-Segura LM, Jurado Coronel JC, Capani F, Cardona-Gomez GP, Barreto GE. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:211-.

119. Lewerenz J, Maher P. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Frontiers in neuroscience*. 2015;9:469-.

120. Titulaer MJ, Hofberger R, Iizuka T, Leypoldt F, McCracken L, Cellucci T, Benson LA, Shu H, Irioka T, Hirano M, Singh G, Cobo Calvo A, Kaida K, Morales PS, Wirtz PW, Yamamoto T, Reindl M, Rosenfeld MR, Graus F, Saiz A, Dalmau J. Overlapping demyelinating syndromes and anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Annals of neurology*. 2014;75(3):411-28.

121. Schumacher H, Wenke NK, Kreye J, Höltje M, Marcus K, May C, Prüss H. IgA autoantibodies against native myelin basic protein in a patient with MS. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2019;6(4):e569.

122. Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, Poewe W, Berger T. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain : a journal of neurology*. 1999;122 ( Pt 11):2047-56.

123. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F, Reindl M. Antimyelin Antibodies as a Predictor of Clinically Definite Multiple Sclerosis after a First Demyelinating Event. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(2):139-45.

124. Rauer S, Euler B, Reindl M, Berger T. Antimyelin antibodies and the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 2006;77(6):739-42.
125. Kuhle J, Pohl C, Mehling M, Edan G, Freedman MS, Hartung H-P, Polman CH, Miller DH, Montalban X, Barkhof F, Bauer L, Dahms S, Lindberg R, Kappos L, Sandbrink R. Lack of Association between Antimyelin Antibodies and Progression to Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(4):371-8.
126. Gerritse K, Deen C, Fasbender M, Ravid R, Boersma W, Claassen E. The involvement of specific anti myelin basic protein antibody-forming cells in multiple sclerosis immunopathology. *Journal of neuroimmunology*. 1994;49(1-2):153-9.
127. Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H. Multiple sclerosis: In situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Annals of neurology*. 1998;43(4):465-71.
128. Goldenberg PZ, Kwon EE, Benjamins JA, Whitaker JN, Quarles RH, Prineas JW. Opsonization of normal myelin by anti-myelin antibodies and normal serum. *Journal of neuroimmunology*. 1989;23(2):157-66.
129. Kim JK, Mastronardi FG, Wood DD, Lubman DM, Zand R, Moscarello MA. Multiple sclerosis: an important role for post-translational modifications of myelin basic protein in pathogenesis. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2003;2(7):453-62.
130. Selter RC, Brilot F, Grummel V, Kraus V, Cepok S, Dale RC, Hemmer B. Antibody responses to EBV and native MOG in pediatric inflammatory demyelinating CNS diseases. *Neurology*. 2010;74(21):1711-5.
131. Di Pauli F, Mader S, Rostasy K, Schanda K, Bajer-Kornek B, Ehling R, Deisenhammer F, Reindl M, Berger T. Temporal dynamics of anti-MOG antibodies in CNS demyelinating diseases. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2011;138(3):247-54.

132. Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, Lutterotti A, Jarius S, Di Pauli F, Kuenz B, Ehling R, Hegen H, Deisenhammer F, Aboul-Enein F, Storch MK, Koson P, Drulovic J, Kristoferitsch W, Berger T, Reindl M. Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *Journal of Neuroinflammation*. 2011;8(1):184.
133. Probstel AK, Dornmair K, Bittner R, Sperl P, Jenne D, Magalhaes S, Villalobos A, Breithaupt C, Weissert R, Jacob U, Krumbholz M, Kuempfel T, Blaschek A, Stark W, Gartner J, Pohl D, Rostasy K, Weber F, Forne I, Khademi M, Olsson T, Brilot F, Tantsis E, Dale RC, Wekerle H, Hohlfeld R, Banwell B, Bar-Or A, Meinl E, Derfuss T. Antibodies to MOG are transient in childhood acute disseminated encephalomyelitis. *Neurology*. 2011;77(6):580-8.
134. Cobo-Calvo A, Ruiz A, Maillart E, Audoin B, Zephir H, Bourre B, Ciron J, Collongues N, Brassat D, Cotton F, Papeix C, Durand-Dubief F, Laplaud D, Deschamps R, Cohen M, Biotti D, Ayrygnac X, Tilikete C, Thouvenot E, Brochet B, Dulau C, Moreau T, Tourbah A, Lebranchu P, Michel L, Lebrun-Frenay C, Montcuquet A, Mathey G, Debouverie M, Pelletier J, Labauge P, Derache N, Coustans M, Rollot F, De Seze J, Vukusic S, Marignier R. Clinical spectrum and prognostic value of CNS MOG autoimmunity in adults: The MOGADOR study. *Neurology*. 2018;90(21):e1858-e69.
135. Reindl M, Di Pauli F, Rostásy K, Berger T. The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. *Nature Reviews Neurology*. 2013;9:455.
136. Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Grummel V, Sommer N, Bruck W, Hartung HP, Stadelmann C, Hemmer B. Identification of a pathogenic antibody response to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(50):19057-62.
137. McLaughlin KA, Chitnis T, Newcombe J, Franz B, Kennedy J, McArdel S, Kuhle J, Kappos L, Rostasy K, Pohl D, Gagne D, Ness JM, Tenembaum S, O'Connor KC, Viglietta V, Wong SJ, Tavakoli NP, de Seze J, Idrissova Z, Khoury SJ, Bar-Or A, Hafler DA, Banwell B, Wucherpfennig KW. Age-dependent B cell autoimmunity to a myelin surface antigen in

- pediatric multiple sclerosis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2009;183(6):4067-76.
138. Marta CB, Oliver AR, Sweet RA, Pfeiffer SE, Ruddle NH. Pathogenic myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies recognize glycosylated epitopes and perturb oligodendrocyte physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(39):13992.
139. von Büdingen H-C, Hauser SL, Ouallet J-C, Tanuma N, Menge T, Genain CP. Frontline: Epitope recognition on the myelin/oligodendrocyte glycoprotein differentially influences disease phenotype and antibody effector functions in autoimmune demyelination. 2004;34(8):2072-83.
140. Mazza G, Ponsford M, Lowrey P, Campbell MJ, Zajicek J, Wraith DC. Diversity and dynamics of the T-cell response to MBP in DR2+ve individuals. 2002;128(3):538-47.
141. Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immuno-dominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature*. 1990;346:183.
142. Warren KG, Catz I. Increased synthetic peptide specificity of tissue-CSF bound anti-MBP in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 1993;43(1):87-96.
143. Saab AS, Tzvetavona ID, Trevisiol A, Baltan S, Dibaj P, Kusch K, Möbius W, Goetze B, Jahn HM, Huang W, Steffens H, Schomburg ED, Pérez-Samartín A, Pérez-Cerdá F, Bakhtiari D, Matute C, Löwel 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.
144. Matute C, Palma A, Serrano-Regal MP, Maudes E, Barman S, Sánchez-Gómez MV, Domercq M, Goebels N, Dalmau J. N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antibodies in Autoimmune Encephalopathy Alter Oligodendrocyte Function. *Annals of neurology*. 2020;87(5):670-6.

### Eidesstattliche Versicherung

Ich, Heike Schumacher Najm, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ***Identifizierung Neuronaler und Glialer Autoantigene bei Patienten mit Autoimmunen Enzephalitiden*** (*Identification of Neuronal and Glial Autoantigens in Patients with Autoimmune Encephalitis*) 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](http://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:



### Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Heike Schumacher Najm hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Schumacher H**, Wenke NK, Kreye J, Höltje M, Marcus K, May C, Prüss H. IgA autoantibodies against native myelin basic protein in a patient with MS. Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation. 2019;6(4):e569.

- Erstautorin, Schreiben des Artikels
- Zusammenfassung und Analyse der klinischen Daten
- Durchführung der Experimente: Isolation der Antikörper, Immunhistochemie, Mikroskopische Aufnahmen, Immunpräzipitation.
- Auswertung der Daten der Massenspektrometrie
- Erstellung der Abbildungen C, D, E, F
- Erstellung der Abbildungen G, H, I, J in Zusammenarbeit mit PD Dr. Markus Höltje und Dr. Jakob Kreye

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Lebenslauf

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

## Publikationsliste

**Schumacher H**, Wenke NK, Kreye J, Höltje M, Marcus K, May C, Prüss H. IgA autoantibodies against native myelin basic protein in a patient with MS. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2019;6(4):e569.

**Schumacher H**, Meyer T, Pruss H. GABAB receptor encephalitis in a patient diagnosed with amyotrophic lateral sclerosis. *BMC Neurol*. 2019;19(1):41.

Orr AG, Lo I, **Schumacher H**, Ho K, Gill M, Guo W, Kim DH, Knox A, Saito T, Saido TC, Simms J, Toddes C, Wang X, Yu GQ, Mucke L. Istradefylline reduces memory deficits in aging mice with amyloid pathology. *Neurobiology of disease*. 2018;110:29-36.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Harald Prüß, der mir während des gesamten Prozesses der Doktorarbeit – von der Themenfindung und den ersten Experimenten bis hin zum Verfassen der Dissertationsschrift – mit Rat und Tat zur Seite stand. Auch in den mühsameren Phasen des Projektes blieb er stets optimistisch und motivierte zur Weiterarbeit.

Nicht unerwähnt bleiben sollten die anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe Doreen Brandl, Dr. Betty Jurek, Dr. Nina Wenke und Dr. Jakob Kreye. Der Austausch mit ihnen war sehr bereichernd; ohne ihre Unterstützung wäre die Arbeit nicht zustande gekommen.

Auch möchte ich den externen Kooperationspartnern Dr. Caroline May von der Ruhr-Universität Bochum und PD Dr. Markus Höltje aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie der Charité danken, deren Einsatz und Erfahrungsschatz maßgeblich zur Fertigstellung des Projektes beigetragen haben.

Zu guter Letzt möchte ich von Herzen meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Mann Ramsey, danken, die mich stets ermuntert und mir den Rücken freigehalten haben. Ohne ihre liebevolle Unterstützung wäre der lange Weg durch das Studium und die Promotion nicht möglich gewesen.