

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

DISSERTATION

Affinitätsanalyse von Autoantikörpern bei Anti-NMDA-
Rezeptor-Enzephalitis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lam-Thanh Ly

aus Berlin

Datum der Promotion: 25.06.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	2
2	Manteltext	4
	2.1 Einleitung	4
	2.2 Methoden	7
	2.3 Ergebnisse	13
	2.4 Diskussion	21
	2.5 Literaturverzeichnis.....	25
3	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung.....	28
4	Auszug aus der Journal Summary List	31
5	Publikation	33
6	Lebenslauf	41
7	Publikationsliste	43
8	Danksagung	44

1 Abstract

Anti-N-methyl-d-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a common immune-mediated encephalitis associated with psychosis, dyskinesia, autonomic dysfunction and seizures. The disease is characterized by autoantibodies directed against the NR1 subunit, which impair the function of the NMDA receptor. Since no clear correlation between the respective antibody titres and the clinical course could be found, it is believed that other factors may be decisive for the severity of the clinical course. Therefore, we measured the affinity of human monoclonal autoantibodies by analysing their binding curves as well as the binding behaviour of patients' cerebrospinal fluid (CSF) by using flow cytometry-based assays with NR1-expressing HEK293 cells. Monoclonal antibodies showed significant differences in their affinity to the NR1 subunit with binding constants (half-maximal concentration, c_{50}) of 1 to 74 $\mu\text{g/ml}$. Binding parameters of monoclonal antibodies and patient CSF indicate that high-affinity antibodies mainly account for the CSF signal, possibly in concentrations between 0.1 and 5 $\mu\text{g/ml}$, which constitute approximately 1-10% of total CSF IgG in NMDAR encephalitis. Furthermore, binding behaviour of antibodies varied depending on CSF composition, suggesting that the biophysical properties of the antibodies may influence the course of the disease. This should be taken into account especially when established routine clinical assays are performed and interpreted. By normalizing binding parameters, measurements proved to be highly reproducible allowing inter-laboratory comparison and quantification of antibody affinity in autoimmune encephalitis. This makes it a suitable surrogate marker for future clinical trials. According to these measurements, routine cell-based assays might not detect low-affinity antibodies. Future studies should analyse their relation to the clinical course in NMDAR encephalitis.

Bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis handelt es sich um eine häufige Autoimmunenzephalitis, die mit Psychosen, Dyskinesien, autonomen Dysfunktionen und epileptischen Anfällen einhergeht. Pathogenetisch liegen diesem Krankheitsbild gegen die NR1-Untereinheit gerichtete Autoantikörper zugrunde, die die Funktion des NMDA Rezeptors beeinträchtigen. Da die jeweiligen Antikörpertiter nur partiell mit dem klinischen Verlauf korrelieren, wird vermutet, dass weitere Faktoren ausschlaggebend für die Schwere der Klinik sein können. Dafür wurden die Bindungskurven von monoklonalen Autoantikörpern und von Patientenliquor gegen NR1-exprimierende HEK293 Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei zeigten sich für die monoklonalen Antikörper deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Affinität zur NR1-Untereinheit mit Bindungskonstanten (halbmaximale Konzentration, c_{50}) von 1 bis 74 $\mu\text{g/ml}$. Der Vergleich zwischen den Bindungskurven individueller monoklonaler Antikörper und von Patientenliquor legt die Vermutung nahe, dass das Liquorsignal hauptsächlich durch höher affine Antikörper generiert wird. Hierfür werden Konzentrationen zwischen 0,1 und 5 $\mu\text{g/ml}$ angenommen, was ca. 1-10% des Gesamtliquor-IgG in der NMDAR Enzephalitis entsprechen würde. Darüber hinaus variierte das Bindungsverhalten der Antikörper je nach Liquorzusammensetzung, was darauf hindeutet, dass biophysikalische Eigenschaften der Antikörper Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausüben können. Dies sollte vor allem bei der Interpretation etablierter klinischer Routineassays berücksichtigt werden. Mittels Normierung der Daten können NR1 Antikörpertiter in Patientenliquor zwischen unterschiedlichen Laboren verglichen und quantifiziert werden und eine Grundlage geschaffen werden, um die Antikörperaffinität in weiteren klinischen Studien als Surrogatmarker zu nutzen. Ausgehend von den vorliegenden Berechnungen könnten niedrig affine Antikörper in Routine-Zellassays undetektiert bleiben. Ihre Auswirkungen auf den klinischen Verlauf sollten in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

2 Manteltext

2.1 Einleitung

Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis

Enzephalitiden zeigen ein komplexes neurologisches Krankheitsbild, deren Ätiologie bis vor einigen Jahren trotz umfangreicher klinischer Untersuchungen noch häufig ungeklärt blieb [1]. Bestätigte sich bei Patienten dieser Krankheitsgruppe der initial oftmals bestehende Verdacht auf einen infektiösen Ursprung nicht, wurde bis vor einigen Jahren noch häufig eine psychiatrische Erkrankung als ursächlich vermutet, was eine Einweisung der Patienten in psychiatrische Kliniken zur Folge hatte [1,2]. Einen Paradigmenwechsel leitete die Entdeckung ein, dass Autoimmunenzephalitiden einen entscheidenden Anteil an der Gruppe der nicht-infektiösen Enzephalitiden ausmachen [3]. Mit der Identifizierung von gegen neuronale Zelloberflächenproteine oder synaptische Proteine wie AMPAR, GABA_B-R, LGI1 oder N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor gerichteten Antikörpern erweiterte sich das Spektrum der Autoimmunenzephalitiden beständig [4]. Die im Jahr 2007 entdeckte Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis gilt hierbei als die am meisten und besten erforschte zentralnervöse Erkrankung, die durch gegen neuronale Zellepitope reaktive Antikörper vermittelt wird [5]. Eine durch das California Encephalitis Project durchgeführte Studie zeigt, dass die Häufigkeit der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis die der viral bedingten Enzephalitiden bei jungen Patienten sogar übertrifft [6]. Betroffen sind bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis vorwiegend junge Frauen im Alter von 20-50 Jahren, welche sich zunächst mit Gedächtnisstörungen und ausgeprägten psychiatrischen Symptomen präsentieren wie Verwirrtheit oder Wahnvorstellungen, im Verlauf jedoch zusätzlich Dyskinesien, epileptische Anfälle und Bewusstseinsstörungen entwickeln. Mitunter besteht aufgrund autonomer Instabilitäten, die bis hin zur respiratorischen Insuffizienz und kardialen Rhythmusstörungen reichen können, die Notwendigkeit zur maschinellen Beatmung und multidisziplinären Betreuung [2,6,7]. Ein weiteres Charakteristikum für die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis ist die Assoziation zu Tumoren (60%), wobei Ovarialteratome als die häufigsten Vertreter gelten [7].

Bedeutung der Autoantikörper

Pathogenetisch liegen diesem Krankheitsbild Autoantikörper zugrunde, die die N-terminale Domäne der NR1-Untereinheit binden. Vorausgehende Studien zeigen, dass die intrathekale Injektion von IgG, welches von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis asserviert und aufgereinigt wurde, ähnlich wie beim menschlichen Krankheitsbild zu Verhaltensauffälligkeiten bei Mäusen führt [8]. Darüber hinaus ließ sich nachweisen, dass aus dem Liquor extrahierte klonierte und rekombinant produzierte monoklonale Antikörper direkt pathogen wirken. In funktionellen Tests zeigte sich, dass die Antikörper die Anzahl der neuronalen NMDA-Rezeptoren herunterregulieren und Störungen in den synaptischen Strömen hervorrufen [9,10]. Die Annahme besteht hierbei, dass die Präsenz eines NMDA Rezeptor exprimierenden Teratoms eine Störung in der Immuntoleranz hervorruft und infolgedessen die Entstehung von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörpern begünstigt. Ausgeschlossen werden kann jedoch nicht, dass auch andere immunologische Trigger einen Einfluss auf diesen Prozess ausüben. So zeigen Studien, dass die Synthese von NMDA-Rezeptor Antikörpern durch eine Herpes simplex Enzephalitis getriggert werden kann [4,7,11]. Dass es sich bei dem pathogenen Effekt der Antikörper um einen reversiblen Vorgang mit vorübergehender neuronaler Dysfunktion handelt, zeigt die oftmals deutliche Symptomverbesserung nach erfolgreicher Immuntherapie [5,7]. In erster Linie werden Patienten mit Methylprednisolon, intravenösen Immunglobulinen (IVIg) oder Plasmapheresen therapiert. Bei Nicht-Ansprechen erfolgt eine Eskalation auf Rituximab oder Cyclophosphamid [5]. Die frühe Resektion eines Tumors, wenn vorhanden, sollte stets angestrebt werden, da somit das klinische Outcome verbessert werden kann [7].

Die Diagnosestellung der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis erfolgt durch Immunhistochemie auf Hirngewebe und zellbasierte Assays, die mit Serum und Liquor von erkrankten Patienten behandelt werden, wobei die Antikörper-Testung mit Liquorproben nachweislich sensitiver ausfällt als die mit Serumproben. Weiterhin lässt sich ein höherer Antikörper-Titer sowohl im Liquor als auch im Serum feststellen bei Patienten mit einem Ovarialteratom oder schlechtem klinischen Outcome [12].

Zielsetzung der Arbeit

Bisher fokussiert sich die Diagnostik bei Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis auf die Bestimmung von Antikörper-Titern im Serum oder Liquor. Ungeklärt ist jedoch bislang, ob womöglich nicht nur die Konzentration der Antikörper ausschlaggebend für den Schweregrad des Krankheitsbilds ist, sondern auch die Affinität, die die jeweiligen Antikörper zum NMDA-Rezeptor aufweisen. Denn obwohl sich in einigen Fällen intra-individuell eine Korrelation zwischen der Höhe des NR1-Antikörpertiters im Liquor und dem klinischen Verlauf von Patienten nachweisen ließ [12], konnte bisher kein Zusammenhang zwischen Antikörpertitern und der Schwere der Klinik bei unterschiedlichen Patienten hergestellt werden. So zeigten Patienten, deren Krankheitsverlauf einen mehrmonatigen Aufenthalt auf der Intensivstation mit maschineller Beatmung erforderlich machte, teilweise niedrigere Anti-NR1 Antikörpertiter als Patienten mit milden Krankheitssymptomen. Dies legt die Relevanz weiterer Parameter, die entscheidend für den Krankheitsverlauf sein können, nahe wie beispielsweise die Antikörperaffinität, die Epitopenbindungsstelle oder auch Antikörper-unabhängige Faktoren wie der Patienten-spezifische Glutamat-Rezeptor Turnover [13]. Für die vorliegende Arbeit wurde die Affinität von humanen Autoantikörpern gegen NR1 bestimmt. Technisch ließ sich dies erst durch die Entwicklung eines Panels an aus Patienten gewonnenen monoklonalen Anti-NR1-Antikörpern verwirklichen [9]. Die Antikörperaffinität ist definiert als die Stärke der Interaktion zwischen einem Epitop (in diesem Fall dem NMDA-Rezeptor) und der Bindungsstelle des Antikörpers für das jeweilige Antigen. Je höher die Affinität, desto mehr Antikörper ist an das Antigen im Gleichgewichtszustand gebunden. Demzufolge könnte ein höher affiner NR1-reaktiver Autoantikörper eine höhere Pathogenität aufweisen als ein niedrig affiner Autoantikörper. Hierfür wurde das Bindungsverhalten von humanen monoklonalen Antikörpern und Patientenliquor gegen NR1-exprimierende HEK293 Zellen mittels Durchflusszytometrie sowohl für die individuellen monoklonalen Antikörper als auch für den Patientenliquor untersucht. Ausgehend von diesen Berechnungen konnten grobe Schätzungen für NR1-spezifische Antikörperkonzentrationen im Liquor aufgestellt werden [13].

2.2 Methoden

Monoklonale Antikörper

Für diese Studie wurden aus Patientenliquor gewonnene monoklonale Antikörper untersucht. Dabei wurden fünf monoklonale humane Anti-NR1-Antikörper von drei Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis (#003-102, #007-124, #007-168, #007-169, #008-218) selektiert [9]. Die Antikörper wurden durch Klonierung Antikörper-sezernierender Zellen, die Vollängen-Immunglobulin G (IgG)-Variablen der schweren und leichten Kette erzeugen, generiert. Auf murinen Hirnschnitten und gegenüber NR1-exprimierenden menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) zeigten die monoklonalen Antikörper ein charakteristisches Bindungsverhalten gegenüber NR1. Aus derselben vorangegangenen Studie wurden übereinstimmend zum Isotyp nicht-NR1-reaktive Kontroll-Antikörper verwendet, die keine Reaktivität gegenüber humanem Gewebe zeigen (#mGo53) bzw. Astrozyten-spezifisch binden (#011-123) [9].

Durchflusszytometrie-basierte Zellassays mit monoklonalen Antikörpern

Zunächst wurden mittels ELISA (Mabtech) die jeweiligen IgG-Konzentrationen der monoklonalen humanen Antikörper bestimmt. Für jeden Antikörper wurde eine Verdünnungsreihe in einer 96-Wellplatte mit FACS-Puffer (1% hitzeinaktiviertes fetales bovines Serum (FCS) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)) angesetzt mit Endkonzentrationen zwischen 300-0,001 µg/ml. Die HEK293-Zellen wurden mit einem NR1-EYFP Plasmid transfiziert, welches für die NMDA-Rezeptor NR1-Untereinheit und das enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) ohne Stopkodon und ein Geneticin-Resistenzgen kodiert. Die Zellen wurden in einem mit DMEM supplementiertem Medium kultiviert, das mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin und 800 µg/ml Geneticin versetzt wurde. Als Kontrolle dienten HEK293-Zellen, die transient mit EYFP ohne NR1-Untereinheit transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 0,5% Trypsin/EDTA abgelöst und erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 1700 RPM für 5 min zentrifugiert und in eiskaltem FACS Puffer zu einer Konzentration von 15,000 Zellen/µl resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension wurden zur 96-Wellplatte hinzugefügt und mit der

monoklonalen Antikörperlösung vermischt, sodass eine finale Konzentration von 300.000 Zellen/Well erreicht wurde. Die Zellen wurden für 45 min auf Eis inkubiert, mit FACS Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde ein zweiter Fluorochrom-gekoppelter Antikörper (Ziegen anti-humaner Alexa Fluor-647 Antikörper [Life Technologies], 1:400 in FACS Puffer) hinzugefügt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Wiederholung der oben genannten Waschschrirte wurden die Zellen in FACS Puffer resuspendiert und in auf Eis gelagerte FACS-Röhrchen transferiert. Anschließend erfolgte die Messung in der Durchflusszytometrie mit der BD FACS-Canto-II Maschine. Insgesamt wurde das Experiment fünf Mal unabhängig voneinander wiederholt.

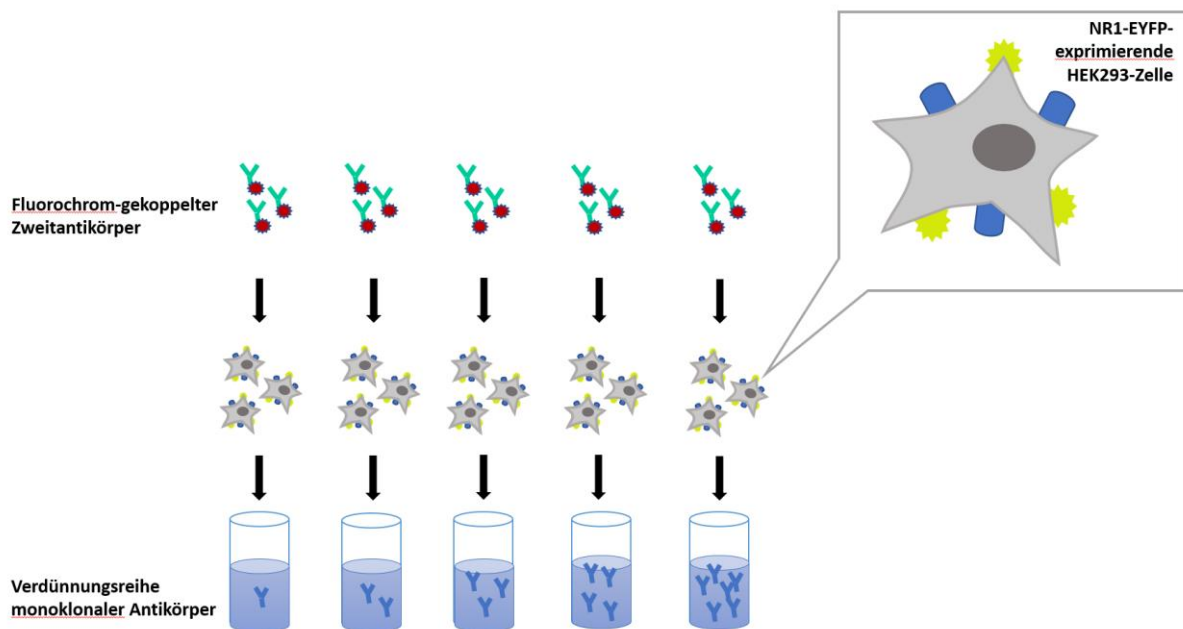


Abb. 1

Verdünnungsreihen der monoklonalen Antikörper wurden mit HEK293-Zellen, die mit der NR1-Untereinheit und dem enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) transfiziert wurden, inkubiert und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper versetzt. Als Kontrollgruppe dienen EYFP-exprimierende HEK293-Zellen ohne Untereinheit. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Affinitätsberechnung

Da die Transfektion der Zellen mit einem Plasmid erfolgte, welches sowohl für die NR1-Untereinheit als auch für EYFP kodiert, wurde die Expression des EYFP-Proteins als Maß für die Expression des NR1-EYFP Proteins in der Durchflusszytometrie genutzt (Abb. 2). Hierbei wurden die 20% der Population mit der höchsten NR1-EYFP Expression untersucht, um das Hintergrundrauschen zu reduzieren und damit einhergehend das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Ausgehend von dieser Zellpopulation wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des Alexa Fluor-647 Markers bestimmt, welche Aufschluss über die Bindung des monoklonalen NR1-Antikörpers an die NR1-Untereinheit gibt. Für jeden MFI-Wert wurde das Hintergrund-Fluoreszenzsignal subtrahiert, welches mit dem Alexa Fluor-647 Signal des #mGo53 Kontroll-Antikörpers gleich gesetzt wurde. Der errechnete Wert wurde anschließend normalisiert, um Variabilitäten zwischen den einzelnen Experimenten zu minimieren. Dies erfolgte, indem in jedem Experiment die MFI des monoklonalen Antikörpers #003-102 und #007-168 bei einer Konzentration von 300 µg/ml ermittelt wurde. Der Durchschnitt dieser Werte wurde als Kontrollwert ($MFI_{\text{Kontrolle}}$) definiert und als interner Richtwert für alle weiteren Messwerte genutzt, ähnlich wie die Standardproben im ELISA als Kalibrierungsmaß dienen. Die MFI jeder einzelnen Probe (MFI_{Probe}) wurde anschließend nach der folgenden Gleichung normalisiert: $MFI_{\text{normalisiert}} = MFI_{\text{Probe}}/MFI_{\text{Kontrolle}}$ [13].

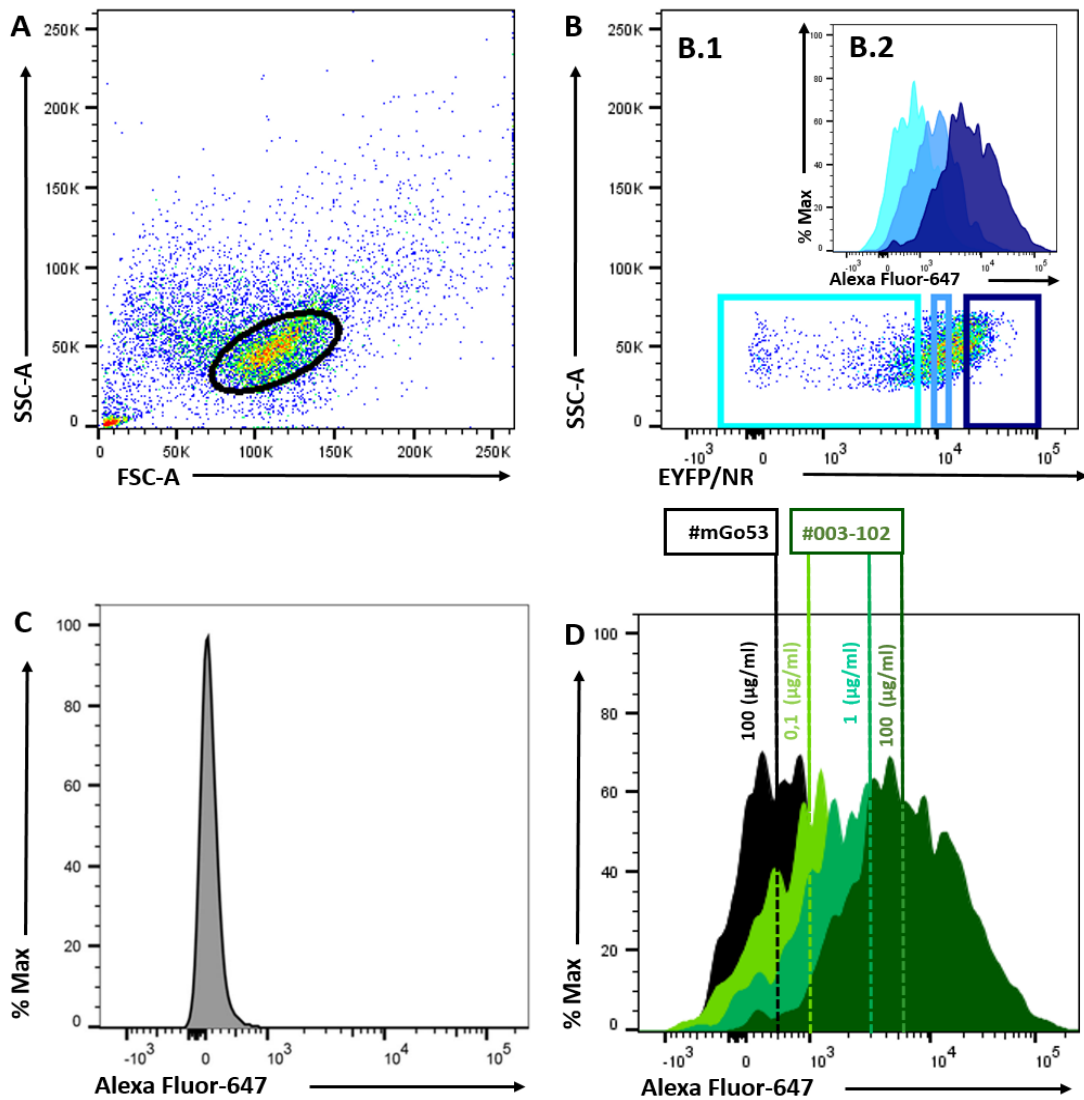


Abb. 2

Nachweis der Bindung monoklonaler humaner Anti-NR1 Autoantikörper an NR1 im Bindungsassay. Von den NR1-EYFP transfizierten HEK293-Zellen (a) wurden ausgehend vom EYFP-Fluoreszenzsignal diejenigen 20% selektiert mit der maximalen NR1-EYFP Expression (dunkelblaues Rechteck) (b). Anhand des NR1-reaktiven Antikörpers #003-102 wird dargestellt, wie das EYFP-Fluoreszenzsignal mit der NR1 Expression korreliert [b.2, niedrigste/median/höchste 20% EYFP Expression. Die jeweiligen Gates werden in b.1) in hell-/medium-/dunkelblau abgebildet], wohingegen NR1-reaktive Antikörper (hier dargestellt durch den Antikörper #003-102 bei einer Konzentration von 100 µg/ml) nicht an die Kontrollgruppe der HEK-Zellen, die lediglich mit EYFP transfiziert wurden, banden (c). Je nach Konzentration zeigte der NR1-reaktive Antikörper #003-102 eine Rechtsverschiebung der Fluoreszenzkurve (grün; 0,1; 1 und 100µg/ml) im Vergleich zum Hintergrund-Fluoreszenzsignal (schwarz; 100µg/ml) eines humanen monoklonalen Kontroll-Antikörpers #mGo53 [d, die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) ist als vertikale gepunktete Linie abgebildet].

Angelehnt an Fig. 1 aus [13]

Für die Messwerte aller fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimente wurden der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) errechnet. Die Daten wurden mit den Hill-Gleichungen unter der Verwendung von Igor Pro 6.37 (Wavemetrics, OR, USA) angepasst [13]. Hieraus ließen sich zwei Parameter erschließen, die zur Quantifizierung der relativen Antikörperaffinität genutzt werden: die maximale Fluoreszenzintensität MFI_{max} und die halb-maximale Bindungskonstante c_{50} , die die Antikörperkonzentration angibt, bei der 50% des MFI_{max} erreicht wird. Dabei gehen höhere MFI_{max} - und umgekehrt niedrigere c_{50} -Werte mit einer höheren Antikörperaffinität einher.

Durchflusszytometrie-basierte Zellassays mit Liquorproben

Die NR1-Antikörperavidität beschreibt die divalente Bindung des IgG Antikörpers an die NR1-Untereinheit unter der Präsenz anderer NR1-Antikörper in humanem Liquor. Um diese zu bestimmen, wurden Liquorproben von sechs Patienten mit NMDAR Enzephalitis zufällig ausgewählt. Zunächst wurde die absolute IgG-Konzentration im Liquor mittels ELISA bestimmt. Anschließend wurden für jede Patientenprobe Verdünnungsreihen (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) in FACS-Puffer angefertigt und davon jeweils 80µl in 96-Wellplatten transferiert. Wie oben bereits beschrieben wurden NR1-EYFP exprimierende HEK-Zellen und ein Zweitantikörper hinzugefügt und die Messung des Bindungsverhaltens mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Das Experiment wurde insgesamt drei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

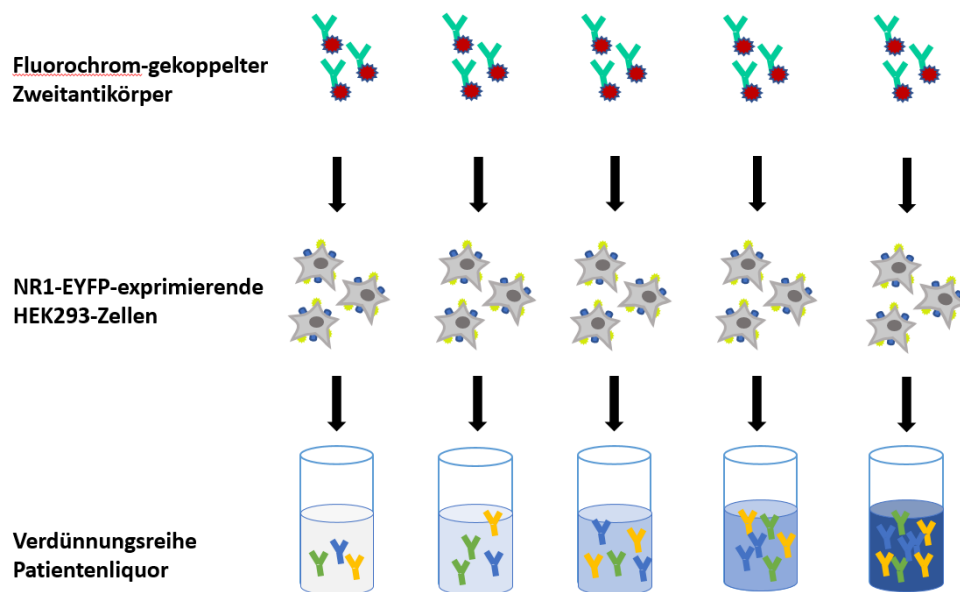


Abb. 3

Verdünnungsreihen von Liquorproben aus Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis wurden mit HEK293-Zellen, die mit der NR1-Untereinheit und dem enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) transfiziert wurden, inkubiert und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper versetzt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

Durchflusszytometrie-basierte Zellassays mit monoklonalen Anti-NR1-Antikörpern versetzten Kontrollliquorproben

Für diese Versuchsreihe wurden Kontrollliquorproben mit Verdünnungsreihen der monoklonalen Antikörper #003-102 und #007-168 versetzt. Die Kontrollliquorproben wurden aus Patienten mit benigner kranialer Hypertension zur Routinediagnostik entnommen. In den Proben ließen sich keine NMDA-Rezeptor Antikörper nachweisen. 20µl Liquor wurden in 96-Wellplatten transferiert und mit 20µl von im Liquor verdünnten monoklonalen Antikörpern #003-102 bzw. #007-168 versetzt, sodass Verdünnungsreihen mit Endkonzentrationen von 100 bis 0,01µg/ml entstanden. Nach 20-minütiger Inkubation wurden wie bereits oben beschrieben NR1-EYFP exprimierende HEK-Zellen und ein sekundärer Antikörper hinzugefügt und das Bindungsverhalten mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dieses Experiment wurde drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt.

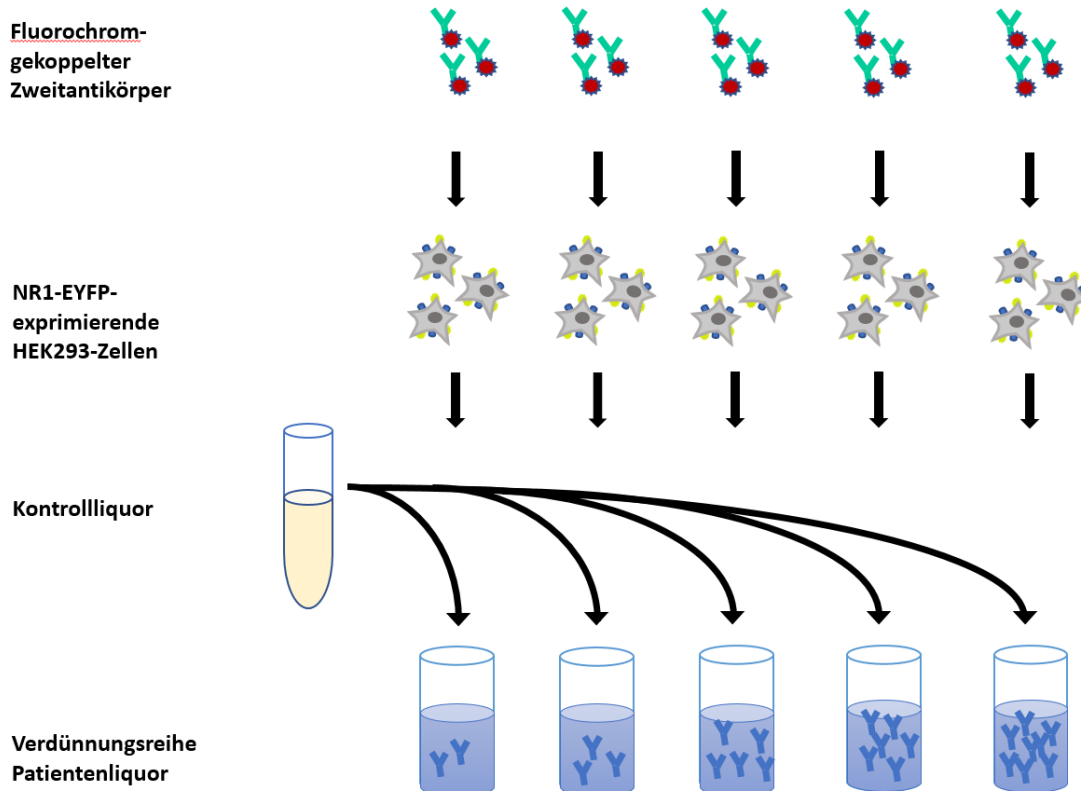


Abb. 4

Verdünnungsreihen von monoklonalen Antikörpern, versetzt mit Kontrollliquor aus einem Patienten mit idiopathischer kranieller Hypertension. Der Liquor wurde vorher negativ auf Anti-NMDA-Rezeptor Antikörper getestet. Die Proben wurden mit HEK293-Zellen, die mit der NR1-Untereinheit und dem enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) transfiziert wurden, inkubiert und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörper versetzt. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

2.3 Ergebnisse

Affinität monoklonaler humaner Antikörper

Fünf monoklonale humane NR1-Autoantikörper und zwei nicht-NR1-reaktive Kontroll-Antikörper vom gleichen Isotyp wurden auf NR1-EYFP exprimierenden HEK293-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Bindung der Antikörper an die HEK293-Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abb. 2 a-d). Hierbei konnte anhand des Bindungsverhaltens des monoklonalen Antikörpers eine

Korrelation der EYFP-Fluoreszenz mit der NR1-Expression der HEK293-Zellen dargestellt werden (Abb. 2b). Dagegen ließ sich jedoch keine Bindung der monoklonalen Antikörper an die Kontrollgruppe der EYFP-transfizierten HEK-Zellen nachweisen (Abb. 2c). Die monoklonalen NR1-Antikörper zeigten eine konzentrationsabhängige Verschiebung der durch die Bindung des sekundären Antikörpers generierten Fluoreszenzkurve (Abb. 2d, grün) und damit einhergehend einen Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität. Dahingegen banden die Kontroll-Antikörper nicht an die NR1-EYFP exprimierenden Zellen (Abb. 2d, schwarz) [13].

Die normalisierten MFI-Werte wurden jeweils gegen die Antikörperkonzentration aufgetragen (Abb. 5a). Es zeigte sich hierbei, dass beide Kontroll-Antikörper (#011-123, #mGo53) nicht an die NR1-EYFP-exprimierenden Zellen banden, wohingegen die NR1-reaktiven monoklonalen Antikörper eine konzentrationsabhängige sigmoidale Bindungskurve aufwiesen. Um die jeweiligen Affinitätsparameter quantifizieren zu können, wurden ausgehend von den erhobenen Daten die Sigmoidfunktionen mit der besten Anpassung berechnet (Abb. 5a) [13]. Je nach Antikörper zeigten sich unterschiedliche Bindungskurven mit Sättigungsplateaus bei MFI_{max} -Werten zwischen 0,23-1,17. Ebenso variierte die halb-maximale Konzentration c_{50} zwischen 1 und 74 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 1). Als am höchsten affin gegen die NR1 Untereinheit ließ sich der Antikörper #003-102 einstufen mit dem höchsten MFI_{max} und dem niedrigsten c_{50} . Darüber hinaus wurde untersucht, ob die MFI_{max} mit der Anzahl der Antikörpermutationen im Vergleich zur Keimbahnkonfiguration auf der DNA- (Abb. 5b; $R^2=0,017$) oder Proteinebene (Abb. 5c; $R^2=0,008$) korrelierte [13]. Dies ließ sich nicht bestätigen.

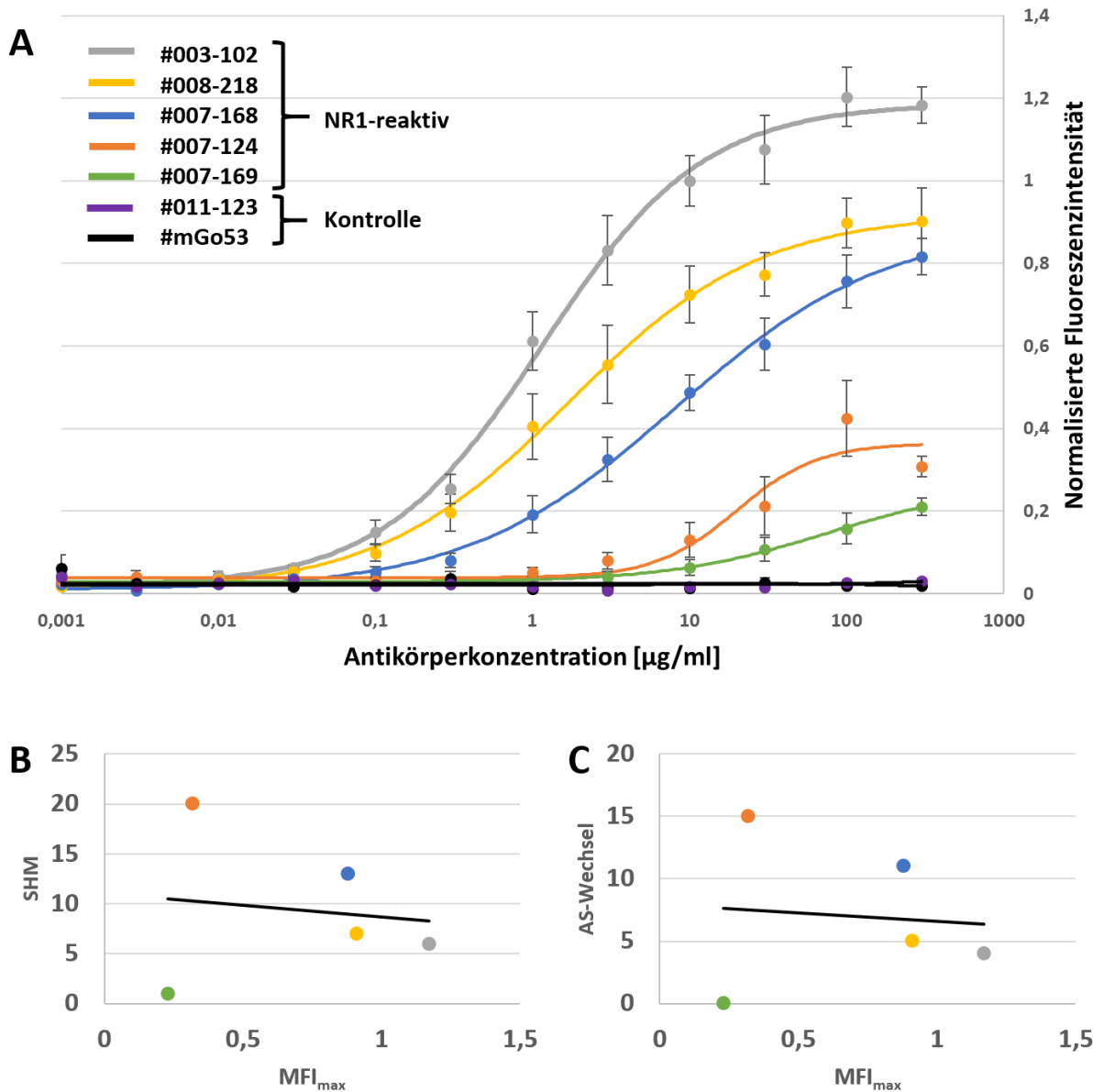


Abb. 5

Dargestellt sind die Bindungskurven von monoklonalen humanen Anti-NR1-Autoantikörpern. Die MFI aller Messungen wurden normalisiert und gegen die Konzentration der monoklonalen Antikörper aufgetragen ($MFI \pm SEM$). Anhand dieser Daten wurden Sigmoidfunktionen mit dem besten Fit erzeugt, die große Unterschiede in der NMDA-Rezeptor-Bindung zeigten (a). Die MFI_{max} korrelierte nicht mit der Anzahl der Mutationen in der Antigen-Bindungsstelle der NR1-Autoantikörper auf der DNA- (b; SHM somatische Hypermutationen) oder Proteinebene (c; AA-Aminosäuren).

Angelehnt an Fig. 2 aus [13]

Monoklonaler Antikörper	MFI _{max}	Bindungskonstante c_{50}
#003-102	1,17	1,16
#008-218	0,91	1,70
#007-168	0,88	8,17
#007-124	0,32	19,87
#007-169	0,23	74,05

Tabelle 1

MFI_{max}- und c_{50} -Werte der humanen monoklonalen Antikörper, welche die relative Affinität zum NR1-Protein widerspiegeln.

Angelehnt an Table 1 aus [13]

Bindungskurven der Patienten-Liquorproben

Im Liquor von Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis Patienten sind unbestimmte Mengen an niedrig- und hoch-affinen Anti-NMDA-Rezeptor-Antikörpern enthalten. Um die Avidität des aus polyklonalen Antikörpern zusammengesetzten Liquors gegenüber dem NR1-Protein zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen von sechs Patientenliquorproben angesetzt und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Hierbei erreichte keine der Kurven das Sättigungsplateau MFI_{max} (Abb. 6a). Dies lässt vermuten, dass die Konzentration an NR1-Antikörpern in den untersuchten Patientenliquoren nicht ausreichend hoch war, um eine Sättigung der NR1-Epitope zu erreichen. Demnach ließ sich der Affinitätsparameter c_{50} für diese Proben nicht erheben [13].

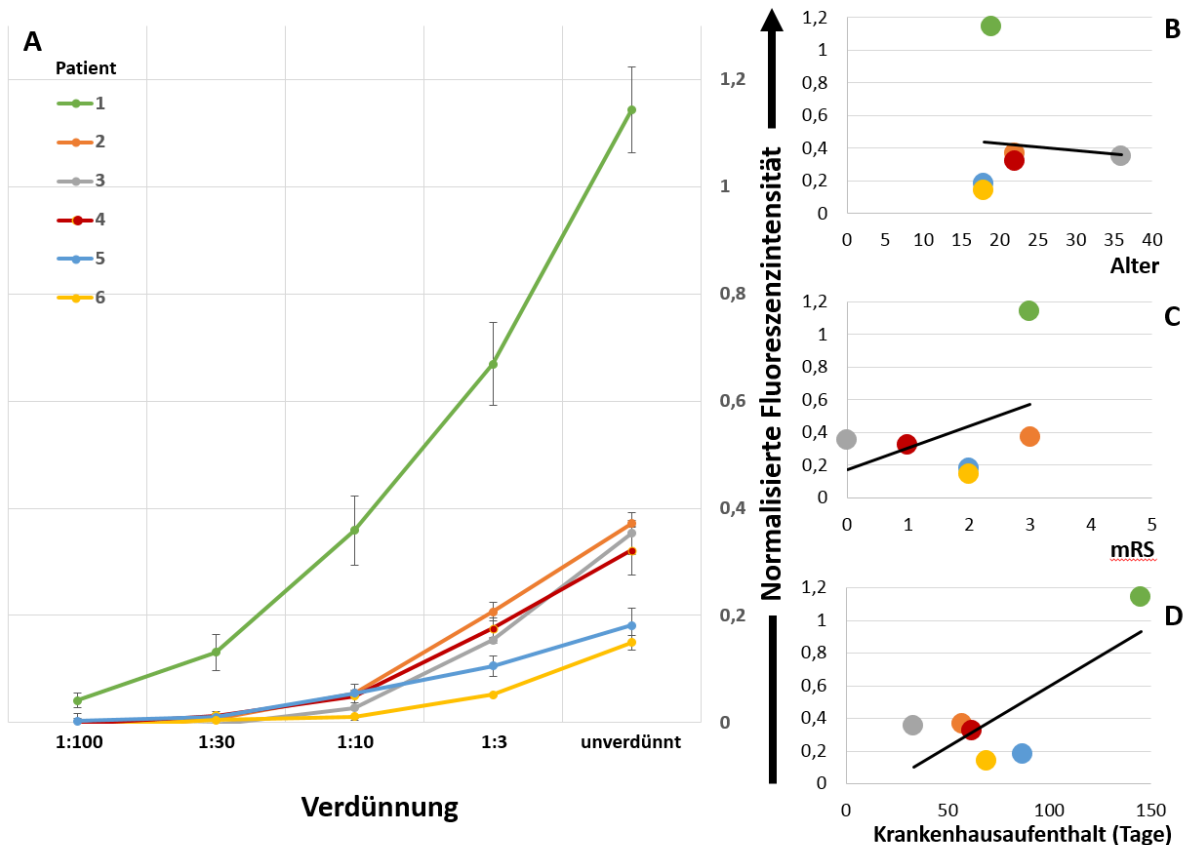


Abb. 6

Bindungskurven der Liquorproben aus Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis. Abgebildet sind die normalisierten MFI-Werte (\pm SEM) gegen das Verdünnungsverhältnis aufgetragen (a). Die Patientenliquores zeigen ein konzentrationsabhängiges Bindungsverhalten gegenüber NR1. Das MFI_{max} -Plateau wurde von keine der Bindungskurven erreicht. Dies lässt vermuten, dass die Konzentration an NR1-Antikörpern im Liquor unter dem Sättigungslevel der NR1-Epitope liegt. Demzufolge ließ sich der Affinitätsparameter c_{50} nicht berechnen. Die MFI korrelierte in dieser kleinen Patientenkohorte weder mit dem Patientenalter (b), der modifizierten Rankin Skala zum Zeitpunkt der Liquorakquisition (c), noch mit der Dauer des Krankenhausaufenthalts (d).

Angelehnt aus Fig. 3 aus [13]

Im unverdünnten Zustand erreichten die Liquorproben MFI-Werte zwischen 0,15 und 1,14. Bei den MFI-Werten handelt es sich um normalisierte Fluoreszenzsignale, die inter-experimentell nur geringe Abweichungen zeigten. Damit eröffnen sie eine interessante Herangehensweise, um eine bessere Vergleichbarkeit und damit Quantifizierung als beispielsweise die herkömmliche NMDA-Rezeptor Antikörpertiterbestimmung zwischen unterschiedlichen Laboratorien für klinische

Routineuntersuchungen bei Autoimmunenenzephalitis-Patienten zu gewährleisten. Die MFI korrelierte in der untersuchten kleinen Kohorte nicht mit klinischen Parametern wie dem Patientenalter (Abb. 6b; $R^2=0,008$), der modifizierten Rankin Skala zum Zeitpunkt der Liquorentnahme (Abb. 6c; $R^2=0,18$) und der Dauer des Krankenaufenthaltes (Abb. 6d; $R^2=0,62$) [13].

Während die Konzentration der monoklonalen Antikörper sich unkompliziert mittels ELISA ermitteln ließ, blieb die Konzentration der NR1-reaktiven Antikörper im Patientenliquor unbekannt. Unter der hypothetischen Annahme, dass ein einzelner monoklonaler Antikörper die Gesamtheit der NR1-spezifischen Antikörper im Patientenliquor ausmacht, wurde eine grobe Einschätzung der NR1-spezifischen Antikörperkonzentration im Liquor vorgenommen. Hierfür wurde verglichen, wie hoch die erforderliche Konzentration eines jeden monoklonalen NR1-reaktiven Antikörpers sein müsste, um einen gleich hohen MFI-Wert zu erzeugen wie die jeweilige unverdünnte Patientenliquorprobe (Tabelle 2). So erreichte der Liquor von Patient 4 eine MFI von 0,32. Ausgehend von der errechneten Sigmoidfunktion des jeweiligen monoklonalen Antikörpers ergab sich eine erforderliche Konzentration von 0,34 $\mu\text{g/ml}$ des Antikörpers #003-102. Dagegen wären 60,45 $\mu\text{g/ml}$ des schwächer affinen Antikörpers #007-124 vonnöten, um ein gleichwertiges MFI-Signal zu generieren. Diese benötigte Konzentration übertrifft jedoch bereits die Konzentration des Gesamt-IgG des Patienten 4. Einige der niedriger affinen monoklonalen Antikörper zeigten eine niedrigere MFI_{max} als die MFI des Patientenliquors, sodass diese von vornherein von dieser Berechnung ausgeschlossen werden konnten (z.B. der Antikörper #007-169 für die Patienten 1-4) [13].

Teilweise erreichte die MFI des unverdünnten Liquors so hohe Werte (Patient #6), dass selbst der monoklonale Antikörper mit der höchsten Affinität gegenüber NR1 (#003-102) in einer Konzentration vonnöten wäre, die die Konzentration des Gesamt-IgG des Liquors übersteigt. Die anderen monoklonalen Antikörper erreichten bei weitem nicht ein solch hohes MFI-Signal (Tabelle 2). Demnach muss der Liquor des Patienten #6 NR1-spezifische Antikörper enthalten, deren Affinität die der bisher untersuchten monoklonalen Antikörper übersteigt. Daraus lässt sich folgern, dass die Bindungssignale der untersuchten Patientenliquores vorwiegend durch hoch affine Antikörper generiert werden. Anhand der Berechnungen lässt sich ein

Konzentrationsbereich von NR1-Antikörpern zwischen 0,1 und 5 µg/ml im Patientenliquor abschätzen, was ungefähr 1-10% des Gesamt-IgG im Liquor entspricht (Tabelle 2). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass selbst modernen diagnostischen Verfahren wie beispielsweise zellbasierten Assays hohe Konzentrationen an niedrig affinen NR1-Antikörpern entgehen können [13].

Patient aus Abb. 3	Gesamt-IgG im Liquor (µg/ml)	MFI (Liquor, unverdünnt)	Konzentration monoklonaler Antikörper, die hypothetisch benötigt wird, um dem Liquor-MFI des Patienten zu entsprechen (µg/ml)				
			#003-102	#008-218	#007-168	#007-124	#007-169
1	12,60	1,14	48,40	-	-	-	-
2	21,40	0,37	0,43	0,95	4,63	-	-
3	43,90	0,35	0,39	0,84	4,00	127,59	-
4	50,30	0,32	0,34	0,68	3,19	60,45	-
5	n.b.	0,18	0,14	0,22	0,91	16,98	147,18
6	18,90	0,15	0,10	0,16	0,63	13,45	79,89

Tabelle 2

Die aus den Bindungskurven errechneten Konzentrationen der monoklonalen humanen Anti-NR1-Autoantikörper, die benötigt würden, um ein MFI-Signal zu erreichen, das gleichwertig ist zur MFI der unverdünnten Patientenliquorproben. In der Heatmap (rechts) sind die Konzentrationen abgebildet, die für jeden monoklonalen Antikörper benötigt würden, um eine Fluoreszenzintensität zu generieren, die dem Bindungssignal des unverdünnten Patientenliquors (links) entspricht. Größtenteils können die MFI der unverdünnten Patientenliquores durch die hoch affinen monoklonalen Antikörper reproduziert werden (zum Beispiel der Antikörper #003-102 für Patient 2-6), wohingegen eine so hohe Konzentration an niedrig affinen monoklonalen Antikörpern erforderlich wäre (Antikörperkonzentrationen in orange bis dunkelrot), dass diese die Gesamt-IgG Konzentration im jeweiligen Patientenliquor überschreiten würde (zum Beispiel Antikörper #007-169 in der rechten Spalte). Demzufolge können diese niedrig affinen monoklonalen Antikörper die Fluoreszenzsignale des Patientenliquors nicht erklären.

n.b. nicht bestimmt

Angelehnt an Table 2 aus [13]

Einfluss der Liquorzusammensetzung auf das Bindungsverhalten von NR1-Autoantikörpern

Abgesehen von der Antikörperaffinität können auch andere biophysikalische Faktoren maßgeblich das Bindungsverhalten der NR1-Antikörper und damit auch deren pathophysiologische Eigenschaften beeinflussen. Um zu untersuchen, ob die Zusammensetzung des Liquors sich auf die Bindungskurven der monoklonalen Antikörper auswirkt, wurden Verdünnungsreihen zweier monoklonaler NR1-Antikörper angefertigt und mit Kontrollliquor eines Patienten mit benigner intrakranieller Hypertension versetzt. Es zeigte sich tatsächlich, dass die Bindungskurve des monoklonalen Antikörpers #003-102 nach Hinzufügen des Kontrollliquors eine ausgeprägte Linksverschiebung mit einer ca. dreifachen Reduktion der halbmaximalen Bindungskonstante c_{50} aufwies (Abb. 7, blauer Pfeil). Dahingegen ließ sich bei dem Antikörper #007-168 der gegenteilige Effekt beobachten. In der identischen Kontrollliquorprobe zeigte die Bindungskurve dieses Antikörpers eine deutliche Rechtsverschiebung mit einem etwa dreifachen Anstieg von c_{50} (Abb. 7, grüner Pfeil). Während also für den Antikörper #003-102 eine niedrigere Antikörperkonzentration im Kontrollliquor erforderlich war, um die gleiche MFI zu erzeugen, zeigte #007-168 im gleichen Milieu eine gleichwertig hohe MFI erst bei deutlich höheren Antikörperkonzentrationen. Folglich können abgesehen von der Antikörperaffinität auch andere Faktoren wie die Komposition des Liquors, beispielsweise die Zusammensetzung aus Albuminen und Globulinen, das Fluoreszenzsignal in etablierten diagnostischen Untersuchungen auf unterschiedlichste Art und Weise, in diesem Fall in entgegengesetzter Richtung, beeinflussen [13].

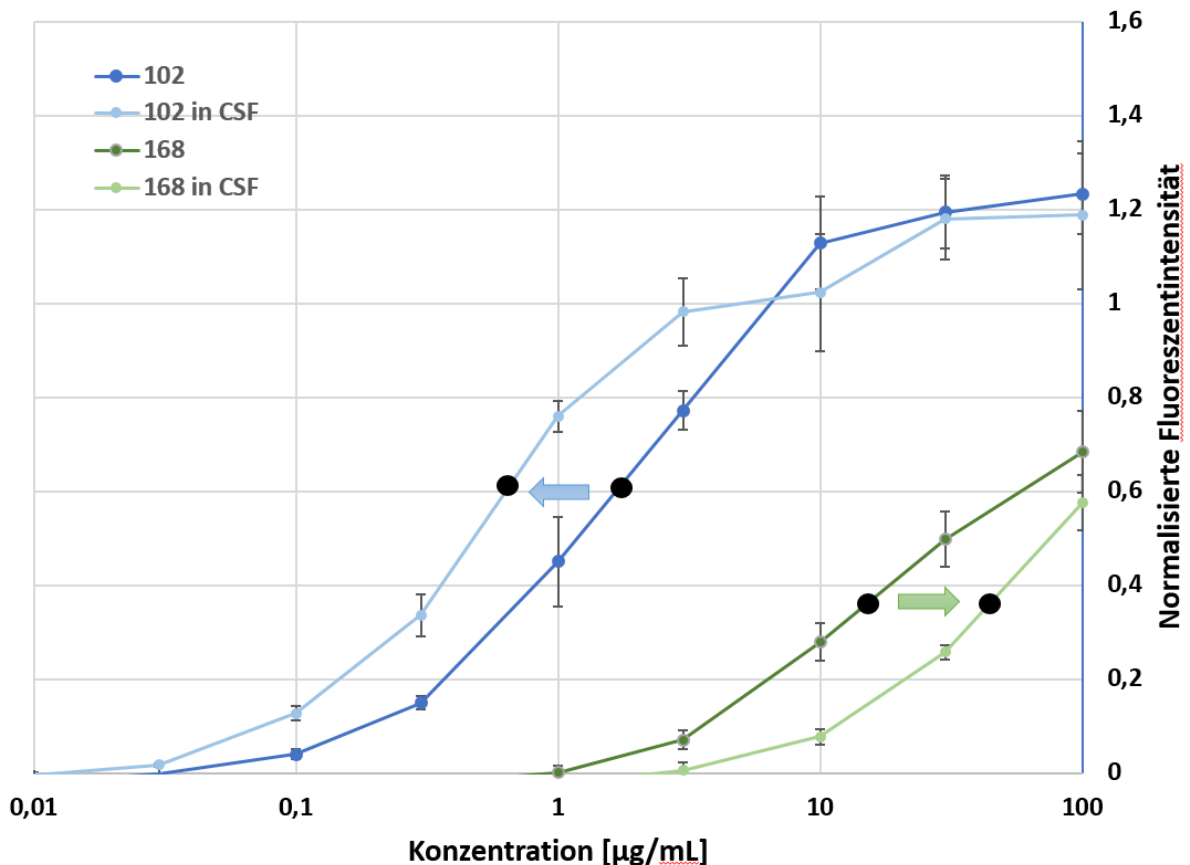


Abb. 7

Bindungskurven der humanen monoklonalen NR1-Autoantikörper in Liquor verdünnt. Die Bindungskonstante c_{50} zeigte sich deutlich reduziert (blauer Pfeil) bzw. erhöht (grüner Pfeil) je nachdem welcher monoklonale NR1-Autoantikörper im ansonsten identischen Kontrollliquor verdünnt wurde.

Angelehnt an Fig. 4 aus [13]

2.4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte das Bindungsverhalten von monoklonalen NMDA-Rezeptor-Autoantikörpern in Form von Bindungskurven dargestellt und charakterisiert werden. Unter Verwendung von NR1-exprimierenden HEK293-Zellen in zellbasierten Assays und Analyse mittels Durchflusszytometrie konnten Bindungskurven für die individuellen monoklonalen Antikörper generiert werden. Anhand dieser Kurven gelang es, Affinitätsparameter für die untersuchten Antikörper zu berechnen. Hierfür wurde zum einen die maximale Bindungskapazität MFI_{max} bei Erreichen des

Sättigungsplateaus und die halb-maximale Antikörperkonzentration c_{50} bestimmt. Diese Parameter erlaubten es, die Antikörper hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber NR1 zu vergleichen [13]. Für eine exakte Berechnung der Affinität, welche üblicherweise durch die Dissoziationskonstante K_d ausgedrückt wird, würden weitere Daten benötigt werden wie die Konzentration freier Antikörper, die jedoch in dieser Studie nicht behandelt wurde [14]. Die Dissoziationskonstante K_d ließe sich mit präziseren Methoden wie der Oberflächenplasmonresonanz bestimmen, die eine Affinitätsmessung in Echtzeit ermöglichen und darüber hinaus eine Antikörpermarkierung umgehen könnte. Damit ließen sich auch Affinitätsanalysen in größeren Patientenkohorten durchführen, um Fragestellungen, die sich aus der vorliegenden Studie ergeben, zu vertiefen, beispielsweise, ob die Berücksichtigung einer Kombination aus Antikörpertiter und -affinität eine bessere Prognose liefert als die herkömmliche alleinige Titerbestimmung [13]. Dass die Antikörperaffinität tatsächlich einen wesentlichen Einfluss auf den Erkrankungsverlauf haben kann, zeigte sich bereits bei verwandten neurologischen Autoimmunerkrankungen. Beim Guillain-Barré Syndrom ließ sich beispielsweise ein Zusammenhang zwischen der Affinität von Anti-GM1-Antikörpern mit dem Erkrankungsbeginn feststellen. So schien sich das Krankheitsbild erst bei Überschreiten einer gewissen Affinitätsschwelle zu manifestieren [15]. Die derzeitige Studienlage erlaubt bisher keine genaueren Rückschlüsse auf den Zusammenhang einer Affinitätsschwelle und den Einfluss der Affinitätsreifung der Antikörper auf die Entstehung des Krankheitsbildes in der Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis. Es zeigte sich jedoch, dass bisher untersuchte Anti-NMDA-Rezeptor-Antikörper nur wenige bis keine somatische Hypermutationen durchliefen [9]. Dabei ließen sich bei Rückführung in den unmutierten Keimbahnzustand nur minimale Veränderungen in der Affinität nachweisen [16]. Interessanterweise konnte eine weitere Studie eine signifikante Reduktion von NR1-reaktiven CD_4^+ T_H -Zellen in Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis nachweisen [17]. Vor dem Hintergrund, dass die T_H -Zellpopulation üblicherweise maßgeblich an der Affinitätsreifung und damit einhergehend der Verstärkung der Antikörperreaktion beteiligt ist, stellt sich die Frage, ob und inwiefern die Affinitätsreifung das Krankheitsbild und die Entstehung der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis beeinflusst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheinen darauf hinzudeuten, dass das Antikörpersignal, das in diagnostischen Tests beobachtet wird, hauptsächlich durch hoch affine Antikörper generiert wird. Betrachtet man die niedrig affinen Antikörper, wären, um ein dem Patientenliquor gleichwertig hohes Fluoreszenzsignal zu erzeugen, derart hohe Konzentrationen nötig, dass diese das Gesamt-IgG im Liquor übersteigen würden. Vorausgesetzt, dass niedrig affine NR1-Antikörper im Liquor ohne zusätzlich hoch affine Antikörper im Patientenliquor existieren (was bisher ungeklärt ist), könnten diese demnach in zellbasierten Assays unentdeckt bleiben. Dies wiederum wirft die Frage auf, ob niedrig affine Antikörper allein die Erkrankung induzieren bzw. zu subtilen klinischen Symptomen führen können, die bisher nicht als NR1-Autoimmunität klassifiziert wurden [13]. Unter der Annahme, dass Plasmazellen im Hirnparenchym lokal hohe Konzentrationen an niedrig affinen Antikörpern produzieren, die unter längerer Exposition Veränderungen an Synapsen, beispielsweise durch Herunterregulation von NMDA-Rezeptoren [9], wäre dies vorstellbar. Unterstützt würde diese Hypothese durch den Nachweis, dass selbst Keimbahn-nahe NR1-Antikörper, die eine geringere Bindungsstärke zur NR1-Untereinheit aufwiesen als Antikörper mit somatischen Hypermutationen, ebenfalls eine Reduktion in den synaptischen NMDA-Rezeptor-Strömen bewirkten [16].

Bisher stellt die Bestimmung von Antikörpertitern einen wesentlichen Bestandteil der klinischen Diagnostik bei Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis dar. Allerdings erlauben Variablen wie die Expressionsrate des NR1-Proteins in zellbasierten Assays, abweichende Inkubationszeiten und die subjektive Bestimmung der Fluoreszenzintensität nur eine geringe Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Laboren. Diese Problematik könnte die Normalisierung der Daten wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, überwinden. Durch den Einsatz eines Assay-Standards, der sich aus einer vorher exakt bestimmten Konzentration an monoklonalen humanen Antikörpern zusammensetzt, können menschliche Liquorproben mit diesem Referenzwert und damit mit anderen Proben in Vergleich gesetzt werden. Mit dieser Vorgehensweise wird der NR1-Antikörpertiter gewissermaßen reproduziert mit nur geringen Abweichungen bei wiederholten Messungen, was ideale Voraussetzungen sowohl für die klinische Verlaufsdagnostik als auch für Untersuchungen in größeren Patientenkohorten schafft [13].

Des Weiteren deuten die Daten aus der vorliegenden Studie darauf hin, dass die Liquorzusammensetzung das Bindungsverhalten der NR1-Autoantikörper maßgeblich und sogar in entgegengesetzter Weise beeinflussen kann. Aus dieser Arbeit wird nicht ersichtlich, welche Liquorproteine genau in welchem Umfang die Antigen-Antikörper-Interaktion beeinflussen. Es ist jedoch denkbar, dass bestimmte Liquorproteine wie Albumin oder Globuline, die zu den häufigsten Proteinen im nicht-entzündlichen Liquor zählen, unterschiedlich an NR1-Antikörper binden und auf diese Weise die Bindung an den NMDA-Rezeptor beeinträchtigen. Da die untersuchten monoklonalen Antikörper über den identischen Fc-Teil verfügen, würde es sich dabei wahrscheinlich nicht um eine über Fc-Rezeptoren vermittelte Proteinbindung handeln. Vor dem Hintergrund, dass die Zusammensetzung und die Proteinkonzentration des Liquors in Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis ständigen Veränderungen unterliegt – sei es durch die Inflammation bedingt oder aufgrund der Effekte einer therapeutischen Apherese – ist anzunehmen, dass die oben beschriebenen Effekte einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die NR1-Antikörperfunktion bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis haben [13].

Zusammengefasst konnte diese Studie das Bindungsverhalten von NMDA-Rezeptor Autoantikörpern reproduzierbar charakterisieren und quantifizieren. Diese Methoden sollten auf große Patientenkohorten angewendet werden, um das Verständnis für die Pathogenese und das Krankheitsbild der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis zu vertiefen. Insbesondere kann die klinische Diagnostik mithilfe der vorliegenden Daten im Hinblick auf den Antikörpernachweis optimiert werden und zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs und zur Prognosestellung herangezogen werden. Übergreifend können diese Untersuchungen auch auf andere Formen von Autoimmunenzephalitiden angewendet werden.

2.5 Literaturverzeichnis

1. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, Schuster FL, Christie LJ, Tureen JH. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2006 Dec 15;43(12):1565-77. doi: 10.1086/509330.
2. Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, Baehring JM, Shimazaki H, Koide R, King D, Mason W, Sansing LH, Dichter MA, Rosenfeld MR, Lynch DR. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol*. 2007 Jan;61(1):25-36. doi: 10.1002/ana.21050.
3. Wingfield T, McHugh C, Vas A, Richardson A, Wilkins E, Bonington A, Varma A. Autoimmune encephalitis: a case series and comprehensive review of the literature. *QJM*. 2011 Nov;104(11):921-31. doi: 10.1093/qjmed/hcr111.
4. Armangue T, Leypoldt F, Dalmau J. Autoimmune encephalitis as differential diagnosis of infectious encephalitis. *Curr Opin Neurol*. 2014 Jun;27(3):361-8. doi: 10.1097/WCO.000000000000087.
5. Dalmau J. [Anti-NMDA receptor encephalitis: pathogenic mechanisms and treatment algorithm]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2012;52(11):978. Japanese. doi: 10.5692/clinicalneuro.52.978.
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. *Clin Infect Dis*. 2012 Apr;54(7):899-904. doi: 10.1093/cid/cir1038.
7. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*. 2008 Dec;7(12):1091-8. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70224-2.
8. Planaguma J, Leypoldt F, Mannara F, Gutierrez-Cuesta J, Martin-Garcia E, Aguilar E, Titulaer MJ, Petit-Pedrol M, Jain A, Balice-Gordon R, Lakadamyali M, Graus F, Maldonado R, Dalmau J. Human N-methyl d-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain*. 2015;138:94–109. doi: 10.1093/brain/awu310.

9. 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, Prüss H. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain*. 2016;139:2641–2652. doi: 10.1093/brain/aww208.
10. Malviya M, Barman S, Golombeck KS, Planaguma J, Mannara F, Strutz-Seebohm N, Wrzos C, Demir F, Baksmeier C, Steckel J, Falk KK, Gross CC, Kovac S, Bonte K, Johnen A, Wandinger KP, Martin-Garcia E, Becker AJ, Elger CE, Klocker N, Wiendl H, Meuth SG, Hartung HP, Seebohm G, Leypoldt F, Maldonado R, Stadelmann C, Dalmau J, Melzer N, Goebels N. NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol*. 2017;4:768–783. doi: 10.1002/acn3.444.
11. Leypoldt F, Titulaer MJ, Aguilar E, Walther J, Bönstrup M, Havemeister S, Teegen B, Lütgehetmann M, Rosenkranz M, Magnus T, Dalmau J. Herpes simplex virus-1 encephalitis can trigger anti-NMDA receptor encephalitis: case report. *Neurology*. 2013 Oct 29;81(18):1637-9. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a9f531.
12. Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, Gleichman AJ, Balice-Gordon R, Rosenfeld MR, Lynch D, Graus F, Dalmau J. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol*. 2014 Feb;13(2):167-77. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70282-5.
13. Ly LT, Kreye J, Jurek B, Leubner J, Scheibe F, Lemcke J, Wenke NK, Reincke SM, Prüss H. Affinities of human NMDA receptor autoantibodies: implications for disease mechanisms and clinical diagnostics. *J Neurol*. 2018 Nov;265(11):2625-2632. doi: 10.1007/s00415-018-9042-1.
14. Rathanaswami P, Babcook J, Gallo M. High-affinity binding measurements of antibodies to cell-surface-expressed antigens. *Anal Biochem*. 2008;373:52–60. doi: 10.1016/j.ab.2007.08.014.
15. Lopez PH, Villa AM, Sica RE, Nores GA. High affinity as a disease determinant factor in anti-GM(1) antibodies: comparative characterization of experimentally induced vs. disease-associated antibodies. *J Neuroimmunol*. 2002;128:69–76. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00139-X.

16. Wenke NK, Kreye J, Andrzejak E, van Casteren A, Leubner J, Murgueitio MS, Reincke SM, Secker C, Schmidl L, Geis C, Ackermann F, Nikolaus M, Garner CC, Wardemann H, Wolber G, Prüss H. N-methyl-D-aspartate receptor dysfunction by unmutated human antibodies against the NR1 subunit. *Ann Neurol*. 2019 May;85(5):771-776. doi: 10.1002/ana.25460.
17. Dao LM, Machule ML, Bacher P, Hoffmann J, Ly LT, Wegner F, Scheffold A, Prüss H. Decreased inflammatory cytokine production of antigen-specific CD4+ T cells in NMDA receptor encephalitis. *J Neurol*. 2021 Jan 13. doi: 10.1007/s00415-020-10371-y.

3 Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

Eidensstattliche Versicherung

„Ich, Lam-Thanh Ly, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Affinitätsanalyse von Autoantikörpern bei Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis/ Affinity analysis of auto-antibodies in NMDAR 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) 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.“

24.03.2021

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen der Promotionsverfahren zum PhD bzw. MD/PhD

Publikation:

Ly LT, Kreye J, Jurek B, Leubner J, Scheibe F, Lemcke J, Wenke NK, Reincke SM, Prüss H. Affinities of human NMDA receptor autoantibodies: implications for disease mechanisms and clinical diagnostics. J Neurol. 2018 Nov;265(11):2625-2632. doi: 10.1007/s00415-018-9042-1.

Beitrag im Einzelnen:

Die Abbildungen 1,3 und 4 fertigte ich selbst an. Aus meiner statistischen Auswertung sind die Abbildungen 2, 5, 6, 7 und die Tabellen 1 und 2 entstanden. Diese fertigte ich selbstständig und eigens für die vorliegende Arbeit, jedoch angelehnt an die oben genannte Publikation an.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

4 Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2016** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"CLINICAL NEUROLOGY"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 194 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	LANCET NEUROLOGY	24,566	26.284	0.065630
2	Nature Reviews Neurology	6,557	20.257	0.027000
3	ACTA NEUROPATHOLOGICA	16,462	12.213	0.037060
4	BRAIN	48,061	10.292	0.077590
5	JAMA Neurology	5,105	10.029	0.027000
6	ANNALS OF NEUROLOGY	34,215	9.890	0.057310
7	Alzheimers & Dementia	8,125	9.478	0.032140
8	SLEEP MEDICINE REVIEWS	4,980	8.958	0.009730
9	NEURO-ONCOLOGY	8,326	7.786	0.024280
10	NEUROLOGY	81,843	7.592	0.115120
11	NEUROSCIENTIST	4,325	7.391	0.009890
12	JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY AND PSYCHIATRY	27,955	7.349	0.034720
13	MOVEMENT DISORDERS	23,012	7.072	0.036590
14	Alzheimers Research & Therapy	1,699	6.196	0.007180
15	Brain Stimulation	3,905	6.078	0.013020
16	STROKE	60,469	6.032	0.093650
17	Epilepsy Currents	644	5.625	0.001650
18	Journal of Stroke	505	5.576	0.002400
19	PAIN	35,333	5.445	0.044460
20	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,413	5.347	0.006400
21	EPILEPSIA	24,716	5.295	0.036800
22	BRAIN PATHOLOGY	4,580	5.272	0.008450
23	JOURNAL OF NEUROTRAUMA	12,787	5.190	0.021640
24	Neurotherapeutics	3,451	5.166	0.008220
25	SLEEP	18,127	4.923	0.026090
26	NEUROSURGERY	30,206	4.889	0.028560
27	Multiple Sclerosis Journal	9,727	4.840	0.023240
28	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	6,082	4.712	0.015310
29	CURRENT OPINION IN NEUROLOGY	5,258	4.699	0.011490
30	BIPOLAR DISORDERS	5,323	4.531	0.009660
31	JOURNAL OF PAIN	8,312	4.519	0.018540
32	PARKINSONISM & RELATED DISORDERS	7,192	4.484	0.018090
33	CNS DRUGS	4,211	4.394	0.008200
34	EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	6,575	4.239	0.015920
35	Therapeutic Advances in Neurological Disorders	753	4.192	0.002510
36	PROGRESS IN NEURO- PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	9,740	4.187	0.016310

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
37	JOURNAL OF PSYCHOPHARMACOLOGY	5,518	4.179	0.012020
38	NEUROREHABILITATION AND NEURAL REPAIR	4,335	4.107	0.010240
39	JOURNAL OF NEUROSURGERY	31,534	4.059	0.029870
40	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY	9,137	3.988	0.018850
41	JOURNAL OF NEUROSURGICAL ANESTHESIOLOGY	1,469	3.925	0.002170
42	Annals of Clinical and Translational Neurology	902	3.901	0.004880
43	CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY	17,871	3.866	0.021920
44	NEUROGASTROENTEROLOGY AND MOTILITY	6,608	3.617	0.016200
45	CEPHALALGIA	7,932	3.609	0.011650
46	CNS SPECTRUMS	2,114	3.589	0.002760
47	Journal of Neurodevelopmental Disorders	825	3.582	0.003040
48	JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN	2,141	3.580	0.004980
49	EUROPEAN ARCHIVES OF PSYCHIATRY AND CLINICAL NEUROSCIENCE	3,647	3.569	0.005490
50	Frontiers in Neurology	3,192	3.552	0.014480
51	AMERICAN JOURNAL OF NEURORADIOLOGY	21,720	3.550	0.032180
52	DEMENTIA AND GERIATRIC COGNITIVE DISORDERS	4,681	3.511	0.006300
53	JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY	8,483	3.503	0.009270
54	CLINICAL JOURNAL OF PAIN	6,409	3.492	0.011290
55	JOURNAL OF AFFECTIVE DISORDERS	23,719	3.432	0.049990
56	Journal of Clinical Sleep Medicine	4,391	3.429	0.011020
57	BRAIN TOPOGRAPHY	2,155	3.394	0.004500
58	SLEEP MEDICINE	7,763	3.391	0.016290
59	JOURNAL OF NEUROLOGY	12,829	3.389	0.025320
60	Current Neurology and Neuroscience Reports	2,294	3.345	0.006630
61	NEUROGENETICS	1,081	3.269	0.002990
62	JOURNAL OF SLEEP RESEARCH	4,390	3.259	0.006910
63	JOURNAL OF HEAD TRAUMA REHABILITATION	3,814	3.214	0.005230
64	Expert Review of Neurotherapeutics	3,447	3.149	0.007760
65	Neurosurgical Focus	5,576	3.139	0.009620
66	DEVELOPMENTAL MEDICINE AND CHILD NEUROLOGY	10,370	3.116	0.013770
67	ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA	6,167	3.087	0.007780
68	Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration	2,908	3.054	0.006910
69	EUROPEAN JOURNAL OF PAIN	6,221	3.019	0.011280
70	JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY	9,765	2.980	0.017910
71	CEREBROVASCULAR DISEASES	5,503	2.974	0.009910

5 Publikation

Journal of Neurology (2018) 265:2625–2632
https://doi.org/10.1007/s00415-018-9042-1

ORIGINAL COMMUNICATION



Affinities of human NMDA receptor autoantibodies: implications for disease mechanisms and clinical diagnostics

Lam-Thanh Ly^{1,2} · Jakob Kreye^{1,2} · Betty Jurek^{1,2} · Jonas Leubner^{1,2} · Franziska Scheibe² · Johannes Lemcke³ · Nina Kerstin Wenke^{1,2} · Sebastian Momsen Reincke^{1,2} · Harald Prüss^{1,2}

Received: 11 June 2018 / Revised: 27 August 2018 / Accepted: 29 August 2018 / Published online: 5 September 2018
© The Author(s) 2018

Abstract

Anti-*N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a common autoimmune encephalitis presenting with psychosis, dyskinesias, autonomic dysfunction and seizures. The underlying autoantibodies against the NR1 subunit are directly pathogenic by disrupting synaptic NMDAR currents. However, antibody titers correlate only partially with the clinical outcome, suggesting the relevance of other factors such as antibody affinity. We thus determined the binding curves of human monoclonal autoantibodies and patients' cerebrospinal fluid (CSF) against NR1-expressing HEK293 cells using flow cytometry. Antibody affinity was highly variable with binding constants (half-maximal concentration, c_{50}) ranging from 1 to 74 $\mu\text{g/ml}$ for monoclonal antibodies. Comparing values of individual monoclonal antibodies with human CSF samples suggested that the CSF signal is predominantly represented by higher-affinity antibodies, potentially in a concentration range of NR1 antibodies between 0.1 and 5 $\mu\text{g/ml}$, roughly reflecting 1–10% of total CSF IgG in NMDAR encephalitis. Binding curves further depended on the CSF composition which must be considered when interpreting established clinical routine assays. Normalization of measurements using reference samples allowed high reproducibility. Accurate and reproducible measurement of NR1 antibody binding suggested that biophysical properties of the antibody might contribute to disease severity. Normalization of the data can be an elegant way to allow comparable inter-laboratory quantification of CSF NR1 antibody titers in autoimmune encephalitis patients, a prerequisite for use as surrogate markers in clinical trials. Based on our calculations, low-affinity antibodies can easily remain undetected in routine cell-based assays, indicating that their relation to clinical symptoms should be analyzed in future studies.

Keywords NMDA receptor encephalitis · Antibody affinity · Human monoclonal antibody · Cerebrospinal fluid · Flow cytometry

Introduction

Anti-*N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a common autoimmune encephalitis presenting with psychosis, amnesia and dyskinesias, often progressing to severe autonomic dysfunction, seizures and reduced levels of

consciousness requiring prolonged intensive care treatment [7]. The underlying autoantibodies target the aminoterminal domain of the NR1 subunit of NMDAR, and intrathecal injection of purified IgG from patients with NMDAR encephalitis led to behavioral abnormalities in mice compatible with the human disease [5]. Finally, the cloning, recombinant production and functional testing of cerebrospinal fluid (CSF)-derived monoclonal antibodies against NR1 confirmed that the antibodies are directly pathogenic by down-regulating neuronal NMDAR and disrupting synaptic NMDAR currents [2, 4].

Despite some intra-individual correlation between CSF NR1 antibody titers and clinical course in patients with good outcome [1], the titer correlation between different patients is poor, i.e., patients requiring several months of ICU therapy including mechanical ventilation may have lower

✉ Harald Prüss
harald.pruess@charite.de

¹ German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE)
Berlin, Berlin, Germany

² Department of Neurology and Experimental Neurology,
Charité-Universitätsmedizin Berlin, CharitéCrossOver
(CCO), R. 4-334, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany

³ Department of Neurosurgery, Unfallkrankenhaus Berlin,
Berlin, Germany

NR1 antibody titers than patients with mild disease. This finding suggests the relevance of other parameters which could include biophysical properties of the antibody itself, such as antibody affinity or epitope binding, or antibody-independent factors, such as the patient-specific glutamate receptor turnover.

We therefore aimed to determine the affinity of human autoantibodies against NR1, which has become technically possible only after the generation of a panel of patient-derived monoclonal NR1 antibodies [2]. Antibody affinity defines the strength of interaction between an epitope (in this case the NMDAR) and the antigen-binding site of an antibody. The higher the affinity, the more the antibody is bound to its antigen at equilibrium. Thus, a high-affinity NR1-reactive autoantibody could potentially be much more pathogenic compared to a low-affinity autoantibody. For this, we applied binding analyses of human monoclonal antibodies and patients' CSF against NR1-expressing HEK293 cells with flow cytometry, asking for the binding curves of individual antibodies and whole CSF, and estimation of specific NR1 antibody concentrations in human samples.

Methods

Monoclonal antibodies

Five monoclonal human NR1 antibodies from three patients (#003-102, #007-124, #007-168, #007-169, #008-218) were selected from a panel of CSF-derived monoclonal antibodies of patients with typical NMDAR encephalitis described previously [2]. Antibodies were generated by single antibody-secreting cell cloning of full-length immunoglobulin G (IgG) variable heavy and light chain genes and showed the characteristic binding to NR1-expressing human embryonic kidney (HEK293) cells and to murine brain sections. Isotype-matched non-NR1 control antibodies were derived from the same study, including an antibody not reactive to human tissues (#mGo53) [8] and an astrocyte-reactive human antibody (#011-123) [2].

Flow cytometry (FACS)-based assay using monoclonal antibodies

IgG concentrations of the monoclonal human antibodies were determined with ELISA (Mabtech). Serial dilutions of each antibody were prepared in a 96-well plate, containing 80 μ l per well, giving a final concentration of 300–0.001 μ g/ml in FACS buffer (1% heat-inactivated fetal bovine serum (FCS) in phosphate-buffered saline (PBS)).

HEK293 cells were transfected with an NR1–EYFP plasmid which encodes the NMDAR NR1 subunit and enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) without stop codon plus

a geneticin resistance gene. The NR1–EYFP fusion protein was expressed in culture in DMEM supplemented with 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 U/ml streptomycin and 800 μ g/ml geneticin. For control experiments, EYFP was transiently transfected without NR1. HEK293 cells were harvested after washing with PBS and detachment with 0.5% trypsin/EDTA, washed again with PBS, centrifuged at 1700 RPM for 5 min and resuspended in ice-cold FACS buffer at a concentration of 15,000 cells/ μ l. 20 μ l was added to the 96-well plate for a total of 300,000 cells/well and mixed with the monoclonal antibody solution.

Cells were incubated on ice for 45 min, washed with FACS buffer and centrifuged. After removing the supernatant, the secondary antibody (goat anti-human Alexa Fluor-647 [Life Technologies], 1:400 in FACS buffer) was added and incubated on ice for 20 min. Washing steps were repeated, cells resuspended in FACS buffer and transferred into FACS tubes placed on ice until FACS measurement on a BD FACS-Canto-II machine. The entire experiment was independently replicated 5 times.

Affinity calculation

For flow cytometry analysis, EYFP expression was used to determine NR1–EYFP protein expression (Fig. 1). To reduce background and increase the signal-to-noise ratio, we restricted our analysis to the relatively homogeneous 20% subpopulation of cells with the highest NR1–EYFP expression. Of these cells, the Alexa Fluor-647 median fluorescence intensity (MFI) was determined, representing the binding of monoclonal NR1 antibodies. Background fluorescence was subtracted from each MFI (Alexa Fluor-647 signal of #mGo53 control antibody). MFI was normalized to reduce inter-experiment variabilities. For this, in every experiment the MFIs of the monoclonal antibodies #003-102 and #007-168 were determined at a concentration of 300 μ g/ml, and the mean of both values considered as control value ($MFI_{control}$). This value served as an internal control for all other measurements, similar to a calibration/standard sample in most common assays such as ELISAs. MFI of each sample (MFI_{sample}) was then normalized to this value by the equation $MFI_{normalized} = MFI_{sample} / MFI_{control}$.

Data from all independent experiments were averaged and standard error of the mean (SEM) calculated. The data were fit with Hill equations using Igor Pro 6.37 (Wavemetrics, OR, USA), resulting in two parameters for quantification of relative antibody affinity: the maximum fluorescence intensity MFI_{max} and the half-maximal binding constant c_{50} representing the antibody concentration where 50% of MFI_{max} was reached. Both numbers provide a measure of relative affinity, with higher values of MFI_{max} and lower values of c_{50} corresponding to higher antibody affinity.

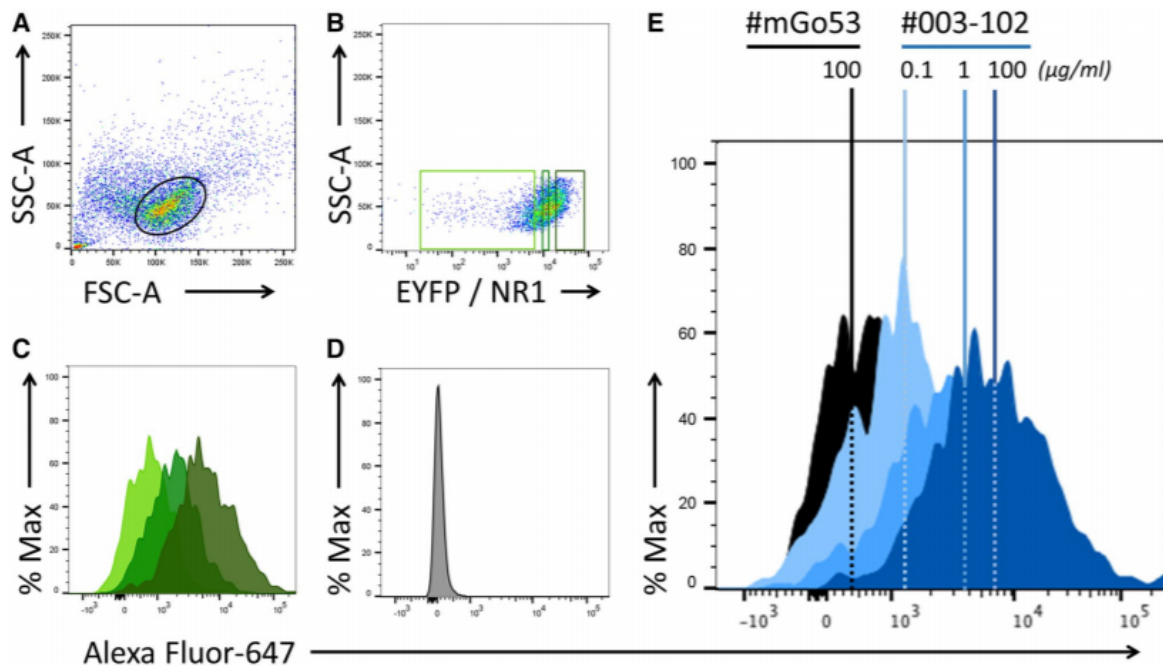


Fig. 1 Validation of binding assays using monoclonal human anti-NR1 autoantibodies. NR1–EYFP-transfected HEK293 cells (a) were gated for the population with the maximum 20% NR1–EYFP protein expression (dark green rectangle), determined by the fluorescence of EYFP (b). EYFP fluorescence correlated well with NR1 expression as determined by staining with the NR1-reactive antibody #003-102 [c, lowest/median/highest 20% EYFP-fluorescent populations (gated in b) shown in light/medium/dark green, respectively]. In contrast,

NR1-reactive antibodies (exemplarily shown for #003-102 at 100 µg/ml) did not bind to control HEK cells transfected with EYFP only (d). The NR1-reactive antibody #003-102 showed a concentration-dependent right shift of the fluorescence curves (blue; 0.1, 1 and 100 µg/ml) compared to the background fluorescence (black; 100 µg/ml) of a human control monoclonal antibody #mGo53 [e, median fluorescence intensity (MFI) is shown by vertical dotted lines]

Human CSF samples

For determination of NR1 antibody avidity (reflecting the divalent binding of IgG antibodies to their target and the presence of several anti-NR1 antibodies) in human specimen, CSF samples of six patients with NMDAR encephalitis were randomly selected. Total IgG concentration of the CSF was measured with ELISA. CSF of each patient was serially diluted (1:1, 1:3, 1:10, 1:30, 1:100) in FACS buffer and 80 µl was added to 96-well plates. Addition of NR1-expressing HEK cells, staining with secondary antibodies and binding determination with FACS was performed as described above. This experiment was independently repeated three times.

Control CSF spiked with monoclonal NR1 antibodies

Control CSF was acquired via CSF bolus withdrawal during routine diagnostic in a patient with benign cranial hypertension. No NMDAR antibodies were present in the sample.

20 µl of CSF was added to 96-well plates. 20 µl of either the monoclonal antibody #003-102 or #007-168 diluted in CSF were added to the wells to reach final concentrations ranging from 100 to 0.01 µg/ml and incubated for 20 min. Addition of NR1-expressing HEK cells, staining with secondary antibodies and binding determination with FACS was performed as described above. This experiment was independently repeated three times.

Results

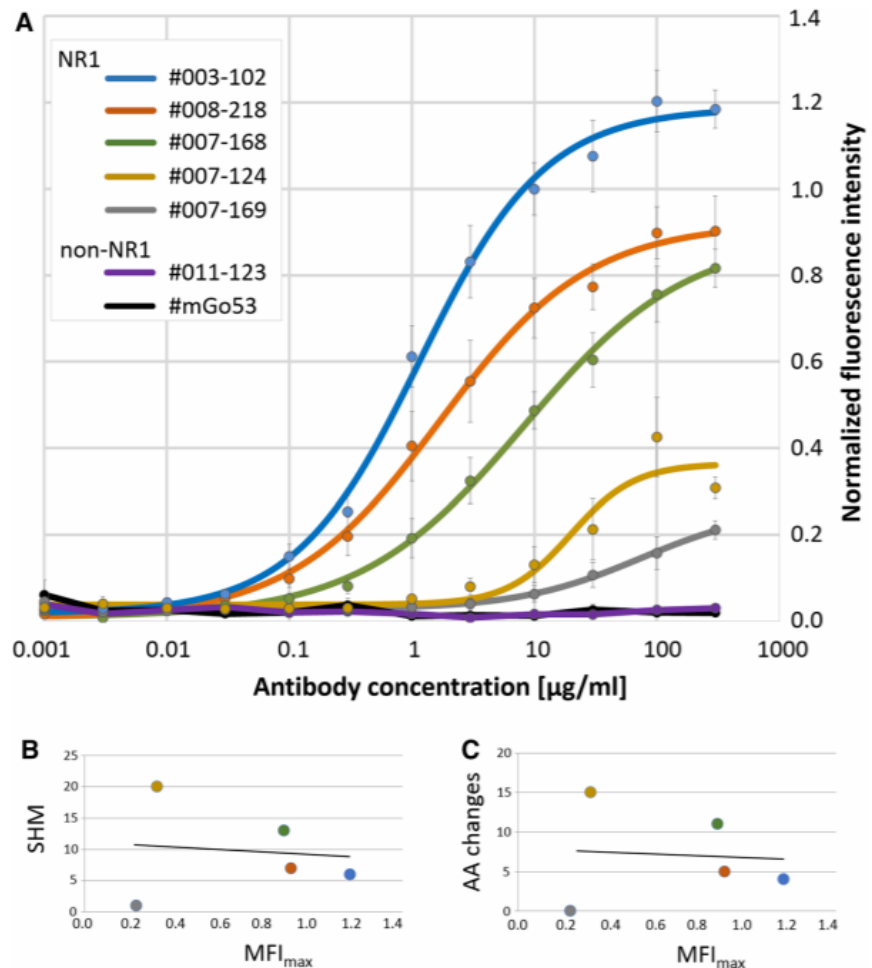
Affinity of monoclonal human autoantibodies

NR1–EYFP was expressed as a fusion protein in HEK293 cells. NR1–EYFP-expressing HEK293 cells were incubated with serial dilutions of five monoclonal human NR1 autoantibodies and two isotype-matched non-NR1-reactive control antibodies. Antibody binding to HEK293 cells was quantified via flow cytometry (Fig. 1a–e). EYFP fluorescence

correlated well with NR1 expression as determined by monoclonal antibody binding (Fig. 1b, c). No binding of any of the antibodies to control EYFP-transfected HEK cells was detected (Fig. 1d). Compared to control antibodies (Fig. 1e, black), monoclonal NR1 antibody binding led to a concentration-dependent shift of the secondary antibody fluorescence curve (Fig. 1e, blue), with an increase of the median fluorescence intensity (MFI).

Normalized MFI of all values were plotted against the antibody concentration (Fig. 2a). Both control antibodies (#011-123, #mGo53) did not show any binding to the NR1–EYFP-expressing cells. The NR1-targeting monoclonal antibodies showed a concentration-dependent sigmoid binding curve, and sigmoid functions with the best fit were calculated (Fig. 2a). Antibody binding curves were different between individual monoclonal NR1 antibodies with saturation plateaus at high antibody concentrations reaching MFI_{max} values of 0.23–1.17. Similarly, the half-maximal concentration c_{50} varied between 1 and 74 $\mu\text{g/ml}$ (Table 1).

Fig. 2 Binding curves of monoclonal human anti-NR1 autoantibodies. MFI of all measurements were normalized and plotted ($MFI \pm SEM$) against the concentration of the monoclonal antibodies, and sigmoid functions with the best fit were generated demonstrating large differences in NMDAR binding (a). The MFI_{max} was not correlated with the number of mutations in the antigen-binding site of the NR1 autoantibodies at the DNA (b; SHM somatic hypermutations) or protein level (c; AA amino acids)



Of the examined clones, #003-102 was the antibody with the highest NR1 affinity, demonstrated by the highest MFI_{max} and the lowest c_{50} . The MFI_{max} did not correlate with the number of antibody mutations compared to germline configuration at the DNA (Fig. 2b; $R^2 = 0.017$) or protein level (Fig. 2c; $R^2 = 0.008$).

Binding curves of human CSF samples

Human CSF samples contain an undetermined number of low- and high-affinity NMDAR autoantibodies. Using our flow cytometry-based approach, we measured the avidity of this polyclonal mixture to the NR1 protein. For this, CSF from six patients with NMDAR encephalitis was serially diluted and the normalized MFI curves measured (Fig. 3). None of the curves reached their plateau MFI_{max} , indicating that the NR1 antibody concentrations in the human samples were far below the saturation of the NR1 epitopes. Therefore, it is not possible to calculate the half-maximal binding constant c_{50} in these samples.

The undiluted samples had MFI values between 0.15 and 1.14, representing a normalized NMDAR antibody titer of the respective patient's CSF with high reproducibility, given the small variations in repeated measurements. Thus, the data indicate that normalization might be an interesting way to allow comparable inter-laboratory quantification of CSF NR1 antibody titers in clinical routine samples of autoimmune encephalitis patients. In this small cohort, no correlations of the MFI were seen with clinical features such as patient age (Fig. 3b; $R^2=0.008$), modified Rankin scale at

the time of CSF analysis (Fig. 3c; $R^2=0.18$) and the duration of the hospital stay (Fig. 3d; $R^2=0.62$).

Different to monoclonal NR1 antibodies, it is unclear which concentrations of NR1 antibodies are in the patient's CSF. To get an estimate of the NR1-specific antibody concentration, we hypothetically assumed that only one monoclonal NR1 antibody is present in the CSF. With this assumption, we calculated how much of each monoclonal NR1 antibody would be required to reach the MFI of the undiluted CSF sample (Table 2). For example in patient 3, the CSF MFI of 0.35 equaled a concentration of 0.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of antibody #003-102. In contrast, 127.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of antibody #007-124 would be required which by far exceeded the total IgG concentration in this CSF sample (Table 2). In some instances, the MFI_{max} plateau of low-affinity monoclonal antibodies precluded the concentration required for the CSF MFI, such as #007-169 for patients 1–4.

In one patient (#6), the MFI of undiluted CSF was so high, that our highest-affinity NR1-reactive monoclonal human antibody (#003-102) would be required in a concentration exceeding the total CSF IgG, while none of the other antibodies can even reach such MFI (Table 2). Thus, this patient's CSF must contain NR1-targeting antibodies of yet higher affinity. We therefore conclude that the

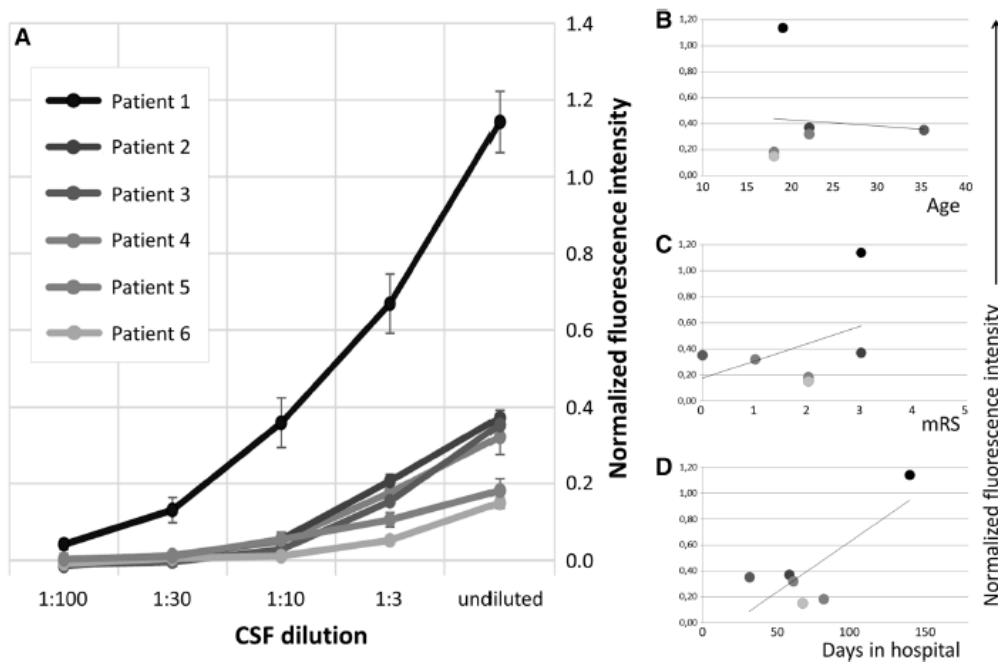


Fig. 3 Binding curves of CSF samples from patients with NMDAR encephalitis. Normalized MFI signals (\pm SEM) show concentration-dependent binding of human CSF samples to NR1 protein (a). None of the binding curves reached their MFI_{max} plateau, indicating that CSF NR1 antibody concentrations were clearly below the saturation

of the NR1 epitopes and that the binding constant c_{50} cannot be calculated in these samples. The MFI did not correlate in this small patient cohort with patient age (b), modified Rankin scale at the time of CSF analysis (c) and the duration of the hospital stay (d)

Table 2 Concentrations of monoclonal human NR1 autoantibodies calculated from binding curves to cause an MFI that is identical to the MFI of undiluted CSF samples

Patients from Fig. 2	CSF total IgG [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	CSF MFI (undiluted)	Concentration of monoclonal antibodies hypothetically needed to equal the patients' CSF MFI [$\mu\text{g}/\text{mL}$]				
			#003-102	#008-218	#007-168	#007-124	#007-169
1	12.60	1.14	48.40	—	—	—	—
2	21.40	0.37	0.43	0.95	4.63	—	—
3	43.90	0.35	0.39	0.84	4.00	127.59	—
4	50.30	0.32	0.34	0.68	3.19	60.45	—
5	n.d.	0.18	0.14	0.22	0.91	16.98	147.18
6	18.90	0.15	0.10	0.16	0.63	13.45	79.89

The heat map (right) shows for each monoclonal antibody which concentration would hypothetically be required to reach the fluorescence intensity of undiluted CSF for each patient. Low concentrations of high-affinity monoclonal antibodies (dark blue to turquoise) are sufficient to explain the MFI of most undiluted CSF samples from patients with NMDAR encephalitis (e.g., #003-102 for patients 2–6). In contrast, concentrations of low-affinity antibodies (e.g., #007-169, extreme right lane) needed to receive the same signal would often exceed the total IgG concentration in the patients' CSF (antibody concentrations in orange to dark red) and can therefore not explain the antibody signal in the patient sample

n.d. not determined

CSF signal is predominantly represented by high-affinity antibodies, according to our calculations likely in a concentration range of NR1 antibodies between 0.1 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, roughly reflecting 1–10% of the total IgG in CSF (Table 2). These calculations teach, on the contrary, that even high amounts of low-affinity NR1 antibodies can easily remain undetected in state-of-the-art diagnostics such as cell-based assays.

Effect of CSF composition on NR1 autoantibody binding curves

In addition to affinity, further intrinsic biophysical properties of the NR1 antibodies might contribute to their target binding and pathophysiological functions. We therefore examined whether serial dilutions of monoclonal human NR1 autoantibodies in physiological CSF resulted in changes to the affinity curves. Indeed, after diluting the high-affinity NR1 antibody #003-102 in the CSF of a patient with benign intracranial hypertension after exclusion of NMDAR autoantibodies, there was a marked left shift of the curve with approximately threefold reduction of c_{50} , i.e., the antibody concentration required to give the same MFI signal was decreased (Fig. 4, blue arrow). In contrast, the identical CSF spiked with the monoclonal human NR1 antibody #007-168 led to a marked right shift of the binding curve with an approximately threefold increase of c_{50} (Fig. 4, green arrow). Thus, depending on the type of NR1 antibody, components of the human CSF, e.g., albumin and globulins, might affect

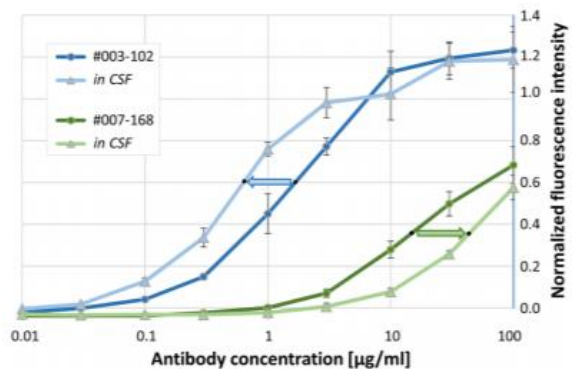


Fig. 4 Binding curves of human monoclonal NR1 autoantibodies diluted in CSF. The binding constant c_{50} was markedly reduced (blue arrow) or increased (green arrow) depending on which monoclonal NR1 antibody was diluted in the identical control CSF

the fluorescence signal in established assay systems in opposite ways.

Discussion

The present study demonstrated that patient-derived monoclonal NMDAR autoantibodies have variable binding curves that can be accurately measured with flow cytometry utilizing NR1-expressing HEK293 cells. Binding curves allow calculation of the maximum binding

capacities (corresponding to MFI_{max} at saturation plateaus) and half-maximal antibody concentrations c_{50} . Both values reflect the affinity of monoclonal antibodies, indicating that human antibodies can be ordered by their relative affinity, even though exact quantification of the affinity of antibody–antigen interaction (usually expressed by the dissociation constant K_d) would require further data such as the free antibody concentration not addressed in this study [6].

The data add another view on the interpretation of antibody titers in clinical samples which only partially correlate with clinical disease [1]. It is known from related neurological autoimmune disorders that antibody affinity might determine disease severity. For example, in Guillain–Barré syndrome, the affinity of anti-GM1 antibodies was associated with disease onset, suggesting an affinity threshold for disease induction [3]. Similarly, the affinity of NMDAR antibodies should be further analyzed in large patient cohorts to determine whether the combination of antibody titer and affinity provides better correlation with disease and prognosis. This might then be extended to even more sophisticated technical methods such as surface plasmon resonance, which would allow real-time affinity determination without the need for antibody labeling.

Along these lines, even titers of NR1 antibodies are hardly comparable between laboratories, likely related to variable protocols for the diagnostic assay. Variables include the expression levels of NR1 protein in cell-based assays or neuronal cells, incubation times of the cells with human samples, secondary detection antibodies and experience of the rater for often subjective determination of fluorescence intensity, among others. In clinical routine, it is therefore often difficult to judge the effect of immunotherapy based on proxy antibody titers, even if samples were analyzed in the same laboratory. Our study showed that normalization of the data might be an elegant way to overcome this problem. Comparing the binding of a given human CSF sample to an assay standard comprised of exactly determined concentrations of monoclonal human antibodies, the NR1 antibody titer was reproduced with minimal variation in repeated measurements. High reproducibility and easy handling of standard antibody solutions suggests that normalization will allow comparable inter-laboratory quantification of CSF NR1 antibody titers in clinical routine samples of autoimmune encephalitis patients. Similar normalizations were devised for other clinical routine assays, with the INR (International normalized ratio) for evaluation of the patient's coagulation being one of the most prominent examples, e.g., in patients on warfarin. Normalizing the prothrombin time to control plasma made it possible to compare coagulation between laboratories worldwide.

Although the patient CSF contains several monoclonal NMDAR antibodies, the antibody signal seen in routine

diagnostic assays is likely related to the high-affinity antibodies. Low-affinity antibodies would be required in such high concentrations for reaching the binding intensity of CSF samples that their IgG concentration exceeded the total IgG in the sample. Therefore, low-affinity NR1 antibodies can easily go undetected in cell-based assays, even though it is unclear yet whether only such low-affinity (without additional high-affinity) antibodies can be present in patients. If so, then the intriguing question arises of whether low-affinity antibodies may still account for clinical symptoms, in particular if produced by plasma cells in the brain parenchyma where the local antibody concentrations might be high. Prolonged exposure might still produce synaptic changes and thus result in subtle clinical abnormalities which were until now not considered as NR1 autoimmunity.

We further found that the dilution of monoclonal human NR1 autoantibodies in control CSF can affect the binding curves in opposite ways. It is not clear from this study whether certain CSF proteins, e.g., albumin or globulins, the most abundant proteins in non-inflammatory CSF, bind to the NR1 antibodies differently and interfere with their receptor interaction. Besides affinity, potential determinants include the antibody polyreactivity, not assessed in this study. We do not assume that the protein binding is mediated via Fc receptors as the examined monoclonal antibodies had the identical Fc part. The data suggest that changes in the protein concentration and composition (e.g., with encephalitis-related increase in the CSF or with therapeutic apheresis-related decrease in blood and CSF) can further influence the NR1 antibody function in NMDAR encephalitis.

Taken together, we identify reproducible and measurable biophysical factors of NMDAR autoantibodies that should be further evaluated in large patient cohorts. Data can immediately improve clinical routine assays for antibody detection, might provide surrogate markers for monitoring of disease course and prognosis, and should be expanded to other forms of autoimmune encephalitides.

Compliance with ethical standards

Ethical standards Written informed consent was received from participants at the Charité Department of Neurology. All human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee (Charité University Hospital Institutional Review Board) and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

Conflicts of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate

credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, Gleichman AJ, Balice-Gordon R, Rosenfeld MR, Lynch D, Graus F, Dalmau J (2014) Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol* 13:167–177
- 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, Prüss H (2016) Human cerebrospinal fluid monoclonal *N*-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain* 139:2641–2652
- Lopez PH, Villa AM, Sica RE, Nores GA (2002) High affinity as a disease determinant factor in anti-GM(1) antibodies: comparative characterization of experimentally induced vs. disease-associated antibodies. *J Neuroimmunol* 128:69–76
- Malviya M, Barman S, Golombek KS, Planaguma J, Mannara F, Strutz-Seebohm N, Wrzoc C, Demir F, Baksmeier C, Steckel J, Falk KK, Gross CC, Kovac S, Bonte K, Johnen A, Wandinger KP, Martin-Garcia E, Becker AJ, Elger CE, Klocker N, Wiendl H, Meuth SG, Hartung HP, Seebohm G, Leypoldt F, Maldonado R, Stadelmann C, Dalmau J, Melzer N, Goebels N (2017) NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 4:768–783
- Planaguma J, Leypoldt F, Mannara F, Gutierrez-Cuesta J, Martin-Garcia E, Aguilar E, Titulaer MJ, Petit-Pedrol M, Jain A, Balice-Gordon R, Lakadamyali M, Graus F, Maldonado R, Dalmau J (2015) Human *N*-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain* 138:94–109
- Rathanaswami P, Babcook J, Gallo M (2008) High-affinity binding measurements of antibodies to cell-surface-expressed antigens. *Anal Biochem* 373:52–60
- Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangue T, Glaser C, Iizuka T, Honig LS, Benseler SM, Kawachi I, Martinez-Hernandez E, Aguilar E, Gresa-Arribas N, Ryan-Flourance N, Torrents A, Saiz A, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J (2013) Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 12:157–165
- Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 301:1374–1377

6 Lebenslauf

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

7 Publikationsliste

1. Ly LT, Kreye J, Jurek B, Leubner J, Scheibe F, Lemcke J, Wenke NK, Reincke SM, Prüss H. Affinities of human NMDA receptor autoantibodies: implications for disease mechanisms and clinical diagnostics. *J Neurol*. 2018 Nov;265(11):2625-2632. doi: 10.1007/s00415-018-9042-1.
2. Schubert J, Brämer D, Huttner HB, Gerner ST, Fuhrer H, Melzer N, Dik A, Prüss H, Ly LT, Fuchs K, Leyboldt F, Nissen G, Schirotzek I, Dohmen C, Bösel J, Lewerenz J, Thaler F, Kraft A, Juranek A, Ringelstein M, Sühs KW, Urbanek C, Scherag A, Geis C, Witte OW, Günther A; GENERATE and IGNITE network. Management and prognostic markers in patients with autoimmune encephalitis requiring ICU treatment. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018 Oct 30;6(1):e514. doi: 10.1212/NXI.0000000000000514.
3. 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, Prüss H. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain*. 2016;139:2641–2652. doi: 10.1093/brain/aww208.
4. Heine J, Ly LT, Lieker I, Slowinski T, Finke C, Prüss H, Harms L. Immunoabsorption or plasma exchange in the treatment of autoimmune encephalitis: a pilot study. *J Neurol*. 2016 Dec;263(12):2395-2402. doi: 10.1007/s00415-016-8277-y.
5. Dao LM, Machule ML, Bacher P, Hoffmann J, Ly LT, Wegner F, Scheffold A, Prüss H. Decreased inflammatory cytokine production of antigen-specific CD4+ T cells in NMDA receptor encephalitis. *J Neurol*. 2021 Jan 13. doi: 10.1007/s00415-020-10371-y.

8 Danksagung

Mein großer Dank gilt insbesondere Prof. Dr. med. Harald Prüß für die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Allzu gerne denke ich an seine beflügelnden Worte und seinen ansteckenden Optimismus zurück („Für die Doktorarbeit braucht man ein halbes Jahr, maximal ein Jahr!“, 2014).

Darüber hinaus möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prüß meinen Dank aussprechen, insbesondere Betty Jurek und Doreen Brandl, die mir jederzeit mit guten Ratschlägen zur Seite standen, und Alva Lütt, Le-Minh Dao und Mariya Chayka für gutes Entertainment inner- und außerhalb des Labors.

Ganz besonders danke ich außerdem meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld, ihre Ermutigung und ihren stetigen Zuspruch.