

Aus dem
CharitéCentrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurologie und Institut für Experimentelle Neurologie, Charité Campus Mitte
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Endres

Habilitationsschrift

Molekulare Kandidaten für immun- vermittelte neurodegenerative Mechanismen

Zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Harald Prüß
geboren am 10.02.1977 in Güstrow

Eingereicht: 03/2011

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grütters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. B. Hemmer / München

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. H. Wiendl / Münster

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Einleitung	6
1.1 Neurodegeneration und Inflammation	6
1.2 Humorale Autoimmunität gegen hirneigene Proteine	7
1.3 Ionenkanäle als Kandidaten von Autoimmunität	8
1.4 Zielstellungen	9
2. Eigene Arbeiten	11
2.1 Der neuronale Schaden nach Hirninfarkt wird nicht durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) vermittelt	12
<p><u>Prüss H</u>, Prass K, Ghaeni L, Milosevic M, Muselmann C, Freyer D, Roysl G, Reuter U, Baeva N, Dirnagl U, Meisel A, Priller J. Inducible nitric oxide synthase does not mediate brain damage after transient focal cerebral ischemia in mice. <i>Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism</i> 2008, 28(3):526-539.</p>	
2.2 Rückenmarkverletzungen induzieren die Expression des profibrotischen Semaphorin 7A	28
<p>Kopp M, Brommer B, Gatzemeier N, Schwab JM, <u>Prüss H</u>. Spinal cord injury induces differential expression of the pro-fibrotic Semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. <i>Glia</i> 2010, 58(14):1748-1756.</p>	
2.3 Altersabhängige axonale Expression von Kaliumkanälen während der Entwicklung des murinen Hippocampus	39
<p><u>Prüss H</u>, Grosse G, Brunk I, Veh RW, Ahnert-Hilger G. Age-dependent axonal expression of potassium channel proteins during development in mouse hippocampus. <i>Histochem Cell Biol</i> 2009, 133(3):301-312.</p>	
2.4 Astrozytäre Expression der BKβ1- und BKβ4-Untereinheiten der spannungs- und Ca²⁺-abhängigen BK-Kaliumkanäle	53
<p>Seidel KN, Derst C, Höltje M, Veh RW, <u>Prüss H</u>. Expression of the voltage- and Ca²⁺-dependent BK potassium channel subunits BKβ1 and BKβ4 in rodent astrocytes. <i>Glia</i> 2011; doi: 10.1002/glia.21160.</p>	

2.5	Antikörper gegen Neurofascin in Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom.....	65
	<u>Prüss H</u> , Schwab JM, Derst C, Görtzen A, Veh RW. Neurofascin as target of autoantibodies in Guillain-Barré syndrome. <i>Brain</i> 2011; doi: 10.1093/brain/awq372.	
2.6	Retrospektiver Nachweis von Antikörpern gegen NMDA-Rezeptoren in Patienten mit ‚Enzephalitis ohne Erregernachweis‘	69
	<u>Prüss H</u> , 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. <i>Neurology</i> 2010, 75(19):1735-1739.	
3.	Diskussion	76
3.1	Zelluläre Immunmechanismen	76
3.2	Antikörper gegen Strukturen des zentralen und peripheren Nervensystems.....	77
3.3	Kaliumkanäle in Hirnregionen für Lernen und Gedächtnis	80
4.	Zusammenfassung.....	83
5.	Literaturangaben	84
	Danksagung.....	92
	Erklärung.....	93

Abkürzungen

BK channel	Large-conductance Ca ²⁺ -activated potassium channel
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GABA	γ-Amino-Buttersäure
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
IgG	Immunglobulin G
iNOS	inducible nitric oxide synthase
K2P	tandem-pore potassium channel
Kir	inwardly rectifying potassium channel
Kv	voltage-gated potassium channel
MCAO	medial cerebral artery occlusion
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
Nav	voltage-gated sodium channel
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
Sema7A	Semaphorin 7A
SVZ	subventricular zone
TGFβ1	transforming growth factor beta 1
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Neurodegeneration und Inflammation

Eine der größten Gruppen neurologischer Krankheitsbilder wird durch die so genannten „neurodegenerativen Erkrankungen“ gebildet. Der Begriff ist wenig spezifisch und reicht von genetisch, nutritiv oder toxisch bedingten Krankheiten mit Schädigung von Struktur und Funktion des Nervensystems bis hin zu den neurodegenerativen Demenzen, deren weit reichende individuelle und sozioökonomische Konsequenzen im Rahmen des demographischen Wandels in letzter Zeit besonders bewusst geworden sind.

Die neurodegenerativen Mechanismen, die letztlich zum Tod von Nervenzellen in Gehirn und Rückenmark führen können, umfassen fast das gesamte Spektrum moderner neurowissenschaftlicher Forschung. Zu ihnen gehören beispielsweise veränderte Zelleiweiße aufgrund von hereditären Genveränderungen wie bei den Polyglutamin-Erkrankungen (z.B. Huntington-Krankheit; Ross & Tabrizi 2011), ein gestörter Abbau von Proteinen mit der Folge einer übermäßigen Ablagerung in zuvor gesunden Zellen (z.B. Parkinson-Krankheit; Gundersen 2010), Funktionsstörungen der Mitochondrien in Nervenzellen, Störungen des axonalen Transports und Apoptose (Duffy et al., 2011). In den letzten Jahren wurden zunehmend inflammatorische Mechanismen als zusätzliche Ursache von Neurodegeneration diskutiert (Perry 2010). Bei der häufigsten Demenzform, der Alzheimer-Krankheit, werden beispielsweise die Aktivierung von Mikroglia mit resultierender Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren (Tan et al., 1999), die Aktivierung der Komplementkaskade sowie die Induktion von Zytokinen und pro-inflammatorischen Enzymen wie der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) als degenerative Mechanismen angesehen (Vodovotz et al., 1996). Auch wenn der Anteil am neuronalen Schaden bei der Alzheimer-Krankheit noch weitgehend unklar ist, so unterstreichen die Erfolge anti-inflammatorischer Therapiestrategien doch die Bedeutung von immunvermittelten Mechanismen an der Neurodegeneration. So ist beispielsweise die Langzeiteinnahme nichtsteroidaler Antiphlogistika mit dem verspäteten Beginn von Symptomen der Alzheimer-Krankheit assoziiert (Rich et al., 1995; Heneka & O'Banion 2007).

Auch nach einer akuten Verletzung des Zentralnervensystems (ZNS) kommt es in der Regel zu sekundären inflammatorischen Schädigungen, die – im Falle eines Schlaganfalls oder einer Rückenmarksverletzung – noch lange nach dem Trauma fortschreiten können. Es wurde gezeigt, dass ZNS-Antigene und spezifische Antikörper im Serum von Patienten nach einer Hirnverletzung nachweisbar sind (Strand et al., 1984; Ankeny et al., 2006) und die klinischen Symptome und das Ausmaß der strukturellen Läsionen verstärken können (Ankeny et al., 2009). Auf diese Weise wirken autoimmunologische Mechanismen an anhaltender Neurodegeneration mit, zumal verschiedene Immunzellen über Monate und Jahre in der ZNS-Läsion nachweisbar bleiben können (Fleming et al., 2006; Schwab et al., 2002).

1.2 Humorale Autoimmunität gegen hirneigene Proteine

Konzeptionell sind zerebrale Proteine aufgrund des Immunprivilegs des ZNS vor immunologischer Überwachung und Autoimmunität relativ geschützt (Billingham & Boswell 1953). Allerdings gilt das Immunprivileg nicht für alle Areale des Gehirns und nicht für die Produktion von Antikörpern (Galea et al., 2006). Die besondere Rolle von Antikörpern wird ferner dadurch gestützt, dass sich bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Gehirns ein lokales Chemokin-Milieu etabliert, das das Überleben von Antikörper-produzierenden Plasmazellen begünstigt (Meinl et al., 2008, 2006). So ist es zu verstehen, dass bis zu 40% der Patienten mit einer sekundär progredienten Multiplen Sklerose B-Zell-Follikel in den Meningen haben (Serafini et al., 2004; Magliozzi et al., 2007).

Umfassende Arbeiten zu einzelnen neurologischen Krankheitsbildern haben bereits gezeigt, dass Autoantikörper eine zentrale pathogenetische Rolle spielen können: Antikörper gegen Strukturen des zentralen Nervensystems sind in Form von Aquaporin-4-Antikörpern bei der Neuromyelitis optica (Hinson et al., 2007), Antikörper gegen Ma2, Lgi1 und NMDA-Rezeptoren bei der limbischen Enzephalitis (Pleasure et al., 2008; Vincent et al., 2004), gegen Synapsin bei der Gluten-Enteropathie (Alaedini et al., 2007), gegen NMDA-Rezeptoren beim neuropsychiatrischen systemischen Lupus erythematoses (Matus et al., 2007) oder gegen Ganglioside beim rheumatischen Fieber

(Kirvan et al., 2006) bekannt. Im peripheren Nervensystem ist unter anderem humorale Autoimmunität gegen Acetylcholin-Rezeptoren mit der Myasthenia gravis (Newsom-Davis 2007), gegen spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle mit dem Lambert-Eaton-Syndrom (Lang & Vincent 2003) und gegen Ganglioside mit dem Guillain-Barré-Syndrom (Willison et al., 2005) kausal verbunden.

Es ist zu erwarten, dass in den kommenden Jahren weitere Autoantikörper gegen ZNS-Antigene entdeckt werden. Wesentlich weniger klar als bei den genannten, oft subakuten Krankheitsbildern ist allerdings die Rolle der meisten zugrunde liegenden Antikörper für eine chronische Schädigung von Nervenzellen. So ist es denkbar, dass niedrige Serum- oder Liquorspiegel von anti-neuronalen Antikörpern kein fulminantes Krankheitsbild verursachen, aber dennoch durch chronische humorale Toxizität (beispielsweise über verändertes ‚Zytokin-Signalling‘, Komplementaktivierung oder Rezeptor-Internalisierung) zu langsam fortschreitender Neurodegeneration führen.

1.3 Ionenkanäle als Kandidaten von Autoimmunität

Viele der beschriebenen anti-neuronalen Antikörper sind gegen Ionenkanäle gerichtet, und das jeweilige klinische Krankheitsbild spiegelt relativ präzise die anatomisch-morphologische Verteilung dieser Kanäle im zentralen oder peripheren Nervensystem wider. So lassen sich beispielsweise bei der seit wenigen Jahren bekannten anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis die klinischen Symptome, wie epileptische Anfälle, Bewegungsstörungen, Bewusstseinsstörungen oder Hypoventilation, aufgrund der Kenntnis der anatomischen Verteilung der NMDA-Rezeptoren plausibel Interneuronen des Hirnstamms, pontin-medullären Respiratorneuronen oder katecholaminergen Neuronen zuordnen (Dalmau et al., 2011).

Humorale Autoimmunität könnte sich prinzipiell gegen alle Ionenkanäle richten. Für die Charakterisierung neuer Zielantigene erscheinen Kalium-(K⁺-)kanäle besonders interessant, da sie in großer Vielfalt auftreten. Sie sind wichtige Bausteine in Signaltransduktionskaskaden nahezu aller Zellen des menschlichen Organismus. K⁺-Kanäle bilden regulierte Poren in Zellmembranen und können in drei Hauptklassen unterteilt werden: spannungsgesteuerte K⁺-Kanäle (Kv), einwärts-gleichrichtende K⁺-

Kanäle (Kir) und ‚Background‘-Kanäle (K2P) (Coetzee et al., 1999). Mindestens 75 verschiedene K⁺-Kanal-Gene wurden bisher identifiziert (Caterall et al., 2002). Die unterschiedliche zeitliche und räumliche Expression, das Vorhandensein verschiedener Splice-Varianten und die Fähigkeit zur Bildung von Hetero-Oligomeren unterstreichen die eindrucksvolle Diversität von K⁺-Kanälen.

Mehreren Kaliumkanälen wurde im Falle einer zumeist genetischen Störung bereits ein neurologischer Phänotyp zugewiesen. Unter der wachsenden Gruppe der so genannten ‚Kanalerkrankungen‘ (*channelopathies*) mit Ionenkanalmutationen finden sich viele neurologische Symptome, die von paroxysmalen Störungen des Bewusstseins bis zu eingeschränkten kognitiven oder muskulären Funktionen reichen (Ryan & Ptáček 2010). So haben beispielsweise Patienten mit dem Andersen-Syndrom eine Mutation im KCNJ2-Gen, welches den Kir2.1-Kaliumkanal kodiert. Betroffene entwickeln Herzrhythmusstörungen mit Synkopen oder periodische Lähmungen (Tristani-Firouzi et al., 2010).

Diese vielfältigen Assoziationen zwischen hereditären Funktionsstörungen von K⁺-Kanälen und neurologischen Symptomen drängen zu einer systematischen Suche nach autoimmun vermittelten K⁺-Kanalerkrankungen. Kürzlich wurde gezeigt, dass bei einigen limbischen Enzephalitiden oder der Neuromyotonie die mit spannungsgesteuerten K⁺-Kanälen assoziierten Proteine Lgi1 und Caspr2 die Zielantigene sind (Irani et al., 2010). Das unterstreicht die Notwendigkeit, die Voraussetzungen für die Identifizierung von Antikörpern gegen K⁺-Kanäle zu schaffen, da deren Existenz bei verschiedenen Erkrankung plausibel und vorhersagbar ist.

1.4 Zielstellungen

Eine grundsätzliche Voraussetzung für das Verständnis klinischer Symptomkonstellationen bei autoimmunologischen Erkrankungen des Nervensystems ist die präzise experimentelle Analyse der Verteilung der Zielantigene. Daher sind in der vorliegenden Arbeit sowohl zelluläre, als auch humorale Kandidaten untersucht worden, die mit immunologisch vermittelten Mechanismen von Neurodegeneration in Verbindung gebracht wurden (siehe Abbildung 1).

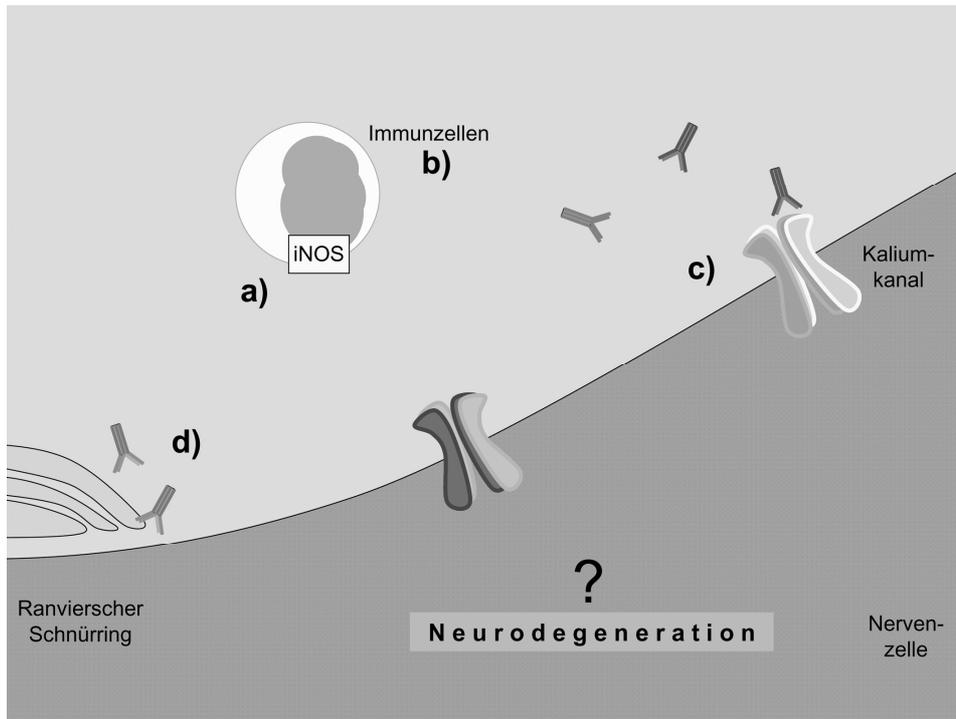


Abbildung 1.

In den dargestellten Forschungsarbeiten wurde versucht, die folgenden, für das Verständnis von immunvermittelter Neurodegeneration relevanten Fragen zu beantworten:

- a) Hat das pro-inflammatorische Enzym iNOS einen Einfluss auf akute Neurodegeneration?
- b) Wird das axonale Guidance-Molekül Sema7A nach akuter ZNS-Verletzung exprimiert und könnte auf diese Weise Immunzellen im Bereich der Läsion halten?
- c) Sind Kaliumkanäle im ZNS an anatomischen Orten der Gedächtnisbildung exprimiert und repräsentieren dadurch Kandidaten für humoral vermittelte anti-neuronale Autoimmunität bei neurodegenerativen Demenzen?
- d) Lassen sich mit beispielhaften Antigenen des peripheren und zentralen Nervensystems vermehrt Antikörper gegen Ionenkanäle oder Kanal-assoziierte Strukturen bei neurologischen Patienten nachweisen?

2. Eigene Arbeiten

Ausgehend von der in der Literatur postulierten Rolle der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) für einen neurodegenerativen Mechanismus (insbesondere im Sinne sekundärer Schädigung nach akuter ZNS-Verletzung), wurde eine pathogenetische Funktion dieses Enzyms am Beispiel des ischämischen Schlaganfalls der Maus untersucht (Beitrag 2.1). Auch unter Verwendung verschiedener iNOS-Knockout-Mausstämmen ließ sich kein kausaler Zusammenhang zu verstärkter Neurodegeneration etablieren.

Daher wurde iNOS als Zielantigen immunologischer Mechanismen zugunsten anderer Kandidaten nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde zum einen das Molekül Sema7A untersucht, das durch seine krankheitsspezifische Expression nach Verletzung des ZNS mit hoher Wahrscheinlichkeit zum neurodegenerativen Sekundärschaden beiträgt (Beitrag 2.2).

Zum anderen erfolgte eine detaillierte morphologische Analyse zahlreicher Ionenkanäle im ZNS. Ionenkanäle können durch ihre spezifische Lokalisation als Zielantigen humoraler Immunität charakteristische Krankheitsbilder verursachen und zu zellulärem Schaden führen. Da die genaue Kenntnis ihrer anatomischen Verteilung eine Voraussetzung für die Analyse Antikörper-vermittelter neurologischer Erkrankungen ist, wurde die hirnspezifische Expression etlicher Vertreter verschiedener Kaliumkanal-Familien untersucht (Beitrag 2.3, Beitrag 2.4).

Für die Translation der experimentellen Fragestellung, ob sich bei Patienten Antikörper gegen Ionenkanäle und assoziierte Proteine finden lassen, wurden Patienten mit einem Guillain-Barré-Syndrom hinsichtlich des Vorhandenseins von Antikörpern gegen Neurofascin und Contactin untersucht (Beitrag 2.5). Darüber hinaus wurden Patienten mit einer ätiologisch nicht zugeordneten Enzephalitis auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Glutamat-Ionenkanäle vom Typ NMDA untersucht sowie der Effekt der Antikörper auf primäre Neurone analysiert (Beitrag 2.6).

2.1 Der neuronale Schaden nach Hirninfarkt wird nicht durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) vermittelt

Prüss H, Prass K, Ghaeni L, Milosevic M, Muselmann C, Freyer D, Roysl G, Reuter U, Baeva N, Dirnagl U, Meisel A, Priller J. Inducible nitric oxide synthase does not mediate brain damage after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2008, 28(3):526-539.

Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch Stickoxid-Synthasen (NOS) ist Teil der Entzündungsreaktion nach zerebraler Ischämie, die zur Umwandlung von noch gesundem Penumbra-Gewebe in Nekrosen beiträgt (Dirnagl et al., 1999). Insbesondere die induzierbare NO-Synthase (iNOS) galt lange als zentrales Enzym der Schädigungskaskaden nach Schlaganfall, Meningitis oder Sepsis (Iadecola et al., 1997; Moro et al., 2004). Daher wurde es als viel versprechender therapeutischer Ansatzpunkt nach der klinischen Akutversorgung (z.B. systemische Thrombolyse) angesehen. Auf der anderen Seite kann NO in Abhängigkeit von der Konzentration und dem zellulären Kontext auch neuroprotektiv sein, wie für die Steigerung von Neurogenese nach Ischämie gezeigt wurde (Zhu et al., 2003). Einige Arbeiten postulierten einen Effekt auf die sekundäre Schädigung, da in iNOS-Knockout-Mäusen eine Infarktreduktion nach 4 Tagen, nicht jedoch bereits nach 24 Stunden gezeigt wurde (Iadecola et al., 1997; Loihl et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnten andere Gruppen keine Belege für einen Sekundärschaden durch iNOS im Modell der zerebralen Ischämie bei Mäusen nachweisen (Cash et al., 2001; Lerouet et al., 2005).

Diese uneinheitliche Datenlage suggeriert komplexe Mechanismen der iNOS-Expression nach zerebraler Ischämie. Um die Rolle von iNOS nach transientser Hirnischämie besser zu charakterisieren, wurde daher untersucht, ob ein experimenteller Schlaganfall mittels transientser Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) in Mäusen zur Induktion von iNOS-mRNA führt, ob die in das Gewebe einwandernden Blut-Leukozyten die Hauptquelle des Enzyms darstellen und ob iNOS-Knockout-Mäuse einen relativen Schutz vor Hirninfarkten haben.

Der Nachweis der iNOS-mRNA zeigte ein differentielles, Exon-abhängiges Expressionsmuster, das mit dem Vorhandensein von alternativem Splicing vereinbar ist.

Die Exons 2-3 wurden innerhalb der ersten 1-3 Tage nach Ischämie um das 16-fache heraufreguliert, während die Exons 6-8, 12-14, 21-22 und 26-27 verzögert exprimiert wurden und lediglich um das 2-5-fache anstiegen. Insgesamt waren die Expressionsniveaus so niedrig, dass sie mittels Northern-Blot-Analyse nicht detektiert werden konnten. Unter Verwendung spezifischer Antikörper wurde gezeigt, dass es in den ersten 5 Tagen nach dem experimentellen Schlaganfall zu keiner iNOS-Proteinexpression im Gehirn kommt. Als Positivkontrollen für die Antikörper diente der deutliche Nachweis von iNOS-Protein in den Lungen von Mäusen mit Pneumonie sowie in Maus- und Ratten-Dura nach lokaler Applikation von Lipopolysaccharid. Zur Beurteilung der iNOS-Expression in aus dem Blut einwandernden Leukozyten wurden sowohl Chimären aus iNOS-defizienten Mäusen mittels Transplantation von Wildtyp-Knochenmark hergestellt, als auch aus Wildtyp-Mäusen mit iNOS-defizientem Knochenmark. Die Knochenmarkszellen exprimieren das grün fluoreszierende Protein GFP und können dadurch während ihrer Einwanderung ins Gehirn verfolgt werden. Während des gesamten Untersuchungszeitraums nach Hirninfarkt war weder in diesen einwandernden Leukozyten noch in lokalen Gehirnzellen iNOS-Protein detektierbar. Darüber hinaus unterschieden sich beide experimentellen Gruppen nicht in der Größe eines experimentell gesetzten transienten Schlaganfalls. Aufgrund der fehlenden Hinweise für einen Zusammenhang zwischen iNOS und einer Schädigung nach zerebraler Ischämie wurde dieser Befund in einer breiten Analyse von Schlaganfallgrößen in drei verschiedenen Stämmen von iNOS-Knockout-Mäusen verifiziert. In allen Versuchsgruppen war das Ausmaß des Infarkts unabhängig von der iNOS-Expression. Stattdessen ließ sich ein klarer Zusammenhang zwischen dem jeweiligen genetischen Hintergrund der Tiere und der Schlaganfallgröße darstellen. Zusammenfassend ließen sich keine Belege für eine Schlüsselrolle der iNOS für den durch Entzündung induzierten neuronalen Schaden nach einer transienten zerebralen Ischämie finden. Die Analyse dieses viel beachteten molekularen Signalweges von der subzellulären Ebene (mRNA- und Protein-Expression) bis hin zum klinischen Modell (MCAO) stellt den Erfolg einer iNOS-basierten Therapiestudie in Frage. Der Nachweis einer differentiellen Regulation der Exons 2-27 kann zudem einige der sich widersprechenden Befunde publizierter Arbeiten zur iNOS-mRNA-Expression erklären.

2.2 Rückenmarkverletzungen induzieren die Expression des pro-fibrotischen Semaphorin 7A

Kopp M, Brommer B, Gatzemeier N, Schwab JM, Prüss H. Spinal cord injury induces differential expression of the pro-fibrotic Semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. *Glia* 2010, 58(14):1748-1756.

Eine Verletzung des Rückenmarks führt zu reaktiven Umbauvorgängen des Gewebes und Narbenbildung, woran vor allem Astrozyten und einwandernde Meningozyten beteiligt sind (Schwab et al. 1996; Silver et al. 2004). Durch Ablagerung verschiedener Kollagene, Laminin und Fibronectin in die extrazelluläre Matrix stellt die fibrotische Narbe ein Haupthindernis für regenerierende Axone dar. In den letzten Jahren wurden axonale Guidance-Moleküle als Bestandteile der sich nach ZNS-Schädigung bildenden Narbe identifiziert (De Winter et al., 2002; Kaneko et al., 2006; Niclou et al., 2006; Schwab et al., 2005a; Schwab et al., 2005b). Aufgrund der weiten Verbreitung von Semaphorin 7A (Sema7A) im ZNS wurde dieses Guidance-Molekül als neuer Kandidat gewählt, um den möglichen Beitrag zur Narbenbildung und neuronalen Regenerationsstörung nach ZNS-Verletzung zu analysieren.

Semaphorine gehören zu einer großen Gruppe phylogenetisch konservierter Proteine, deren Rolle ursprünglich nur in der Entwicklung des ZNS vermutet wurde, wo sie die Lenkung von Axonen und die Bildung von Synapsen steuern (Pasterkamp et al., 2009; Pasterkamp et al., 2003; Yu et al., 1999). Die Bedeutung von Sema7A geht jedoch über axonales Guiding hinaus. So spielt dieses Molekül eine wichtige Rolle im Umbau von Bindegewebe, wie beispielsweise bei der Regulation der Osteoblastenmigration (Delorme et al., 2005) oder der Ausbildung einer Lungenfibrose nach TGF β 1-Stimulation (Kang et al., 2007). Darüber hinaus kann Sema7A auf aktivierten T-Zellen zur Stimulation von Makrophagen und deren Ausschüttung von Entzündungsmediatoren beitragen (Suzuki et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zunächst eine geringe konstitutive Expression von Sema7A im Rückenmark mit Betonung von Neuronen im Vorder- und Hinterhorn der grauen Substanz. Nach einer experimentellen Rückenmarkverletzung kam es zu einer spezifischen Akkumulation von Sema7A-positiven Zellen in der Läsion, während in

läsionsfernen (> 7,5 mm von der Verletzung) Arealen keine Zunahme gegenüber Sham-operierten Tieren nachweisbar war. Während der ersten Tage war Sema7A nur in Neuronen, aufgetriebenen und retrahierten Nervenfasern sowie Endothelzellen nachweisbar. Ab Tag 7 nach Rückenmarkverletzung begann eine zunehmende Sema7A-Expression in Bestandteilen der gliotischen Narbe (reaktive Astrozyten) und eine deutliche Ablagerung in der extrazellulären Matrix. Die periläsionalen Astrozyten exprimierten außerdem das Intermediärfilament Vimentin als Hinweis auf ihre Aktivierung. Im verletzten Rückenmark nahm die Anzahl der Sema7A-positiven Zellen bis zum Tag 14 weiter zu und blieb bis Tag 28 erhöht, wobei nahezu alle positiven Zellen Astrozyten waren. In enger Nachbarschaft zu Sema7A-positiven Strukturen fanden sich gehäuft Makrophagen, die den Sema7A-Rezeptor $\alpha 1\beta 1$ -Integrin exprimierten.

Das regenerationshemmende Milieu nach einer Rückenmarkverletzung wird zu einem erheblichen Teil durch die Barriere der extrazellulären Matrix und reaktive Astrozyten bestimmt (Fawcett et al., 1999; Sandvig et al., 2004; Schwab et al., 1996). Die spezifische Akkumulation von Sema7A-positiven reaktiven Astrozyten im Bereich der Rückenmarkverletzung sowie die Sema7A-Ablagerung in der extrazellulären Matrix sprechen für eine Beteiligung dieses pro-fibrotischen Moleküls an der Narbenbildung und -reifung nach ZNS-Verletzung. Die verzögerte Expression suggeriert insbesondere eine Beteiligung an der späten Narbenreifung (Kollagenkondensation) (Fawcett et al., 1999; Norenberg et al., 1994). Wahrscheinlicher Mechanismus ist dabei eine fibrotische Wirkung innerhalb der TGF $\beta 1$ -Signalkaskade (Kang et al., 2007; Leask et al., 2004). Die nachgewiesene Akkumulation von $\alpha 1\beta 1$ -Integrin-tragenden Makrophagen an Sema7A-positiven Astrozyten kann zudem ein Rezeptor-Mechanismus sein, über den diese entzündungsfördernden Immunzellen an den Läsionsort gebunden werden (Ben-Horin et al., 2004; Hynes et al., 2002; Ray et al., 2004; Holmes et al., 2002), wo sie mitunter Jahre persistieren (Fleming et al., 2006; Schwab et al., 2002).

Zusammenfassend geben die Befunde Hinweise auf eine neue biologische Rolle von Sema7A für Wundheilung und Sekundärschaden nach einer ZNS-Verletzung an der Schnittstelle zwischen Nervensystem (Narbenbildung) und Immunsystem (Immunzell-Retention).

2.3 Altersabhängige axonale Expression von Kaliumkanälen während der Entwicklung des murinen Hippocampus

Prüss H, Grosse G, Brunk I, Veh RW, Ahnert-Hilger G. Age-dependent axonal expression of potassium channel proteins during development in mouse hippocampus. *Histochem Cell Biol* 2009, 133(3):301-312.

Das komplexe neuronale Netzwerk der Hippocampus-Formation gilt als zentrales Element für die Gedächtnisbildung. Für die Entwicklung und Feineinstellung dieses Netzwerks ist neuronale Aktivität erforderlich (Ben-Ari 2002). Deren elektro-physiologische Charakteristika werden vor allem durch die Lokalisation und Funktion von Ionenkanälen geprägt (Llinas et al., 1988). Während der Entwicklung des Hippocampus spielt die abgestimmte Funktion der Kanäle eine besondere Rolle, zumal sich das Expressionsmuster neuronaler Kanalproteine deutlich verändert. Während der Embryonalentwicklung gehören Kaliumkanäle zu den ersten spannungsabhängigen Ionenkanälen in Nervenzellen (Spitzer 1991; Veh et al., 1995). Generell gibt es große Unterschiede zwischen einzelnen Zelltypen bezüglich der Verteilung von Ionenkanälen, u.a. hinsichtlich der axonalen oder somatodendritischen Expression.

Das altersabhängige Erscheinen der Kanäle auf Nervenzellen ist ein kritischer Faktor für die interdependente Verbindung zwischen neuronaler Aktivität und hippocampaler Netzwerkfunktion mit großer Relevanz für Synaptogenese und synaptische Aktivität (Maletic-Savatic et al. 1995; Frotscher et al. 2000). Somit ist es von großem Interesse, in welchem Zusammenhang relevante Kaliumkanalproteine während der Embryonal- und Postnatalentwicklung produziert und in welches Kompartiment sie sortiert werden. Die immunhistochemische Analyse *in vivo* und in areal-spezifischen hippocampalen und entorhinalen Nervenzellkulturen zeigte eine differentielle Verteilung mit erheblicher zeitlicher Variation. Unterschiede fanden sich beispielsweise im Beginn der Proteinexpression, der Sortierung in Moosfasertrakt-Axone, der konstanten Expression von der Postnatalperiode bis zur adulten Maus oder im nur transienten Proteinnachweis in spezifischen neuronalen Subpopulationen. So war beispielsweise das Kv1.2-Kanalprotein als einziges seiner Subfamilie nicht in Körnerzellen und im Moosfasertrakt nachweisbar. Kv1.1 wurde als erster Kanal im murinen Hippocampus exprimiert und war

bereits ab dem postnatalen Tag 6 eindeutig detektierbar. Kv1.1 und Kv1.2, nicht aber Kv1.4 und Kv3.4, waren in Axonen der seit kurzem beschriebenen Kir3.3-positiven GABAergen Interneurone (Grosse et al., 2003) exprimiert. Auffallend war auch die relativ ähnliche Expression der spannungsabhängigen K⁺-Kanäle Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 und Kv3.4 in Pyramidenzellen der CA3-Region ab dem postnatalen Tag 7-11, während nur das Kv3.4-Protein in diesen Zellen bis zur adulten Maus nachweisbar blieb. Die Kanalproteine Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 und Kv3.4 waren alle im Axon-Kompartiment nachweisbar, während aus der Gruppe der zusätzlich untersuchten Kir3-Subfamilie nur Kir3.3 axonal lokalisiert war. Die gleichartige Verteilung von Kv1.1 und Kv1.4 in Axonen der Körnerzellen des Gyrus dentatus beziehungsweise von Kv1.1 und Kv1.2 in den ‚Kir3.3-Interneuronen‘ lassen an mögliche Interaktionspartner von Heterotetrameren denken, unabhängig von der Möglichkeit der Proteine zur funktionellen Expression in homotetramerer Konformation (Drewe et al., 1992; Ottschytsch et al., 2002). Die Kombination der morphologischen Proteinanalyse in Hirnschnitten und primären Zellkulturen zeigte zudem eine große Zelltyp-spezifische Übereinstimmung der Kanalverteilung.

Die differentiellen altersabhängigen Verteilungsmuster der einzelnen Kaliumkanalproteine machen es wahrscheinlich, dass hippocampale Neurone über Zelltyp-spezifische Mechanismen der Sortierung in somatodendritische und axonale Kompartimente verfügen. Auf diese Weise kann das entwicklungsabhängige und axon-spezifische Verteilungsmuster von Ionenkanälen helfen, individuelle Populationen von hippocampalen Neuronen funktionell voneinander zu unterscheiden. Die Relevanz dieses funktionellen Kriteriums ergibt sich aus der Kenntnis, dass die axonale Verteilung von spannungsabhängigen K⁺-Kanälen eine Schlüsselrolle für die elektrophysiologischen Eigenschaften kortikaler Neurone (Shu et al., 2007) und die Modulation der Form des Aktionspotentials spielt (Kole et al., 2007).

Die Analyse der entwicklungsabhängigen Expression verschiedener K⁺-Kanalproteine unterstreicht den engen Bezug zwischen neuronaler Aktivität und funktioneller Reifung des hippocampalen Netzwerkes. Die axonale Verteilung von Ionenkanälen erlaubt des Weiteren eine präzisere Klassifizierung, um funktionell unterschiedliche hippocampale Neurone voneinander zu unterscheiden.

2.4 Astrozytäre Expression der BK β 1- and BK β 4-Untereinheiten der spannungs- und Ca²⁺-abhängigen BK-Kaliumkanäle

Seidel KN, Derst C, Höltje M, Veh RW, Prüss H. Expression of the voltage- and Ca²⁺-dependent BK potassium channel subunits BK β 1 and BK β 4 in rodent astrocytes. *Glia* 2011; doi: 10.1002/glia.21160.

Kaliumkanäle der BK-Familie (large-conductance Ca²⁺-activated potassium channels) sind weit verbreitete Ionenkanäle mit besonderer Bedeutung für physiologische Funktionen des menschlichen Körpers, einschließlich Blutfluss, Immunität und neuronale Übertragung (Lu et al., 2006). Durch ihre Eigenschaft einer synergistischen Aktivierung durch Membranpotentiale, Ca²⁺-Konzentrationen und Liganden sind sie ein Bindeglied in der Übertragung von intrazellulären Signalkaskaden und Erregbarkeit von Membranen (Rothberg et al., 2004). Sie sind ferner Schlüsselmoleküle der neurovaskulären Kopplung, da sie Kaliumionen aus astrozytären Endfüßen in den perivaskulären Raum freisetzen (Filosa et al., 2006) und damit an der Steuerung des zerebralen Blutflusses durch neuronale Aktivität beteiligt sind.

Außerhalb ihrer Lokalisation in Astrozyten der neurovaskulären Einheit ist die Verteilung in Gliazellen weitgehend unbekannt. Einzelne Arbeiten fanden Hinweise auf BK-Ströme in Rattenastrozyten (Gebremedhin et al., 2003) und BK α -Kanalprotein in Astrozyten-Primärkulturen (Ou et al., 2009). Die vielfältigen Funktionen der BK-Kanäle sind in hohem Maße von der Anwesenheit regulatorischer β -Untereinheiten abhängig, die u.a. die Empfindlichkeit gegenüber Signalmolekülen, Ca²⁺ und Membranspannungen steuern (Brenner et al., 2005; Torres et al., 2007). Morphologische Daten über die Expression der BK β -Untereinheiten in Astrozyten existieren bisher fast nicht. Aufgrund der (i) Bedeutung von Astrozyten für die meisten Hirnfunktionen, der (ii) Anwesenheit von BK-Kanälen in Gliazellen und der (iii) Notwendigkeit von β -Untereinheiten für eine korrekte BK-Kanalfunktion ist es von hohem wissenschaftlichen Interesse, welche der vier BK- β -Untereinheiten in Astrozyten nachgewiesen werden können.

Daher wurde die Verteilung von BK β -Protein und -mRNA in verschiedenen astrozytären Zellpopulationen im Gehirn von adulten Mäusen und Ratten sowie in Glia-Zellkulturen analysiert. Die BK β 2- und BK β 3-Untereinheiten ließen sich weder auf der mRNA- noch

auf der Protein-Ebene in Astrozyten nachweisen. Im Gegensatz dazu fanden sich BK β 4- (und geringer BK β 1-) Protein und Transkripte in etlichen Astrozyten-Populationen in situ, beispielsweise in der Capsula interna, im Corpus callosum, Hippocampus, Habenula und Nucleus arcuatus. Auffallend waren die sehr unterschiedlichen Expressionsmuster beispielsweise in Tanyzyten (nur BK β 1) oder in der Bergmann-Glia des Kleinhirns (nur BK β 4). Für die immunocytochemische Analyse des BK β 4-Proteins wurde im Rahmen dieser Studie ein polyklonaler, monospezifischer Antikörper aus dem Kaninchen gewonnen, affinitätsgereinigt, und die Spezifität mittels kompetitivem ELISA, Western Blot, Präinkubationstest und Transfektionen charakterisiert.

Besonders ausgeprägt war das immunhistochemische BK β 4-Signal in der Subventrikulärzone (SVZ) und in kultivierten astrozytären Vorläuferzellen aus der SVZ. In sich aus den Stammzellen entwickelnden Neuronen war die Expression von BK β 4 deutlich geringer ausgeprägt. Ein Gen-Expressionprofil der Vorläuferzellen zeigte, dass BK β 4 während der gesamten Entwicklung von der Nestin-positiven Stammzelle bis zur GFAP-positiven astrozytären Linie zu den am stärksten exprimierten Genen gehörte. Die Kolo-kalisation der BK β 4-Untereinheit mit dem BK α -Kanalprotein in etlichen Astrozyten legt eine funktionelle Beziehung nahe, bei der BK β 4 die vorrangige regulatorische Untereinheit für gliale BK-Kanäle sein könnte. In einigen Regionen fand sich eine hochgradige Expression der BK β 4-Untereinheit bei nur geringem Nachweis der α -Einheit, was die Möglichkeit eröffnet, dass BK β 4 noch zusätzliche unabhängige Funktionen haben könnte. Frühere Arbeiten zeigten die Interaktion von BK β 4 mit Natriumkanälen in *Drosophila* (Derst et al., 2006). Um diese Möglichkeit anhand des humanen Natriumkanals Nav1.6 zu prüfen, wurden Nav1.6 und BK β 4 in Zellen heterolog ko-exprimiert und elektrophysiologisch gemessen, was tatsächlich zu einer 50%-igen Reduktion des Natriumstroms führte.

Die Befunde der Arbeit lassen den Schluss zu, dass BK β 4 und BK β 1 die vorrangigen regulatorischen Untereinheiten von BK α -Kanälen in astrozytären Zellen sind. Ähnlich wie das von Neuronen bereits bekannt ist, hat BK β 4 vermutlich einen wichtigen Einfluss auf die Oberflächenexpression und Spannungsabhängigkeit von BK-Kanälen. Auf diese Weise sind BK β 4-Untereinheiten wahrscheinlich an der Steuerung des astrozytären Membranpotentials und der Kaliumhomöostase des Gehirns beteiligt.

2.5 Antikörper gegen Neurofascin in Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom

Prüss H, Schwab JM, Derst C, Görtzen A, Veh RW. Neurofascin as target of autoantibodies in Guillain-Barré syndrome. *Brain* 2011; doi: 10.1093/brain/awq372.

Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist eine akute, autoimmunologisch vermittelte inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie. Die angenommene pathogenetische Rolle von Antikörpern wird durch den positiven Effekt von therapeutisch verabreichten Immunglobulinen oder Plasmapherese gestützt. Insbesondere Antikörper gegen Ganglioside finden sich häufig im Serum der Patienten (van Doorn et al., 2008) und können durch Komplementaktivierung zur Schädigung peripherer Nerven – insbesondere im Bereich des Ranvierschen Schnürrings – führen (McGonigal et al., 2010). Dieser Schaden könnte die elektrophysiologischen Ausfallmuster und klinischen Symptome bei Patienten mit GBS erklären, auch die manchmal rasche Rückbildung von höhergradigen Muskellähmungen.

Da die Mehrheit krankheitsspezifischer autoimmunologischer Zielproteine weiter unbekannt ist, wurde in einer großen Kohorte von GBS-Patienten systematisch das Vorhandensein von Antikörpern gegen die Proteine Neurofascin und Contactin untersucht. Beide Moleküle sind wichtige Eiweiße am Ranvierschen Schnürring und spielen eine zentrale Rolle für die Integrität des Schnürrings und die saltatorische Erregungsleitung (Salzer et al., 2008; Sherman et al., 2005).

Für die Studie wurden Seren von 52 GBS-Patienten und 44 Probanden miteinander verglichen. Die Kohorten unterschieden sich nicht hinsichtlich Alter, Geschlecht, Serumalbumin und Immunglobulin-G-Gehalt des Serums. Für die Analyse der Autoantikörper wurde ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) entwickelt, bei dem die Titerplatte mit rekombinantem Neurofascin oder Contactin-2 beschichtet wurde. Die Spezifität des neuen Tests wurde durch die konzentrationsabhängige Blockade der photometrischen ELISA-Extinktion nach Präinkubation der Seren mit dem Zielprotein verifiziert. Darüber hinaus erkannten die Patienten-Antikörper im Western Blot die spezifische Bande des elektrophoretisch aufgetragenen Neurofascin-Proteins. Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied der Serumspiegel von anti-Neurofascin-Antikörpern mit deutlich höheren Werten bei GBS-

Patienten, obwohl auch einige gesunde Probanden erhöhte Titer aufwiesen. Die Serumentiter von Antikörpern gegen Contactin waren hingegen in beiden Kohorten nicht signifikant verschieden, was die Spezifität der gegen Neurofascin gerichteten humoralen Autoimmunität unterstreicht.

Die erhöhten Serumspiegel an Antikörpern gegen Neurofascin sind ein Hinweis auf neue Antikörper-vermittelte autoimmunologische Prozesse bei Patienten mit einem Guillain-Barré-Syndrom, entweder als Ursache des GBS oder – aus unserer Sicht wahrscheinlicher – als sekundärer Verstärkungsmechanismus. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Befunden fanden sich in einem Nagetiermodell des GBS, der so genannten experimentellen allergischen Neuritis, Autoantikörper gegen Neurofascin (Lonigro & Devaux 2009). Diese wurden bereits vor Beginn der Demyelinisierung nachgewiesen. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass Neurofascin-Autoantikörper zum axonalen Schaden in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose beitragen (Mathey et al., 2007).

Humorale Autoimmunität gegen Neurofascin könnte über verschiedene Mechanismen auch zu den bekannten Spätfolgen bei GBS-Patienten beitragen. Denkbar sind eine gestörte Remyelinisierung nach Bindung an Oligodendrozyten (Charles et al., 2002) oder eine Zerstörung der für die Erregungsleitung essentiellen funktionellen Architektur des Ranvierschen Schnürrings, insbesondere der Clusterung von Natriumkanälen (Susuki et al., 2007). Auch die hochgradige Expression von Neurofascin an den bei GBS-Patienten besonders betroffenen anatomischen Strukturen des peripheren Nerven, wie Paranodien und Schmidt-Lanterman-Inzisuren (Görtzen et al., 1999; Pillai et al., 2009; Willison 2005), stützen die Hypothese einer klinischen und pathophysiologischen Relevanz von anti-Neurofascin-Antikörpern.

Insbesondere die Expression von Neurofascin an sowohl axonalen als auch myelinisierten Strukturen impliziert eine Rolle für anti-Neurofascin-Antikörper bei herabgesetzter Erregungsleitung, axonalem Schaden und gestörter Remyelinisierung. Die vorliegenden Befunde suggerieren, dass weitere Proteine des Ranvierschen Schnürrings für die autoimmunologischen Mechanismen beim GBS verantwortlich sein könnten.

2.6 Retrospektiver Nachweis von Antikörpern gegen NMDA-Rezeptoren in Patienten mit ‚Enzephalitis ohne Erregernachweis‘

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):1735-1739.

Die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist eine seit kurzem bekannte, relativ häufige Form einer schweren Enzephalitis mit einem charakteristischen, in Phasen verlaufenden Krankheitsbild (Dalmau et al., 2008; Florance et al. 2009). Die Patienten werden meist durch ein schizophreniformes Syndrom mit formalen und inhaltlichen Denkstörungen (Wahn) und Halluzinationen auffällig, entwickeln aber zusätzlich Fieber, eine Bewusstseinsstörung, Hypoventilation, epileptische Anfälle, autonome Störungen oder Dyskinesien. Die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis wurde initial bei jungen Frauen mit Ovarial-Teratomen beschrieben (Dalmau et al., 2007), kommt aber auch häufig bei Frauen ohne Tumor sowie bei Männern und Kindern vor. Die Diagnosestellung der Erkrankung basiert auf der Kombination aus charakteristischem klinischen Bild, stützenden Befunden von Hirn-MRT, EEG und Liquoruntersuchung sowie dem Nachweis hochspezifischer Autoantikörper im Serum oder Liquor, die gegen die NR1-Untereinheit der Glutamaterezeptoren vom Typ NMDA gerichtet sind (Dalmau et al., 2008, Prüss et al., 2010c). Die Prognose der Erkrankung ist prinzipiell gut und die Symptome sind auch nach einer langen intensivmedizinischen Behandlung und Beatmungsdauer potentiell reversibel (Dalmau et al., 2008; Iizuka et al., 2008). Die ersten Fallsammlungen suggerieren, dass eine gute Prognose eng mit einer raschen Diagnosestellung, frühen immunmodulatorischen Therapie und – im Falle einer Neoplasie – besonders mit einer vollständigen Tumorentfernung korreliert (Dalmau et al., 2008; Florance et al. 2009; Irani et al., 2010). Bislang gibt es allerdings keine Daten zum natürlichen Verlauf der Erkrankung (d.h. ohne immunmodulierende Therapie). Daher erfolgte die vorliegende Arbeit mit den Zielen, zum einen retrospektiv Patienten mit einer anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis zu identifizieren und den klinischen Spontanverlauf zu analysieren, zum anderen, um den Anteil dieser Krankheit an unklar gebliebenen „Enzephalitiden ohne Erregernachweis“ abzuschätzen.

Für die Auswahl der Patienten wurden in einem 5-Jahres-Zeitraum anhand der Patientenakten der Neurologischen Intensivstation der Charité Campus Mitte sämtliche Patienten zwischen 18 und 35 Jahren (n = 505) auf das Vorhandensein der folgenden Kriterien geprüft: (a) Enzephalitis mit psychiatrischen Symptomen (Unruhe, paranoide Gedanken, Reizbarkeit, Halluzinationen), (b) epileptische Anfälle, (c) Liquorpleozytose und (d) Ausschluss einer viralen oder bakteriellen Ursache. Auf diese Weise wurden 7 weibliche Patienten identifiziert, von denen aus archivierten Blut- und Liquorproben die Diagnostik der NMDAR-Antikörper durchgeführt wurde. Hierbei zeigte sich bei 6 Patientinnen ein positiver Antikörper-Befund gegen NMDA-Rezeptoren.

Die Follow-up-Untersuchungen der wieder einbestellten Patientinnen zeigte bei allen eine klinische Besserung. Bei einer Patientin wurde durch die erneute umfassende Tumordiagnostik ein Ovarialteratom diagnostiziert. Drei Patientinnen hatten zur Behandlung der damals unklar gebliebenen Enzephalitis keine immunmodulierende Therapie erhalten. Bei einer von ihnen war es zu einem spontanen Verschwinden des Antikörper-Titers gekommen.

Experimente mittels Inkubation von primären hippocampalen Neuronenkulturen mit Patientenserum zeigten eine ausgeprägte Herunterregulation der NMDA-Rezeptoren in der Zellmembran, was den direkten pathogenetischen Effekt der Antikörper belegt. Dieser Effekt war nach Entfernen des Serums und Kultivierung mit Nährmedium nahezu vollständig reversibel, was Rückschlüsse auf die Reversibilität des klinischen Krankheitsbildes zulässt.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass die anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis unter solchen jungen Intensivpatienten, die an einer schweren, nicht-infektiologischen, durch die obigen Kriterien definierten Enzephalitis leiden, sehr häufig ist (6 von 7). Erstmals wird nachgewiesen, dass die NMDAR-Antikörper bei einem monophasischen Krankheitsverlauf spontan verschwinden können und dass es ohne immunmodulierende Therapie zu einem prognostisch günstigen „natürlichen“ Verlauf kommen kann. Ferner wird gezeigt, dass die Krankheit durch eine ausschließliche Antikörperproduktion im Liquorkompartiment verursacht sein kann. Insgesamt wird die klinisch-diagnostische Schlussfolgerung gezogen, dass bei einer „Enzephalitis ohne Erregernachweis“ stets an die anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis gedacht werden muss.

3. Diskussion

Die in der vorliegenden Habilitationsschrift zusammengefassten Arbeiten verfolgten das Ziel, eine morphologisch-strukturelle Charakterisierung von molekularen Kandidaten vorzunehmen, die durch unterschiedliche immunologische Mechanismen die Entstehung von Neurodegeneration begünstigen könnten. Dazu wurden sowohl zelluläre als auch Antikörper-vermittelte Mechanismen analysiert.

3.1 Zelluläre Immunmechanismen

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob eine genetische Ausschaltung der induzierbaren NO-Synthase in Mäusen nach einer akuten ZNS-Verletzung zu einer Reduzierung von sekundärem neurodegenerativen Schaden führt. Der vermutete zugrunde liegende Mechanismus war eine geringere Bildung von Stickstoffmonoxid, einem entzündungsfördernden Produkt von Stickoxid-Synthasen, insbesondere in einwandernden Blutzellen (Iadecola et al., 1997). Die Untersuchung der iNOS mRNA- und Proteinexpression, auch unter Verwendung von Knochenmarkchimären und Knockout-Mausstämmen, konnte die Hypothese einer iNOS-vermittelten Neurodegeneration in diesem akuten Schädigungsmodell nicht stützen (Prüss et al., 2008a). Es ist dennoch gut denkbar, dass iNOS an chronischer Neurodegeneration partizipiert. Ein möglicher Mechanismus ist die immunologische Rolle von iNOS-exprimierenden dendritischen Zellen (DC) beim Immunglobulin-Klassenwechsel (*class switch recombination*), insbesondere mit Produktion von IgA (Tezuka et al., 2007). Ob iNOS über diesen Weg an der neuen Rolle von IgA-vermittelter ZNS-Autoimmunität (s. unten) für immunvermittelte Neurodegeneration teilhat, wird durch weitere Forschung aufgeklärt werden müssen.

Ein anderer denkbarer Mechanismus ist die chronische Wirkung der postulierten Stickstoffmonoxid-Toxizität. Das setzt aber voraus, dass sich iNOS-exprimierende Zellen (insbesondere Makrophagen) über längere Zeiträume im ZNS befinden können. Da die chronische Akkumulation von Makrophagen in Gehirn und Rückenmark

phänomenologisch beschrieben ist (Fleming et al., 2006; Schwab et al., 2002), stellte sich die zentrale Frage, ob es nach einer akuten ZNS-Schädigung zur Expression von Oberflächenmolekülen kommt, die die Gewebepersistenz von Makrophagen erleichtern können. Im Modell der akuten Rückenmarksverletzung wurde die Expression des axonalen Guidance-Moleküls Sema7A untersucht, da für diese Proteingruppe zum einen bereits eine Verbreitung im ZNS beschrieben wurde (Nicolou et al., 2006), zum anderen hat Sema7A eine Wirkung auf Makrophagen, indem es deren Ausschüttung von Entzündungsmediatoren stimulieren kann (Suzuki et al., 2007). Nach dem experimentellen Trauma des Rückenmarks kam es zu einer spezifischen Akkumulation von Sema7A in der Läsion, vornehmlich in reaktiven Astrozyten als Bestandteil der gliotischen Narbe (Kopp et al., 2010). Mit der Hypothese in Übereinstimmung, fanden sich Makrophagen überwiegend in enger Nachbarschaft zu Sema7A -positiven Strukturen und exprimierten $\alpha 1\beta 1$ -Integrin, das als Sema7A-Rezeptor fungiert. Diese mögliche Rezeptor-vermittelte Bindung von entzündungsfördernden iNOS-positiven Immunzellen an den Läsionsort ist somit ein plausibler neuer Kandidatenmechanismus für chronische Neurodegeneration im ZNS.

3.2 Antikörper gegen Strukturen des zentralen und peripheren Nervensystems

Basierend auf klinischen Fallstudien über wahrscheinliche Zusammenhänge zwischen humoraler Autoimmunität gegenüber ZNS-Antigenen und neurodegenerativen Veränderungen (Prüss et al., 2007, 2008b), befasst sich der Schwerpunkt der Habilitationsschrift mit der anatomisch-morphologischen Charakterisierung der Expression von Kaliumkanälen im zentralen Nervensystem und der parallelen Analyse von anti-neuronalen Antikörpern in ausgewählten neurologischen Patientenkohorten.

Ein Patientenkollektiv, in dessen Krankheitsentstehung humorale Pathomechanismen als etabliert gelten (Willison et al., 2005), leidet am Guillain-Barré-Syndrom mit sensiblen und motorischen Leitungsstörungen der peripheren Nerven. Neben der Rolle von Anti-Gangliosid-Antikörpern sind weitere Epitope bisher nicht eindeutig nachgewiesen, obwohl deren Identifizierung für ein besseres Verständnis der Krankheit und eine

spezifischere Therapie erforderlich sind (van Doorn et al., 2008). Wir analysierten das Vorhandensein von Antikörpern gegen Neurofascin und Contactin, da diese Proteine am Ranvierschen Schnürring exprimiert werden und für die nodale Funktion, und somit eine korrekte saltatorische Erregungsleitung, erforderlich sind (Salzer et al., 2008; Sherman et al., 2005). Im Falle von Neurofascin ließ sich ein hochsignifikanter Unterschied der Serum-Antikörper-Titer zwischen GBS-Patienten und gesunden Probanden nachweisen (Prüss et al., 2011). Dieser neue Befund könnte mehrere kontroverse Aspekte des klinischen GBS-Krankheitsbildes erklären. Zum einen würde der rasche Krankheitsbeginn der Patienten gut zu dem akuten Effekt von anti-Neurofascin-Antikörpern in Tiermodellen passen (Mathey et al., 2007), außerdem kann die Neurofascin-Expression im ZNS das Psychosyndrom erklären, das einige Patienten entwickeln und mit dem Konzept einer reinen peripheren Neuropathie bisher nicht vereinbar war (Görtzen et al., 2004). Zum anderen könnten persistierende Antikörper an den chronischen Funktionsstörungen und Lähmungen einiger Patienten beteiligt sein, beispielsweise durch Störungen der Remyelinisierung oder der Anordnung der Natriumkanäle im Bereich des Schnürrings, so wie das für Gangliosidantikörper gezeigt wurde (Susuki et al., 2007). Wie für die meisten Antikörper, spielt die Aktivierung von Komplement wahrscheinlich auch für anti-Neurofascin-Antikörper eine zentrale Rolle. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Neurofascin gerade an den anatomischen Strukturen exprimiert wird, bei denen sie bei GBS-Patienten die stärksten Komplementablagerungen finden, insbesondere an den Ranvierschen Schnürringen (Prineas et al., 1981; McGonigal et al., 2010).

Die Studie wirft die Frage auf, ob Neurofascin-Antikörper an der Entstehung des GBS kausal beteiligt sind oder ob die Patienten als Folge einer sekundären Nervenschädigung Antikörper entwickeln. Zumindest konnte keine Assoziation von Antikörper-positiven Patienten mit elektrophysiologischen Subgruppen (z.B. Patienten mit peripheren Leitungsblöcken) gefunden werden. Das macht einen Einfluss auf persistierende Neurodegeneration und klinische Langzeitbeschwerden allerdings nicht weniger wahrscheinlich. Die Befunde legen nahe, dass auch andere nodale Proteine, beispielsweise *Gliomedin* oder *Caspr*, als autoimmunologische Zielstrukturen beim GBS in Frage kommen.

Die zweite klinisch-experimentelle Antikörperstudie sollte klären, wie hoch der Anteil von jungen Patienten mit ätiologisch unklar gebliebenen, schweren Enzephalitiden ist, in deren Liquor und Serum sich pathogenetische Antikörper gegen Glutamat-Rezeptoren vom Typ NMDA nachweisen lassen. Das klinische Bild von Patienten, bei denen über Jahrzehnte vor allem virale Enzephalitiden vermutet wurden, deren Erreger nicht isoliert werden konnten, erinnert an eine führende Pathologie des Frontal- und Temporallappens. Die anatomische Kenntnis der NMDA-Ionenkanalexpression ließ zusammen mit den areal-spezifischen klinischen Ausfallmustern an einen Zusammenhang denken. In der Tat hatte die große Mehrheit der Patienten positive Antikörper-Titer (Prüss et al., 2010c), und die experimentelle Testung dieser Antikörper in primären hippocampalen Neuronen bestätigte den pathogenetischen Effekt, der bei Patienten mit der seit 2-3 Jahren bekannten ‚klassischen‘ NMDA-Rezeptor-Enzephalitis beobachtet wurde (Dalmau et al., 2008; Hughes et al. 2010).

Trotz einer weitgehenden Reversibilität der Erkrankung leiden viele Patienten langfristig an residuellen Störungen von Kognition, Mnestic, Gedächtnis und Impulskontrolle (Prüss et al., 2010c; Dalmau et al., 2011), was die Frage nach immunvermittelten neurodegenerativen Veränderungen aufwirft. In der Tat konnten weitergehende Experimente mit Patienten- und Kontrollseren an hippocampalen Neuronenkulturen zeigen, dass es nicht zu einer ausschließlichen Herunterregulation der NMDA-Rezeptoren in der Zellmembran kommt, sondern dass auch eine (sekundär?) gestörte Membranexpression von synaptischen Proteinen auftritt. Sowohl die Synapsenproteine Synapsin und Synaptophysin als auch die vesikulären Glutamat- und GABA-Transportproteine wurden durch Inkubation mit dem Patientenserum vermindert, und prolongierte Inkubation für mehrere Tage führte zum Verlust etlicher Neurone (Prüss et al., 2011, eingereicht). Bei Patienten, die ausschließlich oder zusätzlich zu den bekannten anti-NMDA-Rezeptor-Antikörpern vom Immunglobulin-G-Typ (IgG) noch Antikörper der IgA-Subklasse hatten, war dieser Effekt noch ausgeprägter (Prüss et al., 2011, eingereicht).

Diese Ergebnisse implizieren, dass ein spezifischer Antikörper über die Beeinflussung seines Zielproteins hinaus zu chronischem Zellschaden und Neurodegeneration führen kann. Die fehlende Komplementaktivierung von Antikörpern der IgA-Subklasse könnte erklären, warum es bei einigen Patienten zu chronisch-progredienten kognitiven

Störungen kommt, ohne dass sich im Kontrastmittel-MRT des Gehirns oder im Liquor Hinweise auf eine Entzündung finden. Damit zeigen diese Experimente eine Verbindung zwischen Autoimmunität und Neurodegeneration auf und könnten zur Entwicklung von Erfolg versprechenden immunmodulatorischen Therapien bei einer Subgruppe von Patienten mit kognitiven Störungen und Demenzen führen.

3.3 Kaliumkanäle in Hirnregionen für Lernen und Gedächtnis

Die gezeigten neurodegenerativen Effekte der gegen Ionenkanäle gerichteten Antikörper machen es sehr wahrscheinlich, dass bei kognitiv beeinträchtigten Patienten in Zukunft weitere Kanäle identifiziert werden, die Ziel einer antineuronalen Autoimmunität sind. Angesichts der Vielfalt sowie der differentiellen zeitlichen und räumlichen Expression sind K^+ -Kanäle besonders viel versprechende molekulare Kandidaten. Da die genaue Kenntnis ihrer anatomischen Verteilung eine Voraussetzung für das Verständnis humoral vermittelter neurologischer Erkrankungen ist, war die detaillierte morphologische Analyse zahlreicher K^+ -Kanäle im ZNS ein Fokus der Untersuchungen, insbesondere hinsichtlich einer Expression in Axonen hippocampaler Strukturen.

Bereits im sich entwickelnden Hippocampus des murinen Gehirns spielen K^+ -Kanäle eine Rolle, sind differentiell exprimiert (Spitzer 1991) und für die Entwicklung des hippocampalen Netzwerkes und der Synaptogenese von großer Bedeutung (Maletic-Savatic et al., 1995; Frotscher et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die spannungsgesteuerten K^+ -Kanäle Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 und Kv3.4 und der einwärts-gleichrichtende K^+ -Kanal Kir3.3 in hippocampalen Axonen mit erheblicher zeitlicher Variation auftreten (Prüss et al., 2010a). Die axonale Expression von Kir3.3 war zuvor auch in Nervenzellen der Raphe dokumentiert worden (Prüss et al., 2008c), während die anderen Vertreter der Kir3-Subfamilie im Hippocampus nur im somatodendritischen Kompartiment nachgewiesen werden konnten (Eulitz et al., 2007; Prüss et al., 2010a). Kanalproteine der vier Vertreter der Kir2-Familie waren vor allem im hippocampalen Gyrus dentatus der Ratte, Kir2.2 und Kir2.3 zusätzlich auch deutlich im Cornu ammonis exprimiert (Prüss et al., 2003, 2005). Aus der Gruppe der ATP-gesteuerten K^+ -Kanäle

fanden sich sowohl Kir6.1 als auch Kir6.2 in Neuronen des Hippocampus ohne wesentliche Neuropilfärbung; die Intensität der Immunreaktivität war dabei von Kir6.2 am stärksten (Thomzig et al., 2003, 2005). Hervorzuheben ist, dass die untersuchten Kanalproteine nicht nur neuronal exprimiert wurden, sondern dass einige auch in Gliazellen des Hippocampus nachgewiesen werden konnten. Zu diesen astrozytären Kanälen gehören beispielsweise BK β 1 und BK β 4 aus der BK-Familie, einer Gruppe von K⁺-Kanälen mit besonderer Bedeutung für Immunität, neuronale Aktivität und neurovaskuläre Kopplung (Salzmann et al., 2010; Seidel et al., 2011).

Basierend auf der spezifischen Lokalisation vieler K⁺-Kanäle in Strukturen der Hippocampus-Formation gehen wir davon aus, dass der zu erwartende Nachweis humoraler Autoimmunität (im Sinne einer immunvermittelten *K⁺ channelopathy*) in einer Subgruppe von Patienten mit kognitiven Störungen kausal mit der gestörten Gedächtnisbildung und dem Abruf von Erinnerungen verknüpft ist. Wir postulieren, dass eine eingeschränkte K⁺-Kanalfunktion über die dadurch veränderte neuronale Aktivität zu einer gestörten Funktion des hippocampalen Netzwerkes führt.

Die dabei denkbaren Schädigungsmechanismen sollten denen anderer Antikörper-vermittelter Erkrankungen entsprechen (Abbildung 2). Dazu gehören ein Rezeptor-Antagonismus oder -Agonismus, die Veränderung der Rezeptordichte durch Internalisierung der Rezeptoren oder die Aktivierung des Komplementsystems. So wurde beispielsweise mit Serum von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses gezeigt, dass darin enthaltene Antikörper agonistisch am NMDA-Rezeptor wirken und die Poren-Permeabilität beeinflussten (Zhang et al., 2008). Mit Serum von Patienten mit einer NMDA-Rezeptor-Enzephalitis wurde nachgewiesen, dass es zu einer Internalisierung des Rezeptors kommt (Hughes et al., 2010). Aquaporin-4-Antikörper bei Patienten mit Neuromyelitis optica sind ein Beispiel für die Initiierung deutlicher Komplementaktivierung (Jarius et al., 2008).

Über diese Mechanismen könnten auch Antikörper gegen K⁺-Kanäle schließlich zu einer Störung des Membranpotentials, der Kaliumhomöostase des Gehirns, veränderter synaptischer Konnektivität oder neuronaler Zytotoxizität führen (Abbildung 2).

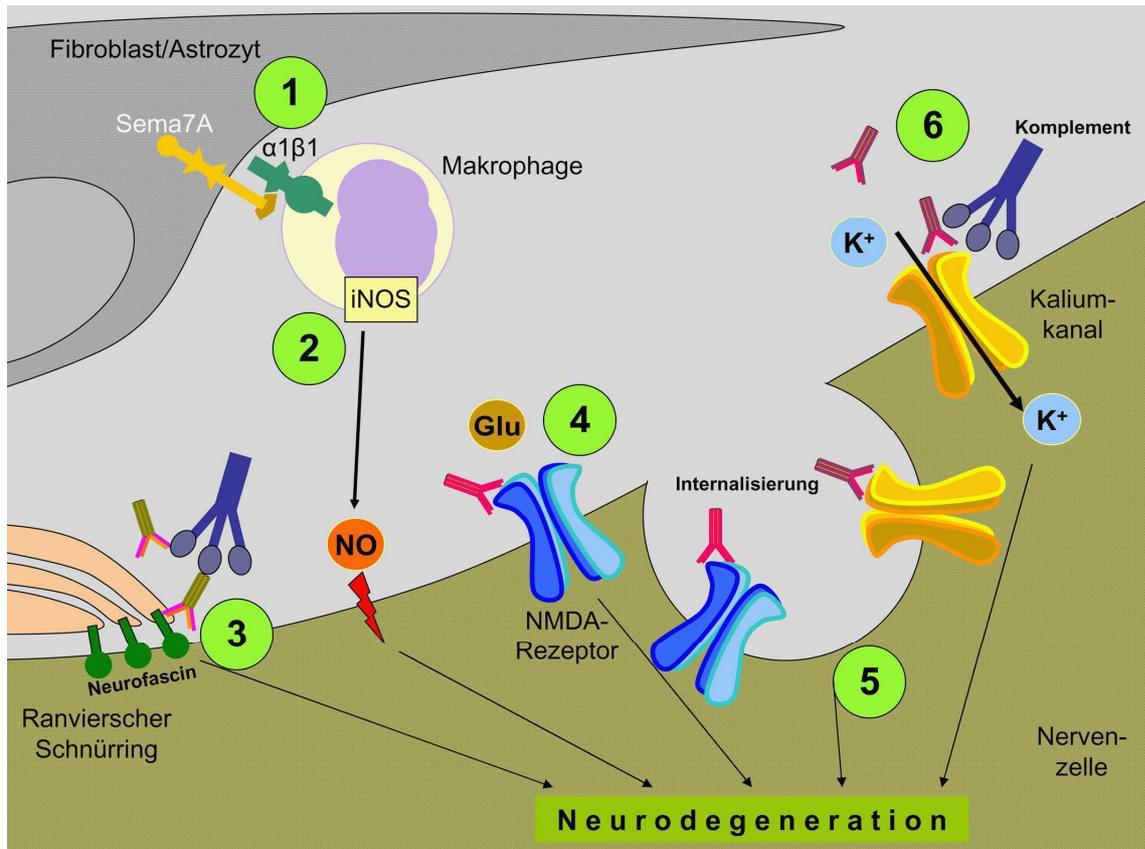


Abbildung 2. Synopsis der in der vorliegenden Arbeit untersuchten immunologischen Mechanismen, die Neurodegeneration befördern könnten.

Die Expression von Sema7A im glialen Stützgewebe des Nervensystems (①) führt zur Akkumulation von Makrophagen durch Bindung an deren $\alpha1\beta1$ -Integrin. Makrophagen synthetisieren neurotoxische Stickoxide über ihre induzierbare NO-Synthase iNOS (②). Antikörper gegen Neurofascin binden an paranodale Strukturen und führen zur Aktivierung und Ablagerung von Komplementfaktoren (③). Antikörper gegen NMDA-Rezeptoren wirken agonistisch und führen wie ein Ligand zur Überfunktion des Rezeptors (④), oder sie leiten eine Internalisierung der Rezeptoren mit Funktionsverlust ein (⑤). In Analogie zu den etablierten Befunden kann zu den möglichen Schädigungsmechanismen von Kaliumkanal-Antikörpern die Ablagerung von Komplement, die Überaktivierung des Kanals mit Störung der Kaliumhomöostase, Funktionsverlust durch Internalisierung und Veränderungen des Membranpotentials gehören (⑥).

4. Zusammenfassung

Bei vielen akuten und chronischen neurologischen Krankheitsbildern spielen immunologische Mechanismen eine pathogenetische Rolle und können zu Neurodegeneration führen. Die Schädigung von Nervenzellen kann dabei über Immunzellen, zytotoxische Mediatoren oder Antikörper erfolgen. In den vorgestellten Studien sind mehrere molekulare Kandidaten untersucht worden, die Teil der komplexen Kaskaden immunvermittelter Neurodegeneration sein könnten.

Die Analyse der Rolle der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) im murinen Schlaganfall machte einen Anteil von iNOS an der akuten Schädigung des Zentralnervensystems (ZNS) unwahrscheinlich. Mit dem axonalen Guidance-Molekül Sema7A wurde allerdings ein Protein charakterisiert, das durch seine hier nachgewiesene Expression im glialen Stützgewebe zur Akkumulation von iNOS-produzierenden Makrophagen nach einer ZNS-Verletzung führen könnte. Die somit chronische Anwesenheit toxischer Stickoxide könnte einen neurodegenerativen Prozess begünstigen.

Auf der Seite der humoralen immunologischen Mechanismen wurde an zwei beispielhaften Antigenen des peripheren und zentralen Nervensystems geprüft, ob Antikörper gegen Ionenkanäle oder Kanal-assoziierte Strukturen bei neurologischen Patienten vermehrt nachweisbar sind. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem Guillain-Barré-Syndrom gehäuft Antikörper gegen Neurofascin aufweisen, die aufgrund ihrer komplementaktivierenden Eigenschaften wahrscheinlich zum neurodegenerativen Schaden bei dieser immunvermittelten Neuropathie beitragen. Bei Patienten mit einer ätiologisch nicht zugeordneten Enzephalitis konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit pathogenetisch relevante Antikörper gegen Glutamat-Ionenkanäle vom Typ NMDA aufweist.

Parallel zur Suche von Autoimmun-Antikörpern bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen erfolgte eine detaillierte Analyse der Verteilung etlicher Kaliumkanal-Proteine im Nagetier-ZNS. Es zeigte sich, dass mehrere Kanäle in den zentralen Strukturen der Gedächtnisbildung exprimiert werden. Mit dieser morphologischen Charakterisierung ist eine wichtige Voraussetzung geschaffen worden, um – nach der vorhersagbaren Identifizierung von Kaliumkanal-Antikörpern in neurologischen Patienten – die klinische Symptomatik mit anatomischen Strukturen zu korrelieren.

5. Literaturangaben

- Alaedini A. et al. 2007. Immune cross-reactivity in celiac disease: anti-gliadin antibodies bind to neuronal synapsin I. *J. Immunol.* 178:6590-6595
- Ankeny DP, Lucin KM, Sanders VM, McGaughy VM, Popovich PG. 2006. Spinal cord injury triggers systemic autoimmunity: evidence for chronic B lymphocyte activation and lupus-like autoantibody synthesis. *J Neurochem* 99(4):1073-87
- Ankeny DP, Guan Z, Popovich PG. 2009. B cells produce pathogenic antibodies and impair recovery after spinal cord injury in mice. *J Clin Invest* 119:2990-99
- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739
- Ben-Horin S, Bank, I. 2004. The role of very late antigen-1 in immune-mediated inflammation. *Clin Immunol* 113:119-129
- Billingham RE & Boswell T. 1953. Studies on the problem of corneal homografts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 141:392-406
- Brenner R, Chen, QH, Vilaythong, A, Toney, GM, Noebels, JL, Aldrich, RW. 2005. BK channel β 4 subunit reduces dentate gyrus excitability and protects against temporal lobe seizures. *Nat Neurosci* 8:1752-1759
- Cash D, Beech JS, Rayne RC, Bath PMW, Meldrum BS, Williams SCR (2001) Neuroprotective effect of aminoguanidine on transient focal ischaemia in the rat brain. *Brain Res* 905:91–103
- Caterall W, Chandy, G, Gutman, G. 2002. *The IUPHAR Compendium of Voltage-Gated Ion Channels*. Leeds, UK: IUPHAR Media
- Coetzee W, Amarillo, JC, Chow, A, et al. 1999. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann NY Acad Sci* 868:233-285
- Dalmau J, Tuzun E, Wu HY et al (2007) Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 61:25–36
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG et al (2008) Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7:1091–98
- Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. 2011. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 10(1):63-74
- Delorme G, Saltel, F, Bonnelye, E, Jurdic, P, Machuca-Gayet, I. 2005. Expression and function of semaphorin 7A in bone cells. *Biol Cell* 97:589-597
- Derst C, Walther, C, Veh, RW, Wicher, D, Heinemann, SH. 2006. Four novel sequences in *Drosophila melanogaster* homologous to the auxiliary Para sodium channel subunit TipE. *Biochem Biophys Res Commun* 339:939-948

- De Winter F, Oudega, M, Lankhorst, AJ, Hamers, FP, Blits, B, Ruitenber, MJ, Pasterkamp, RJ, Gispen, WH, Verhaagen, J. 2002. Injury-induced class 3 semaphorin expression in the rat spinal cord. *J Exp Neurol* 175(1):61-75
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-7
- Drewe JA, Verma S, Frech G, Joho RH. 1992. Distinct spatial and temporal expression patterns of K⁺ channel mRNAs from different subfamilies. *J Neurosci* 12:538-548
- Duffy LM, Chapman AL, Shaw PJ, Grierson AJ. 2011. The role of mitochondria in the pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01166.x
- Eulitz D, Prüss H, Derst C, Veh RW. 2007. Heterogeneous distribution of kir3 potassium channel proteins within dopaminergic neurons in the mesencephalon of the rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 27(3):285-302
- Fawcett J, Asher, RA. 1999. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49:377-391
- Filosa J, Bonev, AD, Straub, SV, Meredith, AL, Wilkerson, MK, Aldrich, RW, Nelson, MT. 2006. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nature Neuroscience* 9:1397
- Fleming J, Norenberg, MD, Ramsay, DA, Dekaban, GA, Marcillo, AE, Saenz, AD, Pasquale-Styles, M, Dietrich, WD, Weaver, LC. 2006. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* 129:3249-3269
- Florange NR, Davis RL, Lam C et al. 2009. Anti-NMDA Receptor Encephalitis in Children and Adolescents. *Ann Neurol* 66:11-18
- Frotscher M, Drakew A, Heimrich B. 2000. Role of afferent innervation and neuronal activity in dendritic development and spine maturation of fascia dentata granule cells. *Cereb Cortex* 10:946-951
- Galea I, Bechmann I, Perry VH. 2007. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* 28(1):12-8
- Gebremedhin D, Yamaura, K, Zhang, C, Bylund, J, Koehler, RC, Harder, DR. 2003. Metabotropic Glutamate Receptor Activation Enhances the Activities of Two Types of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels in Rat Hippocampal Astrocytes. *J Neurosci* 23(5):1678 -1687
- Görtzen A, Schlüter, S, Veh, RW. 1999. Schmidt-Lanterman's incisures - the principal target of autoimmune attack in demyelinating Guillain-Barré syndrome? *J Neuroimmunol* 94:58-65
- Görtzen A, Schlüter, S, Veh, RW. 2004. Anti-astrocyte Autoantibodies in Guillain-Barré syndrome - Possible Involvement in the Pathophysiology of a Psychosyndrome? *Autoimmunity* 37:521-528
- Grosse G, Eulitz D, Thiele T, Pahner I, Schroeter S, Takamori S, Grosse J, Wickman K, Tapp R, Veh RW, Ottersen OP, Ahnert-Hilger G. 2003. Axonal sorting of Kir3.3 defines a GABA-containing neuron in the CA3 region of rodent hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 24:709-724

- Gundersen V. 2010. Protein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 190:82-7.
- Heneka MT, O'Banion MK. 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 184:69-91
- Hinson SR et al. 2007. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. *Neurology* 69:2221-2231
- Holmes S, Downs AM, Fosberry A, Hayes PD, Michalovich D, Murdoch P, Moores K, Fox J, Deen K, Pettman G, Wattam T, Lewis C. 2002. Sema7A is a potent monocyte stimulator. *Scand J Immunol* 56:270-275
- Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, Parsons TD, Lynch DR, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. 2010. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci* 30(17):5866-75
- Hynes R. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687
- Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 17:9157-64
- Iizuka T, Sakai F, Ide T et al (2008) Anti-NMDAR encephalitis in Japan: long-term outcome without tumor removal. *Neurology* 70(7):504-11
- Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, Friese MA, Galea I, Kullmann DM, Beeson D, Lang B, Bien CG, Vincent A. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain.* 2010 Jun;133(Pt 6):1655-67.
- Jarius S. et al. 2008. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nature Clin Pract Neurol* 4:202-214.
- Kaneko S, Iwanami A, Nakamura M, Kishino A, Kikuchi K, Shibata S, Okano HJ, Ikegami T, Moriya A, Konishi O, Nakayama C, Kumagai K, Kimura T, Sato Y, Goshima Y, Taniguchi M, Ito M, He Z, Toyama Y, Okano H. 2006. A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med* 12(12):1380-1389
- Kang H, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. 2007. Semaphorin 7A plays a critical role in TGF-beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 204(5):1083-1093
- Kirvan CA, Swedo SE, Snider LA, Cunningham MW. 2006. Antibody-mediated neuronal cell signaling in behavior and movement disorders. *J Neuroimmunol* 179:173-179
- Kole MHP, Letzkus JJ, Stuart GJ. 2007. Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* 55:633-647
- Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, Schwab JM, Prüss H. 2010. Spinal cord injury induces differential expression of the profibrotic semaphorin 7A in the developing and mature glial scar. *Glia* 58(14):1748-56
- Lang B & Vincent A. 2003. Autoantibodies to ion channels at the neuromuscular junction. *Autoimmun Rev* 2:94-100

- Leask A, Abraham, DJ. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18(7):816-827
- Lerouet D, Jafarian-Tehrani M, Louin G, Palmier B, Bonnefont-Rousselot D, Plotkine M, Margail I (2005) Lack of iNOS induction in a severe model of transient focal cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 195:218-28
- Llinas R. 1988. The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242:1654-1664
- Loihl AK, Asensio V, Campbell IL, Murphy J (1999) Expression of nitric oxide synthase (NOS)-2 following permanent focal ischemia and the role of nitric oxide in infarct generation in male, female and NOS-2 gene-deficient mice. *Brain Res* 830:155–64
- Lonigro A, Devaux, JJ. 2009. Disruption of neurofascin and gliomedin at nodes of Ranvier precedes demyelination in experimental allergic neuritis. *Brain* 132:260-273
- Lu R, Alioua, A, Kumar, Y, Eghbali, M, Stefani, E, Toro, L. 2006. MaxiK channel partners: Physiological impact. *J Physiol (Lond)* 570:65-72
- Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F. 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130:1089-104
- Maletic-Savatic M, Lenn NJ, Trimmer JS. 1995. Differential spatiotemporal expression of K⁺ channel polypeptides in rat hippocampal neurons during developing in situ and in vitro. *J Neurosci* 15(5):3840-3851
- Mathey E, Derfuss, T, Storch, MK, Williams, KR, Hales, K, Woolley, DR, et al. 2007. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 204:2363-2372
- Matus S et al. 2007. Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *J Exp Med* 204:3221-3234
- McGonigal R, Rowan EG, Greenshields KN, Halstead SK, Humphreys PD, Rother RP, et al. 2010. Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain* 133:1944-60
- Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. 2006. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol* 59(6):880-92
- Meinl E, Krumbholz M, Derfuss T, Junker A, Hohlfeld R. 2008. Compartmentalization of inflammation in the CNS: a major mechanism driving progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 274:42-4
- Moro MA, Cárdenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I (2004) Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 36:265-75
- Niclou S, Ehlert, EM, Verhaagen, J. 2006. Chemorepellent axon guidance molecules in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23(3-4):409-421

- Norenberg M. 1994. Astrocyte responses to CNS injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:213-220
- Newsom-Davis J. 2007. The emerging diversity of neuromuscular junction disorders. *Acta Myol* 26:5-10
- Otschytsch N, Raes A, Van Hoorick D, Snyders DJ. 2002. Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. *Proc Natl Acad Sci* 12:7986-7991
- Ou J, Kumar, Y, Alioua, A, Sailer, C, Stefani, E, Toro, L. 2009. Ca²⁺- and Thromboxane-Dependent Distribution of MaxiK Channels in Cultured Astrocytes: From Microtubules to the Plasma Membrane. *Glia* 57:1280-1295
- Pasterkamp R, Giger, RJ. 2009. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol* 19(3):263-274
- Pasterkamp R, Peschon, JJ, Spriggs, MK, Kolodkin, AL. 2003. Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs. *Nature* 424:398-405
- Perry VH. 2010. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 120(3):277-86
- Pillai A, Thaxton, C, Pribisko, AL, et al. 2009. Spatiotemporal Ablation of Myelinating Glia-Specific Neurofascin (NfascNF155) in Mice Reveals Gradual Loss of Paranodal Axoglial Junctions and Concomitant Disorganization of Axonal Domains. *Journal of Neuroscience Research* 87:1773-1793
- Pleasure D. 2008. Diagnostic and pathogenic significance of glutamate receptor autoantibodies. *Arch Neurol* 65:589-592
- Prineas J. 1981. Pathology of the Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 9(Suppl):6-19
- Prüss H, Wenzel M, Eulitz D, Thomzig A, Karschin A, Veh RW. 2003. Kir2 potassium channels in rat striatum are strategically localized to control basal ganglia function. *Brain Res Mol Brain Res* 110(2):203-19
- Prüss H, Derst C, Lommel R, Veh RW. 2005. Differential distribution of individual subunits of strongly inwardly rectifying potassium channels (Kir2 family) in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 139(1):63-79
- Prüss H, Voltz R, Flath B, Rudolph B, Klingebiel R, Zschenderlein R, Prass K. 2007. Anti-Ta-associated paraneoplastic encephalitis with occult testicular intratubular germ-cell neoplasia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78(6):651-2
- Prüss H, Prass K, Ghaeni L, Milosevic M, Muselmann C, Freyer D, Roysl G, Reuter U, Baeva N, Dirnagl U, Meisel A, Priller J. 2008a. Inducible nitric oxide synthase does not mediate brain damage after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 28(3):526-39
- Prüss H, Voltz R, Gelderblom H, Bohner G, Munz DL, Zschenderlein R, Wandinger KP. 2008b. Spontaneous remission of anti-Ma associated paraneoplastic mesodiencephalic and brainstem encephalitis. *J Neurol* 255(2):292-4
- Prüss H, Derst C, Marinc C, Wenzel M, Veh RW. 2008c. Expression of Kir3.3 potassium channel subunits in supraependymal axons. *Neurosci Lett* 445(1):89-93

- Prüss H, Grosse G, Brunk I, Veh RW, Ahnert-Hilger G. 2010a. Age-dependent axonal expression of potassium channel proteins during development in mouse hippocampus. *Histochem Cell Biol* 133(3):301-12
- Prüss H, Dalmau J, Arolt V, Wandinger KP. 2010b. Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis: Ein interdisziplinäres Krankheitsbild. *Der Nervenarzt* 81(4):396-405
- Prüss H, Dalmau J, Harms L, Höltje M, Ahnert-Hilger G, Borowski K, Stoecker W, Wandinger KP. 2010c. Retrospective analysis of NMDA receptor antibodies in encephalitis of unknown origin. *Neurology* 75(19):1735-9
- Prüss H, Schwab JM, Derst C, Görtzen A, Veh RW. 2011. Neurofascin as target of autoantibodies in Guillain-Barre syndrome. *Brain* [Epub ahead of print]
- Ray S, Franki, SN, Pierce, RH, Dimitrova, S, Koteliansky, V, Sprague, AG, Doherty, PC, de Fougères, AR, Topham, DJ. 2004. The collagen binding $\alpha 1\beta 1$ integrin VLA-1 regulates CD8 T cell-mediated immune protection against heterologous influenza infection. *Immunity* 20:167-179
- Rich JB, Rasmusson DX, Folstein MF, Carson KA, Kawas C, Brandt J. 1995. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Neurology* 45:51-55
- Ross CA, Tabrizi SJ. 2011. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 10(1):83-98
- Rothberg B. 2004. Allosteric modulation of ion channels: the case of maxi-K. *Sci STKE*:pe16
- Ryan DP, Ptáček LJ. 2010. Episodic neurological channelopathies. *Neuron* 68(2):282-92
- Salzer J, Brophy, PJ, Peles, E. 2008. Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia* 56:1532-1540
- Salzmann M, Seidel KN, Bernard R, Prüss H, Veh RW, Derst C. 2010. BKbeta1 subunits contribute to BK channel diversity in rat hypothalamic neurons. *Cell Mol Neurobiol* 30(6):967-76
- Sandvig A, Berry, M, Barrett, LB, Butt, A, Logan, A. 2004. Myelin-, Reactive Glia-, and Scar-Derived CNS Axon Growth Inhibitors: Expression, Receptor Signaling, and Correlation with Axon Regeneration. *Glia* 46:225-251
- Schwab J, Beschorner, R, Meyermann, R, Gözalan, F, Schluesener, HJ. 2002. Persistent accumulation of cyclooxygenase-1-expressing microglial cells and macrophages and transient upregulation by endothelium in human brain injury. *J Neurosurg* 96(5):892-899
- Schwab J, Conrad, S, Monnier, PP, Julien, S, Mueller, BK, Schluesener, HJ. 2005a. Spinal cord injury-induced lesional expression of the repulsive guidance molecule (RGM). *Eur J Neurosci* 21(6):1569-1576
- Schwab J, Monnier, PP, Schluesener, HJ, Conrad, S, Beschorner, R, Chen, L, Meyermann, R, Mueller, BK. 2005b. Central nervous system injury-induced repulsive guidance molecule expression in the adult human brain. *Arch Neurol* 62(10):1561-1568

- Schwab M, Bartholdi, D. 1996. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76:319-370
- Seidel KN, Derst C, Höltje M, Veh RW, Prüss H. 2011. Expression of the voltage- and Ca²⁺-dependent BK potassium channel subunits BK β 1 and BK β 4 in rodent astrocytes. *Glia* (in press).
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14(2):164-74
- Sherman D, Tait, S, Melrose, S, Johnson, R, Zonta, B, Court, FA, Macklin, WB, Meek, S, Smith, AJ, Cottrell, DF, Brophy, PJ. 2005. Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron* 48:737-742
- Shu Y, Yu Y, Jang Y, McCormick DA. 2007. Selective control of cortical axonal spikes by a slowly inactivating K⁺ current. *Proc Natl Acad Sci* 104:11453-11458
- Silver J, Miller, JH. 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156
- Spitzer NC. 1991. A developmental handshake: neuronal control of ionic currents and their control of neuronal differentiation. *J Neurobiol* 22(7):659-673
- Strand T, Alling C, Karlsson B, Karlsson I & Winblad B. 1984. Brain and plasma proteins in spinal fluid as markers for brain damage and severity of stroke. *Stroke* 15:138-144
- Suzuki K, Rasband, MN, Tohyama, K, et al. 2007. Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J Neurosci* 27:3956-3967
- Suzuki K, Okuno, T, Yamamoto, M, Pasterkamp, RJ, Takegahara, N, Takamatsu, H, Kitao, T, Takagi, J, Rennert, PD, Kolodkin, AL, Kumanogoh, A, Kikutani, H. 2007. Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through α 1 β 1 integrin. *Nature* 446(7136):680-684
- Tan J, Town T, Paris D, Mori T, Suo Z, Crawford F, Mattson MP, Flavell RA, Mullan M. 1999. Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science* 286:2352-2355
- Tezuka, H. et al. 2007. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* 448:929-933
- Thomzig A, Prüss H, Veh RW. 2003. The Kir6.1-protein, a pore-forming subunit of ATP-sensitive potassium channels, is prominently expressed by giant cholinergic interneurons in the striatum of the rat brain. *Brain Res* 986(1-2):132-8
- Thomzig A, Laube G, Prüss H, Veh RW. 2005. Pore-forming subunits of K-ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and cellular distribution in the rat brain. *J Comp Neurol* 484(3):313-30
- Torres Y, Morera, FJ, Carvacho, I, Latorre, R. 2007. A Marriage of Convenience: β -Subunits and Voltage-dependent K⁺ Channels. *J Biol Chem* 282:24485-24489

- Tristani-Firouzi M, Etheridge SP. 2010. Kir 2.1 channelopathies: the Andersen-Tawil syndrome. *Pflugers Arch* 460(2):289-94
- van Doorn A, Ruts, L, Jacobs, BC. 2008. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *Lancet Neurol* 7:939-950
- Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O. 1995. Immunocytochemical localization of five members of the Kv1 channel-subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localization in rat brain. *Eur J Neurosci* 7:2189-2205
- Vincent, A. et al. 2004. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 127:701-712
- Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, Weidner J, Mumford R, Webber R, Nathan C, Roberts AB, Lippa CF, Sporn MB. 1996. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J Exp Med* 184:1425-1433
- Willison H. 2005. The immunobiology of Guillain-Barré syndromes. *J Peripher Nerv Syst* 10:94-112
- Yu H, Kolodkin, AL. 1999. Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron* 22(1):11-14
- Zhang, J. et al. 2008. Identification of DNA-reactive B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods* 338:79-84
- Zhu DY, Liu SH, Sun HS, Lu YM (2003) Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J Neurosci* 23:223–9

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den Leitern der Arbeitsgruppen, in denen ich die Möglichkeit zur experimentellen und klinischen Forschung hatte – Herrn Prof. Dr. R.W. Veh, Herrn Prof. Dr. J. Priller, Herrn Prof. Dr. U. Dirnagl und Herrn Prof. Dr. Dr. J.M. Schwab. Durch großzügige Förderung, Enthusiasmus, wechselseitiges Vertrauen, anregende Diskussionen, Tiefgründigkeit und Erlebbarmachung einer wissenschaftlichen Perspektive haben sie meinen Werdegang entscheidend geprägt.

Die wissenschaftlichen, technischen und studentischen Mitarbeiter der jeweiligen Arbeitsgruppen – Abteilung für Molekulare Neuroanatomie, Abteilung für Molekulare Psychiatrie und Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité – haben durch fundierte Kenntnisse, uneigennützigte Hilfestellungen, freundschaftlichen Rat und eine produktive Atmosphäre maßgeblich zum Gelingen der entstandenen Arbeiten beigetragen. Dafür möchte ich herzlich danken.

Die Grundlage meines Lebensweges wurde zu jedem Zeitpunkt durch meine Familie gebildet, der ich für ihre fortwährende liebevolle Unterstützung und schöpferische Anteilnahme, das friedvolle Miteinander und den freiheitlichen Geist danke.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

..... 21. Feb. 2011

Datum

.....

Unterschrift