

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

DISSERTATION

Antigenspezifische T-Lymphozytenantworten als
Immunmarker in verschiedenen Varianten der chronisch
inflammatorisch demyelinsierenden Polyneuropathie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Markus Diederich
aus der Hansestadt Korbach

Datum der Promotion: 13.12.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Abstracts	
1.1 Abstract auf Deutsch	3
1.2 Abstract auf Englisch	4
2. Manteltext	
2.1 Einleitung	6
2.2 Methodik	
2.2.1 Patient*innen ¹	8
2.2.2 Blutproben	9
2.2.3 Antigene	10
2.2.4 ELISPOT	10
2.2.5 ELISA	12
2.2.6 Statistik	13
2.3 Ergebnisse	
2.3.1 Charakteristik der Patient*innengruppen	15
2.3.2 Spezifische TH1-Antworten gegen Neurofascin und myelinspezifische Antigene sind mit verschiedenen Varianten der CIDP assoziiert	16
2.3.3 Keine humorale Reaktion gegen Neurofascin-Epitope in CIDP-Patient*innen und Kontrollen nachweisbar	17
2.4 Diskussion	19
2.6 Referenzen	26
3. Eidesstattliche Versicherung	28
4. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	29
5. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM)	31
6. Druckexemplar der ausgewählten Publikation	33
7. Lebenslauf	41
8. Komplette Publikationsliste	43
9. Danksagung	44

¹ Diese Dissertation folgt der internen Bekanntmachung des Vorstands am 26.10.2018 zur Geschlechtergerechten Sprache an der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Im Wortlaut von extern abrufbar; Abruf am 21.11.2018 unter: https://frauenbeauftragte.charite.de/metast/meldung/artikel/detail/geschlechtergerechte_sprache_an_der_charite/

1. Abstracts

1.1 Abstract auf Deutsch

Hintergrund Die chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) ist eine seltene Erkrankung des peripheren Nervensystems und kann in die typische CIDP und atypische CIDP-Manifestationen unterteilt werden. Die atypischen Varianten sind unter anderen die distal aquirierte demyelinisierende sensomotorische Neuropathie (DADS), die multifokal aquirierte demyelinisierende sensomotorische Polyneuropathie (MADSAM) sowie die sensible CIDP. Die Abgrenzung dieser Varianten voneinander und von nicht immunvermittelten Polyneuropathien stellt eine klinische Herausforderung dar. T-Zell-Antworten gegen verschiedene myelinspezifische Peptide konnten in CIDP-Patient*innen ebenso nachgewiesen werden wie die Assoziation distinkter klinischer Erscheinungsbilder der CIDP mit spezifischen *Neurofascin*-Autoantikörpern im Blutserum der Patient*innen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend soll in der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft werden, nach der sich die CIDP-Varianten in der spezifischen Immunreaktion gegen verschiedene Epitope des peripheren Nervens unterscheiden.

Gegenstand dieser Studie ist die Untersuchung der Frage, ob die verschiedenen Subtypen der CIDP in ihren Typ1-T-Helfer (TH1) Zellantworten gegen die paranodalen und nodalen Peptide *Neurofascin* (NF155 und NF186) sowie die myelinspezifischen Peptide *myelin protein zero* (P0 180–199) und *myelin basic protein* (MBP 82–100) Spezifikationen zeigen. Weiterhin untersuche ich, ob, assoziiert zu TH1-Reaktionen gegen NF155 und NF186, Autoantikörper gegen diese Epitope vorliegen.

Methoden Eine *interferon-gamma enzyme-linked immunospot* Untersuchung wurde genutzt, um antigenspezifische TH1-Antworten in 48 Patient*innen mit diagnostizierter typischer CIDP (n=18), DADS (n=8), MADSAM (n=9) und sensibler CDP (n=13) im Vergleich zu anderen nicht immunvermittelten Polyneuropathien (ON, n=19) und gesunden Kontrollen (HC, n=9) nachzuweisen. Blutserum dieser Patient*innen wurde mit einem *enzyme-linked immunosorbent assay* auf Autoantikörper gegen NF155 und NF 186 getestet.

Ergebnisse Positive TH1-Antworten gegen zwei oder mehr Antigene waren hoch prädiktiv für die CIDP (positiver prädiktiver Wert = 0,95) und wurden in 77% der

CIDP-Patient*innen gefunden. Verglichen mit den Kontrollen zeigten Patient*innen mit MADSAM und sensibler CIDP die breitesten TH1-Antworten gegen alle vier Antigene. Die Fläche unter der Kurve (AUC) für NF186 war in MADSAM 0,94 [95% Konfidenzintervall (KI) 0,82–1] verglichen mit ON. Für die sensible CIDP war die AUC 0,94 [95% KI 0,86–1] für P0 180–199 und 0,95 [95% KI 0,88–1] für MBP 82–100 im Vergleich zu ON. Autoantikörper gegen NF155 oder NF186 wurden nicht nachgewiesen.

Schlussfolgerung TH1-Antworten gegen die untersuchten paranodalen, nodalen und myelinspezifischen Peptide sind häufig in der CIDP. TH1-Reaktionen gegen NF186 könnten als Immunmarker für MADSAM, TH1-Reaktionen gegen P0 180–199 und MBP 82–100 als Immunmarker für die sensible CIDP dienen. Es bedarf größerer multizentrischer Studien zur Validierung und Etablierung dieser Immunmarker als diagnostische Hilfsmittel.

1.2 Abstract auf Englisch

Background Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) is a rare autoimmune disorder of the peripheral nervous system and can be divided into typical CIDP and atypical CIDP manifestations. Atypical variants are among others distal acquired demyelinating polyneuropathy (DADS), multifocal acquired demyelinating sensory and motor polyneuropathy (MADSAM), and sensory CIDP. Differentiating these variants from one another and from non-immune polyneuropathies remains challenging in clinical neurology. T-cell responses to a range of different myelin-derived epitopes were detected in patients with CIDP. Further, the association of distinct clinical phenotypes of CIDP with specific neurofascin-autoantibodies in patient's blood sera was shown. Based on these findings I hypothesize, that CIDP-variants differ in their specific immunoreaction against different epitopes of the peripheral nervous system.

In order to proof that hypothesis, the objective of this study is to investigate whether different subtypes of CIDP show specifications in their type 1 helper T cell (TH1) responses against paranodal and nodal neurofascin (NF155 and NF186), as well as myelin-specific peptides myelin protein zero (P0 180–199) and myelin basic protein (MBP 82–100). Further, I investigate if in association to TH1-reactions against NF155 and NF186 autoantibodies against these epitopes can be detected.

Methods Interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay was used to detect antigen-specific TH1-responses in 48 patients with diagnosed typical CIDP (n=18), DADS (n=8), MADSAM (n=9), and sensory CIDP (n=13) compared to other non-immune polyneuropathy (ON, n=19) and healthy controls (HC, n=9). Blood sera of these patients were tested for autoantibodies against NF155 and NF 186 with an enzyme-linked immunosorbent assay.

Results Positive TH1-responses against two or more antigens were highly predictive for CIDP (positive predictive value = 0.95) and were found in 77% of CIDP patients. Compared to controls, MADSAM and sensory CIDP patients showed broadest TH1-responses to all four antigens. The area under the receiver operating characteristics curve (AUC) of NF186 in MADSAM was 0.94 [95% confidential interval (CI) 0.82–1] compared to ON. For sensory CIDP, AUC of P0 180–199 was 0.94 [95% CI 0.86–1] and for MBP 82–100 0.95 [95% CI 0.88–1] compared to ON. Autoantibodies against NF155 or NF186 were not detected.

Conclusion TH1-responses to investigated paranodal, nodal and myelin-specific peptides are common in CIDP. TH1-reactions against NF186 may be used as biomarker for MADSAM and TH1-reactions against P0 180–199 and MBP 82–100 as biomarkers for sensory CIDP. Larger multicenter studies are necessary to establish these biomarkers as diagnostic tools.

Beide Versionen des Abstracts folgen modifiziert der folgenden Publikation:

Diederich JM, Staudt M, Meisel C, Hahn K, Meinel E, Meisel A, Klehmet J. Neurofascin and Compact Myelin Antigen-Specific T Cell Response Pattern in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy Subtypes. *Front Neurol.* 2018 Mar 19;9:171.

2. Manteltext

2.1 Einleitung

Die chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) ist zwar die häufigste autoimmunvermittelte Polyneuropathie des peripheren Nervensystems (PNS), jedoch bei einer geschätzten Prävalenz von 0,8 - 8,9 Erkrankungsfällen pro 100.000 Westeuropäer eine sehr seltene Erkrankung. Sie verursacht Demyelinisierungen im PNS und führt bei über 50 Prozent der Patient*innen im Verlauf der Erkrankung zu einer Hilfebedürftigkeit beim Gehen und bei Tätigkeiten des täglichen Lebens. [1]

Klinisch können neben der typischen CIDP weitere Verlaufsformen unterschieden werden. Diese bilden die Gruppe der sogenannten atypischen CIDP, die insgesamt etwa die Hälfte der CIDP-Diagnosen ausmachen. Unter den atypischen CIDP-Formen ist die distal aquirierte demyelinisierende sensomotorische Neuropathie (DADS) die häufigste Erkrankung, unter dieser Form leiden so circa 24-35%. Unter den weiteren atypischen CIDP-Formen wie der multifokal aquirierten demyelinisierenden sensomotorischen Polyneuropathie (MADSAM) leiden 8-15% und unter der sensible CIDP 10-13%. Weitere seltene Varianten sind die rein motorische CIDP mit weniger als 10% der Patient*innen sowie in etwa 2% der Fälle die fokale CIDP. Nicht genauer spezifizierte Erscheinungsformen werden zudem unter dem Terminus „andere CIDP“ zusammengefasst. [2]

Die Pathogenese der verschiedenen Formen dieser Erkrankung ist nicht hinreichend geklärt und ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Unterschiedlich verlaufende Immunreaktionen werden als ursächlich für die verschiedenen Manifestationen dieser Autoimmunkrankheit diskutiert. [3] An dieser Entzündungsreaktion ist sowohl das zelluläre wie auch das humorale Immunsystem beteiligt. Sie richtet sich dabei gegen eine Vielzahl verschiedener Strukturen im PNS. [2-5] Meine Arbeitsgruppe konnte in einer vorangegangenen Studie eine erhöhte Konzentration aktivierter T-Lymphozyten und vor allem aktivierter CD4-positiver Typ1-T-Helferzellen (TH1) im peripheren Blut von CIDP-Patient*innen zeigen. [6] Durch Verwendung einer *interferon-gamma enzyme-linked immunospot* (ELISPOT) Untersuchung konnten die Reaktionen von TH1-Zellen unter anderem als spezifisch gegen die myelinabhängigen Peptide *myelin protein zero 180–199* (P0 180-199) und *myelin basic protein 82–100* (MBP 82–100) gerichtet identifiziert

werden. [7-8] Dabei konnten wir in den TH1-Reaktionen gegen diese Antigene bereits signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen der typischen CIDP und einer Gruppe verschiedener atypischer Varianten der CIDP erkennen [8].

Neben TH1-Reaktionen gegen diese Peptide konnten in anderen Studien Autoantikörper gegen das paranodal exprimierte *Neurofascin 155* (NF155) [9] sowie das nodal exprimierte *Neurofascin 186* (NF186) [10] in Patient*innen mit CIDP identifiziert werden. Diesen Autoantikörpern wird unter anderem eine Störung der saltatorischen Erregungsleitung im Bereich der Ranvier'schen Schnürringe am peripheren Nerven zugeschrieben. [11] Außerdem zeigte sich eine Assoziation von Autoantikörpern des IgG4-Subtyps gegen NF155 mit frühem Krankheitsbeginn, männlichem Geschlecht, schlechtem Ansprechen auf Therapie mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg) und dem Symptom eines Tremors in CIDP-Patient*innen [12-13].

Vor dem Hintergrund dieser Forschungsergebnisse postuliere ich einen Zusammenhang von spezifischen Immunantworten und dem Auftreten der verschiedenen CIDP-Varianten. In dieser Arbeit wird die Hypothese geprüft, ob in Patient*innen mit verschiedenen Varianten der CIDP TH1 spezifische IFN- γ -Antworten gegen NF155, NF186, P0 180–199 und MBP 82–100 in ELISPOT-Untersuchungen nachweisbar sind und ob diese Immunantworten ferner mit einer bestimmten Variante der CIDP assoziiert sind. Sollte diese Hypothese nicht widerlegt werden, kann diese postulierte Assoziation der antigenspezifischen TH1-Reaktionen mit Varianten der CIDP der Entwicklung von Immunmarkern dienen.

In der Literatur wurde der Zusammenhang von anti-NF155-Antikörpern mit distinkten klinischen Erscheinungsbildern der CIDP und schlechtem Therapieansprechen postuliert. [12-13] Es konnte so eine Assoziation von anti-NF155-Antikörpern mit frühem Krankheitsbeginn, männlichem Geschlecht, schlechtem Ansprechen auf die Therapie mit IVIg sowie das Symptom eines Tremors gezeigt werden. Ausgehend von diesem Zusammenhang stelle ich die Hypothese auf, der zufolge auch Patient*innen mit TH1-Reaktionen spezifisch gegen Neurofascin und die myelinspezifischen Antigene distinkte klinische Erscheinungsbilder zeigen. Zur Überprüfung dieser Hypothese bestimme ich den klinischen Phänotyp und den bisherigen Therapieverlauf der Patient*innen und

prüfe diese Daten auf eine Assoziation mit den spezifischen TH1-Reaktionen gegen Neurofascin und die myelinspezifischen Antigene.

Zur genaueren Erforschung des Zusammenhangs von anti-Neurofascin-Antikörpern mit der CIDP untersuche ich ferner die Annahme, nach der eine Assoziation der TH1-Reaktionen spezifisch gegen NF155 und NF186 mit Autoantikörpern gegen diese Peptide vorliegt. Zum Ausschluss einer Falsifikation dieser angenommenen Assoziation bestimme ich mittels eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) die Konzentration von Autoantikörpern gegen NF155 und NF186 im Blutserum der CIDP-Patient*innen und der Patient*innen mit nicht immunvermittelter Polyneuropathie und vergleiche diese mit den ebenfalls bestimmten NF155 und NF186 spezifischen TH1-Reaktionen.

2.2 Methodik

Die hier dargestellte Methodik meiner Forschungsarbeit vertieft die in meiner Publikation [14] dargestellten Methoden. Wenn nicht anderes benannt, so wurden alle beschriebenen Experimente, Untersuchungen und Analysen von mir durchgeführt.

2.2.1 Patient*innen

Nach erfolgter Genehmigung der Studie unter der Antragsnummer EA1/025/11 durch die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin begann die Rekrutierung geeigneter Patient*innen an der Hochschulambulanz der Klinik für Neurologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Alle Studienteilnehmer*innen gaben nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung über Art, Umfang, Inhalt und Risiken der Studie durch die betreuende Studienärztin ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Im Anschluss erfolgte die Pseudonymisierung der Studienteilnehmer*innen.

In diese Studie konnten insgesamt 48 Patient*innen mit typischer CIDP (n = 18), DADS (n = 8), MADSAM (n = 9) und sensibler CIDP (n = 13) eingeschlossen werden. Die Diagnose wurde auf Grundlage der Kriterien der Europäischen Föderation der Neurologischen Gesellschaften und der Peripherer Nerv Gesellschaft (EFNS/PNS) gestellt. [15] Die Einschätzung des klinischen Zustands der Patient*innen wurde durch Verwendung des *Medical Research Council Sum*

Scores (MRC), der auf der Bestimmung und Summierung der vorhandenen Kraft an acht Muskelgruppen der Extremitäten beruht, [16] sowie des sogenannten *Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT) disability score* objektiviert [17]. Zur Klassifikation des Aktivitätsgrades der Erkrankung wurde der CIDP Erkrankungsaktivitätsstatus (CDAS) ermittelt, der in die Stadien „instabil aktiv“, „verbessernd“, „stabil aktiv“, „in Remission“ sowie „geheilt“ unterteilt wird. [18] Zur Auswertung wurde der „instabil aktive“ und der „verbessernde Status“ als „instabile Stufe“ sowie der „stabil aktive Status“ und der „Status der Remission“ als „stabile Stufe“ der Erkrankung gewertet. Niemand der in die Studie eingeschlossenen Patient*innen wurde als „geheilt“ eingestuft. Die klinische Phänotypisierung der Patient*innen erfolgte anhand der Auswertung der Fallgeschichten sowie der Datenbank der CIDP-Sprechstunde der neurologischen Poliklinik der Charité – Universitätsmedizin Hochschulambulanz. Die in die Studie eingeschlossenen Patient*innen standen zur Zeit der Studie und in den sechs Monaten vor Eintritt in die Studie nicht unter immunsuppressiver Therapie mit den Wirkstoffen Azathioprin, Cyclosporin A, Methotrexat oder einem Glucocorticoid. Ein Therapieerfolg unter Gabe von IVIg wurde als Verbesserung um zwei oder mehr Punkte im MRC-Summenscore in zwei unterschiedlichen Muskelgruppen, als Verbesserung um einen oder mehr Punkte im INCAT oder eine Verbesserung der eingangs angegebenen Gehstrecke um mindestens 50% definiert [6,19].

Als Kontrollen wurden neun gesunde Proband*innen (engl. *healthy control* = HC) sowie 19 Patient*innen mit einer bestehenden Polyneuropathie anderer, nicht immunologischer Genese (engl. *other polyneuropathy* = ON) in die Studie eingeschlossen. Diese waren im Einzelnen an einer idiopathischen axonalen Polyneuropathie (n = 13), einer diabetischen Polyneuropathie (n = 2), einer metabolischen oder toxischen Polyneuropathie (n = 1), einer hereditären Polyneuropathie (n = 1), einer Motoneuronenerkrankung (n = 1) oder einer ATTR Amyloidose assoziierten Neuropathie (n = 1) erkrankt.

2.2.2 Blutproben

Für die ELISPOT-Untersuchung wurden für die Gewinnung der Blutproben CPT Röhrchen (BD Vacutainer; Becton, Dickinson and Company; Franklin Lakes, NJ, USA) genutzt. Bei Patient*innen, die unter Therapie mit IVIg standen, wurde das Blut am ersten Tag des Therapiezyklus unmittelbar vor Gabe der ersten Infusion

abgenommen. Die mononukleären Zellen des peripheren Bluts (engl. *peripheral blood mononuclear cells* = PBMC) wurden innerhalb von drei Stunden mittels Differentialzentrifugation isoliert und in CTL-Test-Medium (CTL Europe GmbH, Bonn, Deutschland) auf eine Konzentration von 6×10^6 Zellen pro Milliliter eingestellt.

Für die ELISA-Untersuchung wurden Unterdrucksammelgefäße für Serum (BD Vacutainer; Becton, Dickinson and Company) genutzt. Das Serum wurde mittels Differentialzentrifugation separiert und bei -82°C bis zur Untersuchung aufbewahrt.

2.2.3 Antigene

Rekombinant hergestelltes Neurofascin (NF155 und NF186) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Meinl (Institut für klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt und bereits von ihm in der Vergangenheit beschrieben. [9] Die verwendeten Peptide P0 180–199 und MBP 82–100 wurden von Herrn Prof. Dr. R. Volkmer (Institut für Medizinische Immunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) hergestellt und von uns in der Vergangenheit genutzt und beschrieben. [8] Das als Kontrolle zur T-Zellstimulation verwendete CEF, ein Peptidpool von 23 MHC Klasse I Peptiden viraler Abkunft, [20] stammt von JPT (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin).

2.2.4 ELISPOT

Für die ELISPOT-Untersuchung habe ich das aus Vorstudien meiner Arbeitsgruppe etabliertes Protokoll genutzt. [6,8] Dazu wurden Mikrofilterplatten mit 96 kleinen Schächten, den sogenannten *Wells*, (Millipore, Billerica, MA, USA) mit einem IFN- γ -spezifischen Antikörper (eBioscience, San Diego, CA, USA) in der Konzentration $4\mu\text{g/ml}$ in steriler phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline* = PBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Am ersten Tag der Untersuchung wurden die Platten dreifach mit steriler PBS gespült, sodann für ein bis maximal zwei Stunden mit einprozentigem bovinen Serumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in steriler PBS geblockt. Hiernach erfolgte das Dekantieren und Ausklopfen dieser Lösung, bevor pro Schacht etwa 6×10^5 PBMC in einem Ansatz aus CTL-Test-Medium (CTL Europe GmbH) und auf $2\mu\text{g/ml}$ konzentrierte anti-CD28 Antikörpern (eBioscience),

die zur Verstärkung der INF- γ -Antwort durch ein zusätzlich stimulierendes Signal dienen, [21] ausgesät wurden. Die Peptide NF155, NF186, P0 180–199 und MBP 82–100 wurden entsprechend einer Zielkonzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ jeweils in Triplikaten hinzugefügt. Um spontane INF- γ -Sekretion zu erkennen, wurde jener beschriebene Ansatz aus CTL-Test-Medium und CD28-Antikörpern in der Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ ohne hinzugefügtes Antigen ebenfalls in Triplikaten als Negativkontrolle verwendet. CEF in einer Konzentration von 10 $\mu\text{l/ml}$ in selbigem Ansatz diente zum Nachweis von aktivierten T-Zellen und damit als Positivkontrolle. Die so jeweils mit Triplikaten präparierten Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert.

Am Folgetag erfolgte das Dekantieren der inkubierten Ansätze sowie eine dreifache Spülung aller Schächte zunächst mit PBS sowie ebenfalls dreifach mit einer 0,5% Lösung des Tensids Polysorbat 20 (Tween20; Sigma-Aldrich) in PBS (PBS-T). Anschließend wurde der zur Detektion notwendige murine anti-human INF- γ Biotin Antikörper (eBioscience) in der Konzentration von 2 $\mu\text{l/ml}$ aufgebracht und die Platten für 16 bis 24 Stunden bei 4°C gelagert. Hierauf erfolgte eine erneute vierfache Spülung der Schächte mit PBS-T sowie die Konjugation der Antikörperkomplexe mittels Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (BioLegend, San Diego, CA, USA) in der Verdünnung von 1:1.000. Nach zweistündiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur in dunkler Umgebung, dreifacher Reinigung der Schächte mit PBS-T sowie drei weiteren Reinigungsschritten mittels PBS, wurde die 3-amino-9-ethyl-Carbazol-Entwicklungslösung (Sigma-Aldrich) in die Schächte eingebracht und die resultierende Färbungsreaktion für maximal fünf Minuten unter visueller Kontrolle durch Spülen der gesamten Platte mittels vollentsalztem Wasser gestoppt.

Die resultierenden Punkte wurden mittels eines ELISPOT-Lesegeräts (Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Deutschland) und dazugehöriger iSpot 04 Software (Autoimmun Diagnostika GmbH) gemessen, gezählt und analysiert, sodass pro Schacht eine Zahl an sogenannten Punkt formenden Einheiten (engl. *spot forming units* = SFU) ermittelt wurde. Diese SFU wurden für jedes der Triplikate gemittelt, von den jeweiligen durchschnittlichen SFU der spontanen INF- γ -Sekretion subtrahiert und für eine Anzahl von 10^6 Zellen kalkuliert.

2.2.5 ELISA

Das Protokoll für den hier durchgeführte ELISA sowie der benötigte monoklonale A4/3.4 IgM Antikörper aus der Maus [9] wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Meinel (Institut für klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Ein zur Validierung des Testverfahrens verwendetes Serum eines Patienten mit Antikörpern gegen NF155 [9, 22] wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Prüß (Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) bereitgestellt.

Zur Vorbereitung der verwendeten Flachbodenplatten mit 96 kleinen Schächten (MaxiSorp; Thermo Fisher Scientific) wurden diese zunächst mit protease- und fettsäurefreiem bovines Serumalbumin der Fraktion V (BSA-V; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), NF155 und NF186, jeweils mit einer Konzentration von 5µg/ml in einem zuvor angesetztem 0,1M Natrium-Bicarbonat-Puffer gelöst, beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Darauf wurde die Pufferlösung dekantiert und alle Schächte dreifach mit einem 0,05% Ansatz des Tensids Polysorbat 20 in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-T) gespült. Eine Blockierungspufferlösung von 3% BSA-V in PBS-T (3%BSA-V-PBS-T) wurde angesetzt und die Platten damit für zwei Stunden bei 37°C und 5% Kohlendioxid inkubiert, gefolgt von einem abermaligen Dekantieren und dreifachem Spülen der Schächte mit PBS-T. Hierauf erfolgte das Einbringen einer Positivkontrolle zur Überprüfung der Antigenbindung am Boden der Schächte, die aus dem monoklonalen A4/3.4 IgM Antikörper der Maus in einer Konzentration von 0,2 µg/ml in 3%BSA-V-PBS-T bestand. Außerdem wurden in Duplikaten eine Negativkontrolle aus 3%BSA-V-PBS-T sowie die für die Antikörperbestimmung benötigten 1:100 in 3%BSA-V-PBS-T verdünnten Sera der Patient*innen, ebenfalls in Duplikaten, in die Schächte eingebracht. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 5% Kohlendioxid, erforderlichem Dekantieren und sechsfachem Spülen mit PBS-T erfolgte die Pipettierung der sekundären Antikörper. Für die Positivkontrolle war das der µ-Ketten spezifische Peroxidase konjugierte AffiniPure Ziege anti-Maus IgM Antikörper (Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA, USA), für die Negativkontrolle sowie die Patient*innensera der Peroxidase konjugierte AffiniPure Ziege anti-human IgA + IgG + IgM (H+L) Antikörper (Jackson ImmunoResearch Inc.), beide wurden 1:7000 in 3%BSA-V-PBS-T verdünnt verwendet. Der folgenden Inkubation bei 37°C und 5% Kohlendioxid für 45 Minuten

schloss sich das Dekantieren der Ansätze und ein sechsfaches Spülen der Schächte mit PBS-T an. Der abschließende Entwicklungsschritt mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich) wurde bei erfolgtem Farbumschlag nach sechsdreiviertel Minuten durch das hinzu Pipettieren einer einmolaren Schwefelsäure gestoppt.

Die Auslesung der Farblösung erfolgte bei 450nm Wellenlänge monochromatischem Lichts mittels eines ELISA-Lesegeräts (SpectraMax 340PC 384; Molecular Devices, San Jose, CA, USA) und dazugehöriger SpectraMax Pro Software (Molecular Devices). Im Anschluss daran wurden die gemessenen Extinktionswerte der Duplikate von 3%BSA-V-PBS-T, NF155 und NF186 gemittelt und die letztendlichen Werte für anti-NF155- und anti-NF186-Antikörper jeweils durch Subtraktion der Hintergrundextinktion von 3%BSA-V-PBS-T errechnet. Diese so hintergrundbereinigten Extinktionen (ΔE) dienten als Grundlage für die statistische Auswertung.

Die Sera, die in einer solchen Extinktionsmessung Antikörper gegen NF155 oder NF186 im Umfang von mindestens vierfacher Standardabweichung vom Mittelwert aufwiesen, wurden einem zweiten ELISA unterzogen, der das Ziel verfolgte, die gemessenen Antikörper als spezifisch gegen NF155 oder NF186 zu identifizieren. Bei diesem ELISA wurde die Messung wie beschrieben (s.o.) mit den gleichen Seren wiederholt. In einer zweiten, simultan durchgeführten, Messung wurde eine einzige Abweichung ins Protokoll eingefügt. Diese sah vor, die Seren mit 20-fachem NF155- bzw. NF186-Antigenüberschuss vor Einbringen in die Schächte der Platten für zwei Stunden bei 37°C und 5% Kohlendioxid vorzueinkubieren. Nach der Durchführung eines solchen sogenannten Wettbewerbs-ELISA (engl. *Competition-ELISA*) wurden all diejenigen Seren als positiv für spezifische anti-NF155- bzw. anti-NF186-Antikörper eingestuft, bei denen die Antikörper-konzentration aus dem Bereich jenseits der vierfachen Standardabweichung vom Mittelwert in den Bereich um den Mittelwert aller durchgeführten Messungen mit nicht vorinkubierten Seren abfiel.

2.2.6 Statistik

Der Vergleich der Charakteristika der Patient*innengruppen nach Alter, Zeitraum seit Diagnose, MRC und INCAT, wie auch der antigenspezifischen IFN- γ -Antworten erfolgte mittels einem Kruskal-Wallis-Test gefolgt von einem Dunn's-multiple-

comparison-Test oder einem Mann-Whitney-U-Test. Nichtmetrische Parameter wie Geschlecht, Ansprechen auf IVIg-Therapie, CDAS, Tremor, sensorische Ataxie, neuropathischer Schmerz, asymmetrische Paresen, proximale Paresen, Fußheberschwäche, positiver Liquorbefund im Sinne einer zytoalbuminären Dissoziation mit normaler oder nur gering erhöhter Zellzahl ($<10/\mu\text{l}$) bei erhöhtem Eiweiß, distal motorische Latenz, F-Wellen-Latenz, Nervenleitgeschwindigkeit, sowie Leitungsblock wurden mit dem Exakten Test nach Fischer verglichen. Die zuletzt genannten elektrophysiologischen Befunde wurden dazu nach den Diagnosekriterien der EFNS/PNS gestellt. [15] Um eine Korrelation der IFN- γ -Antworten spezifisch auf P0 180–199 mit MBP 82–100 auszudrücken, wurde der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient bestimmt.

Um die Möglichkeit der Nutzung eines ELISPOT-Ergebnisses als Immunmarker darzustellen, wurden weitere post hoc Analysen durchgeführt. So wurden für die antigenspezifischen Reaktionen Grenzwerte bestimmt, ab denen die Antigenreaktionen als „positiv“ gewertet wurden. Hierfür wurde die Fläche unter der Kurve (engl. *area under the curve* = AUC) im 95% Konfidenzintervall (KI) der Grenzwertoptimierungskurve (engl. *receiver-operating-characteristics-curve* = ROC-curve) bestimmt. Dazu wurde bei jedem der untersuchten Antigene jeweils die CIDP-Variante mit den ausgeprägtesten antigenspezifischen Reaktionen mit ON verglichen. Eine mögliche Differenzierung einer Variante der CIDP von ON anhand der TH1-Antwort wurde dann einer antigenspezifischen TH1-Antwort zugestanden, wenn die AUC $> 0,7$ und dabei die 0,5 nicht Teil des 95% KI war. Die SFU ab der diese Bedingungen erfüllt waren, wurde als Grenzwert gesetzt. Dieser auf der Auswertung einer CIDP-Variante im Vergleich zu ON basierende Grenzwert wurde dann auch für die anderen CIDP-Varianten für das jeweilige Antigen übernommen. Alle bis hierher genannten statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism Version 6.0 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) und allesamt von mir durchgeführt. Dabei wurde keine Adaptierung für multiple Tests vorgenommen und ein p -Wert von $< 0,05$ als signifikant angenommen.

Ferner wurde mit Mitteln der multinominalen logistischen Regression [23] eine Kombination vielversprechender antigenspezifischer IFN- γ -Antworten in einer Subgruppe der CIDP im Vergleich zu ON berechnet. Hierdurch wurde untersucht, ob mit einer Kombination von Immunmarkern eine deutlichere Abgrenzung einer Variante der CIDP von ON möglich ist, als mithilfe eines einzelnen Immunmarkers.

Hierfür wurde die Stata Statistical Software: Release 13. (StataCorp LLC, College Station, TX, USA) genutzt. Diese mathematische Analyse wurde von Frau Dr. U. Grittner (Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Charakteristik der Patient*innengruppen

Die Charakteristika der verschiedenen Patient*innengruppen sind in *Tabelle 1* dargestellt. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind teils deutlich, statistisch jedoch in der Regel nicht signifikant. Die weitere statistische Analyse der erhobenen Parameter konnte einzig einen erhöhten Anteil an männlichen Patienten (a: $p = 0,0117$; Exakter Test nach Fischer) sowie höhere MRC-Summen-Scores (b: $p = 0,0007$; Kruskal-Wallis-Test) in der Patient*innengruppen der sensiblen CIDP im Vergleich zu den anderen Patient*innen und Kontrollen zeigen.

	DADS	MADSAM	sensible CIDP	typische CIDP	ON	HC
männliches Geschlecht, n (%)	7/8 (88)	6/9 (67)	12/13 (92) ^a	8/18 (44)	9/19 (47)	4/9 (44)
weibliches Geschlecht, n (%)	1/8 (12)	3/9 (33)	1/13 (8)	10/18 (56)	10/19 (53)	5/9 (56)
Alter, Mittelwert (Spannweite)	70,25 (49-81)	61,78 (53-76)	56,15 (36-82)	63,78 (27-80)	68,5 (47-82)	67,33 (53-83)
Jahre seit Diagnose, Median (Spannweite)	6,5 (1-10)	2 (0-10)	3 (1-16)	5 (0-23)	3 (0-14)	-
IVIg-Therapie, n (%)	5/8 (63)	8/9 (89)	7/12 (58)	15/18 (83)	0/19	0/9
MRC, Mittelwert (Spannweite)	69,13 (63-77)	72,89 (70-78)	77,08 (74-80) ^b	70,44 (45-80)	-	-
INCAT, Median (Spannweite)	2,5 (1-5)	4 (1-6)	3 (2-3)	3,5 (0-7)	-	-
instabile Erkrankung, n (%)	5/8 (63)	5/9 (56)	5/13 (38)	10/18 (56)	-	-
stabile Erkrankung, n (%)	3/8 (37)	4/9 (44)	8/13 (62)	8/18 (44)	-	-

*Tabelle 1: Übersicht der Charakteristika von Patient*innen und Kontrollen.*

2.3.2 Spezifische TH1-Antworten gegen Neurofascin und myelinspezifische Antigene sind mit verschiedenen Varianten der CIDP assoziiert

Neben der folgenden Übersicht sind die Ergebnisse der ELISPOT-Untersuchungen ausführlich in der dieser Dissertation zugrundeliegenden Publikation [14] dargestellt.

In den ELISPOT-Untersuchungen ließen sich für alle Subtypen der CIDP im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant erhöhte antigenspezifische TH1-Reaktionen nachweisen. Die verschiedenen Subtypen zeigten zudem Unterschiede in der Spezifikation dieser Reaktionen. Die sensorische CIDP zeigte eine deutliche Spezifikation gegen die beiden myelinaspezifischen Peptide P0 180–199 und MBP 82–100. So waren die Reaktionen in der Gruppe der sensorischen CIDP gegen diese beiden Antigene deutlicher als gegen andere Antigene. Zudem war die sensorische CIDP diejenige Gruppe, die unter allen Gruppen in den spezifischen TH1-Reaktionen die deutlichste Assoziation mit diesen beiden Antigenen zeigte. Analog reagierte die Gruppe der MADSAM am deutlichsten und dabei deutlicher als andere Subtypen auf NF186. Keine Spezifikation gegen ein bestimmtes Antigen ließ sich in den TH1-Reaktionen der Gruppe der typischen CIDP zeigen. Vielmehr waren signifikant erhöhte TH1-Reaktionen gegen alle untersuchten Antigene zu erkennen. In der Gruppe der DADS waren die antigenspezifischen TH1-Reaktionen gering ausgeprägt und nur gegen P0 180–199 sowie MBP 82–100 im Vergleich zu HC leicht erhöht, es ließ sich für die DADS so keine Spezifikation darstellen. [14, S. 3f.] Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden die in den Methoden dargestellten post hoc Analysen zur Bestimmung von Grenzwerten durchgeführt und so die Möglichkeit der Nutzung eines ELISPOT-Ergebnisses als Immunmarker dargestellt. Die Grenzwerte wurden für alle untersuchten Grenzwerte jeweils bei der SFU von fünf bestimmt, die hierfür grundlegenden Analysen sind in *Figure 1* und *Figure 2* meiner Publikation [14, S. 3f.] ausführlich dargestellt. 77 Prozent aller CIDP-Patient*innen zeigten dabei eine SFU größer fünf bei zwei oder mehr der untersuchten Antigene. Analog zeigten nur elf Prozent der ON-Patient*innen mindestens zwei positive Immunmarker. Somit waren mindestens zwei positive Immunmarker hoch prädiktiv für die Diagnose einer Variante der CIDP, der positive prädiktive Wert (engl. *positive predictive value* = PPV) lag hierfür bei 0,95.

Darüber erwiesen positive Reaktionen auf die Immunmarker P0 180–199 sowie MBP 82–100 eine gute Abgrenzbarkeit der sensorischen CIDP von ON sowie eine

positive Reaktion auf NF186 eine gute Abgrenzbarkeit der MADSAM von ON. Patient*innen mit sensibler CIDP zeigten besonders häufig positive Reaktionen auf die Antigene P0 180–199 und MBP 82–100, mit diesen positiven Immunmarkern war eine Differenzierung von der Diagnose der ON möglich. So sprachen Reaktionen auf beide myelinspezifischen Antigene mit einem PPV von 0,85 für die Diagnose der sensiblen CIDP im Vergleich zu ON. Blieben im Vergleich der sensiblen CIDP mit ON die Reaktionen gegen beide Immunmarker aus, so sprach dies mit einem negativ prädiktiven Wert (engl. *negative predictive value* = NPV) von 0,89 für die Differentialdiagnose ON. Positive Reaktionen gegen NF186 traten besonders häufig in der Gruppe der MADSAM auf, jedoch nicht in der Gruppe der ON. Im Vergleich dieser beiden Diagnosen sprach eine positive Reaktion auf den Immunmarker NF186 mit einem PPV von 1 für MADSAM, das Ausbleiben einer positiven Reaktion mit einem NPV von 0,86 für ON.

Die Analyse der klinischen Phänotypisierungen ergab einzelne Auffälligkeiten der untersuchten Merkmale, jedoch keine Assoziation eines distinkten klinischen Erscheinungsbildes mit positiven antigenspezifischen TH1-Reaktionen. Patient*innen mit limitierter Immunreaktion im Sinne positiver TH1-Reaktionen gegen maximal ein Antigen wiesen, im Vergleich zu Patient*innen mit einer Immunreaktion gegen zwei und mehr der Antigene, eine Reihe gemeinsamer Merkmale auf. So waren in dieser Gruppe mehr Frauen vertreten, außerdem war das Durchschnittsalter höher. Der examinierte MRC war niedriger, der INCAT höher, ferner waren diese Patient*innen häufiger von proximalen Paresen und neuropathischen Schmerzsyndromen betroffen. Elektrophysiologisch ließ sich seltener eine verlängerte F-Wellen-Latenz darstellen. [14; S.4ff.]

2.3.3 Keine humorale Reaktion gegen Neurofascin-Epitope in CIDP-Patient*innen und Kontrollen nachweisbar

Insgesamt wurden 48 Blutseren von CIDP-Patient*innen und 19 Seren von ON-Patient*innen einem ersten sogenannten *Screening*-ELISA unterzogen. Zum Vergleich und zur Bestätigung der korrekten Funktionsweise des ELISA wurde ein als für anti-NF155-Antikörper positives vorbeschriebenes Patientenserum mitgetestet [9, 22]. Diese Untersuchungen zeigten das in der *Abbildung 1* dargestellte Ergebnis.

Der Mittelwert aller gemessenen hintergrundbereinigten Extinktionen (ΔE) für anti-NF155-Antikörper lag bei $\Delta E = 0,09$; die Standardabweichung bei $\Delta E = 0,32$. Demnach wurde der Grenzwert für eine ELISA, die positiv für anti-NF155-Antikörper nach der beschriebenen methodischen Vorgabe bei der vierfachen Standardabweichung vom Mittelwert definiert war, auf $\Delta E = 1,37$ gesetzt. Diesen überschritt nur das anti-NF155-Antikörper positive Vergleichsserum. Drei weitere Serumproben lagen im Bereich zwischen der einfachen und der vierten Standardabweichung vom Mittelwert. All diese Seren stammten von weiblichen Patientinnen der Gruppe mit typischer CIDP.

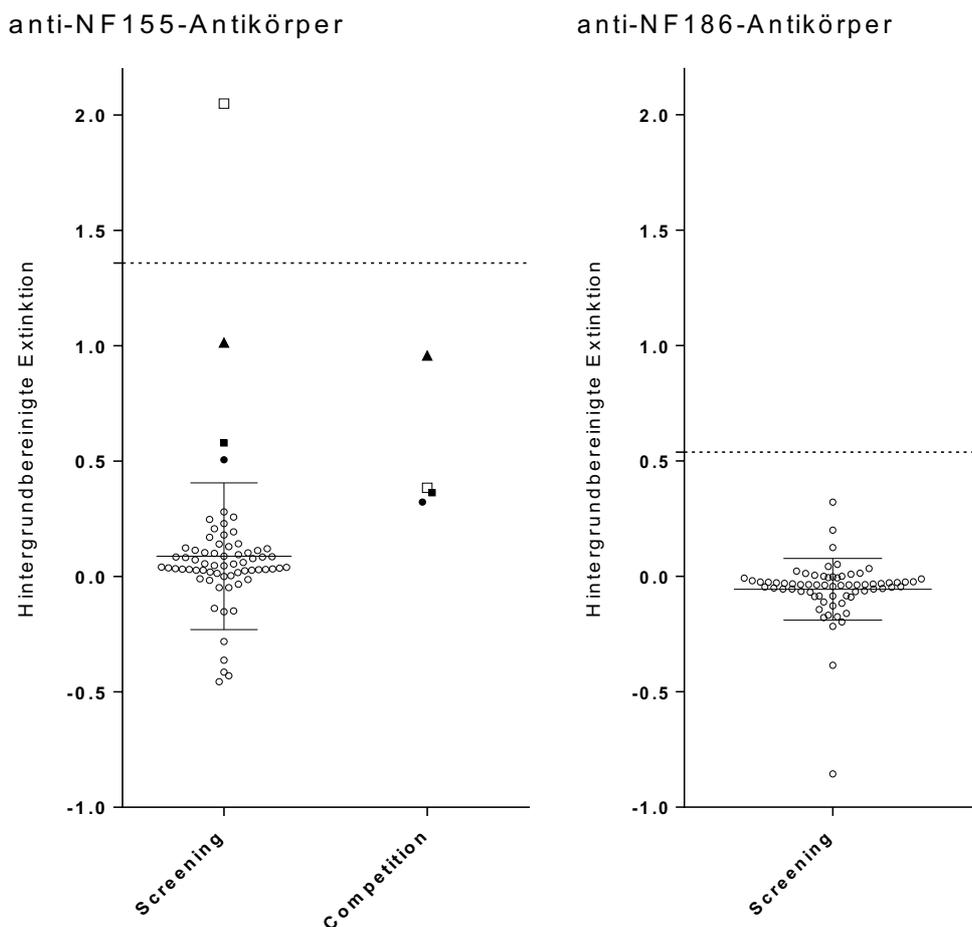


Abbildung 1: Aktuell keine Reaktion des humoralen Immunsystems nachweisbar. Nur im positiven Vergleichsserum sind anti-NF155-Antikörper messbar. Darstellung der gemessenen Extinktionen für den jeweiligen Autoantikörper abzüglich der Hintergrundaktivität von BSA-V (ΔE) unter Angabe des Mittelwerts und des Bereichs der einfachen Standardabweichung. Die gestrichelte Linie stellt die vierfache Standardabweichung vom Mittelwert dar, ab der eine ermittelte Extinktion als positiv für Autoantikörper gewertet wurde (anti-NF155 $\Delta E = 1,37$; anti-NF186 $\Delta E = 0,55$). In der Darstellung der anti-NF155-ELISA Ergebnisse sind die Proben der drei beschriebenen Patientinnen mit typischer CIDP (●■▲) sowie das als anti-NF155-Antikörper positiv beschriebene Vergleichsserum (□) [9, 22] markiert.

Diese vier Seren wurden zur Bestätigung der Spezifität gegen NF155 einem zweiten Wettbewerbs-ELISA (engl. *Competition-ELISA*) unterzogen. In diesem konnten die Ergebnisse des Screening-ELISA unter den nicht vorinkubierten Serumproben reproduziert werden. Im eigentlichen Wettbewerbs-ELISA der vorinkubierten Seren zeigte jedoch nur das Vergleichsserum mit vorbeschrieben NF155-Antikörpern den methodisch geforderten Abfall der Extinktion in den Bereich der einfachen Standardabweichung. Durch meine Messungen konnten so die Antikörper gegen NF155 im als für anti-NF155-Antikörper positiv beschriebenen Serum bestätigt werden. Jedoch konnte ich für keines der Seren von CIDP- oder ON-Patient*innen das Vorhandensein solcher NF155 spezifischer Antikörper nachweisen.

Bei dem Screening-ELISA für anti-NF186-Antikörper ergab sich ein Mittelwert der Extinktion von $\Delta E = -0,05$; bei einer Streuung von $\Delta E = 0,32$ bis $\Delta E = -0,87$. Bei einer Standardabweichung von $\Delta E = 0,15$ ergab sich der Grenzwert von $\Delta E 0,55$ der vierten Standardabweichung über dem Mittelwert. Keins der untersuchten Seren erreichte den Grenzwert und von einem Wettbewerbs-ELISA wurde daher abgesehen. Alle 48 CIDP-Patient*innensera, die 19 Sera von ON-Patient*innen sowie das ebenfalls getestete Vergleichsserum [9, 22] wurden als negativ für Antikörper gegen NF186 eingestuft.

2.4 Diskussion

In diese Studie konnte ich im Anbetracht der großen Seltenheit der untersuchten Erkrankungen ein relativ großes Patient*innenkollektiv von insgesamt 48 Patient*innen mit typischer CIDP sowie atypischen Verlaufsformen der CIDP einschließen. Wie in meiner Publikation [14] dargestellt, konnten in den durchgeführten ELISPOT-Untersuchungen spezifische IFN- γ -Antworten von TH1-Zellen gegen das paranodale NF155, das nodale NF186 sowie gegen die myelinspezifischen Antigene P0 180–199 und MBP 82–100 nachgewiesen werden. Diese waren in den Gruppen der CIDP-Varianten signifikant höher als in der Gruppe der ON. Als positiv gewertete IFN- γ -Antworten gegen mindestens zwei Antigene waren prädiktiv für die CIDP bzw. ihre Varianten in Abgrenzung zu ON. Durch Analysen der Grenzwertoptimierungskurven ließen sich in den TH1-Reaktionen gegen NF186 ein möglicher Immunmarker für die Diagnose der MADSAM-

Erkrankung erkennen und in den TH1-Reaktionen gegen P0 180–199 sowie MBP 82–100 mögliche Immunmarker für die Diagnose der sensiblen CIDP.

Die bestehende Schwierigkeit der korrekten Diagnosestellung einer CIDP wurde zuletzt durch eine retrospektive Studie in den USA aufgezeigt. [24] Im Rahmen einer erneuten Evaluation von 58 Patient*innen mit diagnostizierter CIDP ist dabei ein Anteil von 47 Prozent aufgefallen, der die Voraussetzungen für eine CIDP-Diagnose nicht erfüllte. Laut dieser Studie wären 27 Patient*innen vielmehr anders als mit einer Form der CIDP zu diagnostizieren gewesen, obwohl zwölf dieser Patient*innen die klinischen Kriterien der EFNS/PNS [15] für eine atypische CIDP erfüllten und vier weitere die elektrophysiologischen Kriterien der EFNS/PNS [15]. Diese Ergebnisse zeigen an, wie wichtig die Etablierung von verlässlichen Immunmarkern gerade in der Diagnostik der atypischen CIDP-Varianten ist. Meine Ergebnisse zeigen nun mögliche Immunmarker gerade für die atypischen CIDP-Varianten MADSAM und sensible CIDP auf. Ihre Etablierung wie die anderer Immunmarker würde zudem die vor allem auf neurophysiologischen Kriterien [15] fußende Diagnose der CIDP weiter absichern.

In meinen ELISA-Versuchen ließen sich die spezifischen Antikörper gegen NF155 aus dem mir zur Verfügung gestellten und vorbeschrieben positiven Patientenserum [9, 22] erneut nachweisen. Aufgrund dieser Reproduzierbarkeit des Ergebnisses kann zunächst von einem fehlerfreien Ablauf der durchgeführten Untersuchungen ausgegangen werden. Dennoch konnten keine Antikörper gegen Neurofascin in dem von mir untersuchten Patient*innenkollektiven nachgewiesen werden, weshalb von ihrer Abwesenheit in einem relevanten Umfang im Serum der Patient*innen zum Zeitpunkt der Untersuchung auszugehen ist. Es lässt sich jedoch nicht sagen, ob die Patient*innen zu einem früheren Zeitpunkt der Erkrankung diese Autoantikörper gebildet haben und diese nun in zu geringer Quantität im Serum vorlagen, um mit dem von mir durchgeführten ELISA detektiert zu werden.

Die Abwesenheit von Neurofascin-Autoantikörpern mag im Lichte der Vorpublikationen auf den ersten Blick überraschen. Jedoch lag dort die Häufigkeit von Autoantikörpern im Serum von Patient*innen mit CIDP bei lediglich 2,6% (3 von 117) [9], 6,6% (4 von 61) [12] und 7,1% (38 von 533) [13]. Zudem waren in meiner Untersuchungsgruppe von lediglich 48 Patient*innen nur zwei Männer im Alter unter 45 Jahren vertreten und damit die Patientengruppe von jungen Männern, in der NF155-Autoantikörper gehäuft beschrieben wurden, praktisch nicht repräsentiert.

Bei dieser genaueren Betrachtung liegt der nicht vorhandene Nachweis von Autoantikörpern gegen NF155 unter den hier untersuchten Patient*innen so nicht in einem Bereich, der die Ablehnung der wissenschaftlichen Hypothese einer Assoziation von NF155-Autoantikörpern mit der Erkrankung der CIDP nahelegen würde.

Einen ähnlichen Schluss lässt die Betrachtung meines Ergebnisses des fehlenden Nachweises von Autoantikörpern gegen NF186 zu. So wurden diese in der Vergangenheit zwar beschrieben, allerdings wurden bei der Blutuntersuchung unter 50 CIDP-Patient*innen nur in zweien IgG-Antikörper gegen NF186 nachgewiesen, sowie in vier weiteren anti-NF186-Antikörper anderer Subklassen. [10] In einer späteren Studie waren keine anti-NF186-Antikörper unter 117 CIDP-Patient*innen nachweisbar. [9] So sprechen meine Ergebnisse nun auch gegen einen Zusammenhang der CIDP mit anti-NF186-Antikörpern. Hierbei ist als Schwachpunkt meiner Studie die relativ kleine Anzahl an untersuchten Sera zu nennen, die nicht hinreichend groß ist, um ein seltenes Merkmal sicher ausschließen oder nachweisen zu können. Zudem habe ich für die Untersuchungen auf die gleiche Methode zurückgegriffen wie meine geschätzten Kolleg*innen der LMU München [9], die ebenfalls keine anti-NF186-Antikörper nachweisen konnten, und so bleibt auch ein möglicher Fehler in dieser Methode diskutierbar. Die Hypothese einer Assoziation der CIDP mit anti-NF186-Antikörpern bedarf weiterer Untersuchungen um suffizient bewertet werden zu können.

Die von mir durchgeführte Studie hat – neben den in meiner Publikation [14] dargestellten – einige Limitationen. So war sie mit 48 eingeschlossenen Patient*innen dieser seltenen Erkrankung zwar vergleichsweise groß, jedoch hinsichtlich der Patient*innenzahl zu klein, um Grenzwerte der Immunmarker zu validieren. Zudem bildeten die Patient*innen ein sehr heterogenes Kollektiv. So ergaben sich gerade in Hinblick auf Alter der Patient*innen, Dauer der Erkrankung seit Diagnosestellung sowie Art und Dauer der Therapie deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten. In der Gruppe der sensiblen CIDP konnten beispielsweise vornehmlich im Verhältnis jüngere Männer eingeschlossen werden, die zudem vergleichsweise frisch diagnostiziert waren. Dies könnte zu einer Verzerrung in der Auswertung der klinischen Charakteristika nach antigenspezifischer Reaktion in meiner Publikation [14, S. 4ff.] geführt haben. In dieser zeigten sich unter den Patient*innen mit positiver Reaktion gegen P0 180–

199 und MBP 82–100 ein erhöhter Anteil jüngerer Männer sowie ein kürzerer Zeitraum seit Diagnose. Dieser Umstand ist auch auf die hohe Zahl an Patient*innen mit sensibler CIDP in dieser Gruppe zurückzuführen. Diese Argumentation kann durch die Beobachtung eines hohen Anteils von Patient*innen mit besser erhaltener Muskelkraft und weniger proximalen Paresen in dieser Gruppe untermauert werden. Diese Symptome sind unter Patient*innen mit sensibler CIDP gleichfalls selten. Eine weitere Einschränkung gerade im Hinblick auf eine Verwertbarkeit der Ergebnisse zur Etablierung von Immunmarkern in der Diagnostik stellt zudem der Zeitpunkt der ELISPOT-Untersuchung dar. So fiel der Zeitpunkt der ELISPOT-Untersuchung und damit auch die Abbildung der immunologischen Reaktion in der Regel gerade nicht auf ein frühes Krankheitsstadium oder den Diagnosezeitpunkt, sondern die ELISPOT-Untersuchung fand vielmehr im Verlauf der Erkrankung statt. Die Patient*innen waren so in der Regel auch nicht therapienaiv, sondern häufig unter aktueller Therapie mit IVIg oder in der Vergangenheit unter Therapie mit den in der Methodik (vgl. 2.2.1 Patient*innen) genannten Immunsuppressiva gewesen. Eine Reduktion von auch hier untersuchten TH1-Zellen konnte in der Vergangenheit jedoch unter der Therapie mit IVIg gezeigt werden. [6] Aufgrund dieser Überlegungen und Beobachtungen ist ein Unterschied in der Immunreaktion bei therapienaiven Patient*innen in einem frühen Krankheitsstadium denkbar und meine Ergebnisse sind unter diesen Umständen möglicherweise nur eingeschränkt übertragbar.

Mit der Untersuchung auf TH1-Reaktionen und Antikörpern gegen Neurofascin in den gleichen Patient*innen bin ich der Frage nachgegangen, ob eine Assoziation der TH1-Reaktionen spezifisch gegen NF155 und NF186 mit Autoantikörpern gegen diese Peptide vorliegt. Meine Ergebnisse implizieren nun keineswegs eine solche Assoziation, vielmehr sprechen meine Daten für ein Überwiegen der zellulären Immunantwort im Erkrankungsmechanismus der CIDP. Zur weiteren Erforschung der aufgeworfenen Frage nach dem genannten Zusammenhang von Antikörper- und Zellantwort könnte jedoch die simultane ELISPOT-Untersuchung von B- wie T-Lymphozyten in CIDP-Patient*innen von Nutzen sein.

Eine solche Methode wird aktuell schon angewendet, so werden vergleichende B- und T-Zell-ELISPOT-Untersuchungen in der Nachsorge bei Patient*innen nach Nierentransplantation eingesetzt. [25] Mit der Durchführung einer solchen Untersuchung an CIDP-Patient*innen ließe sich besser als in meinem Studiendesign die

Frage klären, inwieweit bei Patient*innen mit einer spezifischen T-Zellantwort auch B-Zellen an der Pathogenese beteiligt sind, oder aber mit der Bildung von Antikörpern zu einem früheren Zeitpunkt waren. So ließe sich beispielsweise mit Hilfe einer ELISPOT-Untersuchung mit B-Gedächtnis-Zellen erforschen, ob bei Patient*innen eine Autoantikörperreaktion gegen Neurofascin oder aber auch die myelinentstammenden Peptide stattfand. Durch Bestimmung von Antikörperkonzentrationen gegen diese gleichen Peptide ließe sich ferner klären, ob zudem eine Antikörperbildung vorliegt. Hierfür nötige ELISPOT-Untersuchungen an B-Gedächtniszellen haben sich bereits in der Kontrolle des Erfolgs von Impfungen gegen Humane Papilloma- [26] und Influenzaviren [27] als zuverlässiges Instrument erwiesen und ließen sich abgewandelt verwenden.

Dank bestehender Leitfäden zur Durchführung von ELISPOT-Untersuchungen [28] ist der ELISPOT bereits eine weit verbreitete Untersuchungsmethode und über die Verwendung in der Forschung hinaus beispielsweise auch in der Diagnostik der Tuberkulose fest etabliert [29]. Dies hat eine valide Erforschung der Sensitivität und Spezifität sowie der Vor- und Nachteile dieser Untersuchungsmethode begünstigt [30, 31]. Um die Methode weiterzuentwickeln und eine feste Etablierung im Klinikalltag zu schaffen, besteht zudem seit einigen Jahren das Bestreben in multizentrischen Studien weitere und bessere Standards für die Testdurchführung und die Ergebnisinterpretation festzulegen [32].

Vor diesem methodischen Hintergrund erscheint der ELISPOT als ein probates diagnostisches Werkzeug für den Einsatz im klinischen Alltag. In der weiteren Entwicklung von Immunmarkern ist es nun vor allem wichtig, eine größere Kohorte von Patient*innen näher am Zeitpunkt des ersten Auftretens von CIDP verdächtigen Symptomen zu untersuchen. So könnte im Rahmen der aktuellen Diagnostik nach den Kriterien der EFNS/PNS [15], und so vor dem Einleiten der Therapie und ohne diese zu verzögern, bereits die antigenspezifischen Immunantworten in Patient*innen mit Verdacht auf CIDP bestimmt werden.

Konkret könnten etwa bereits bei Aufnahme in eine Neurologische Klinik bei Verdacht auf Polyneuropathie Blutzellen und -sera von Patient*innen gewonnen werden und auf antigenspezifische B- und T-Zellantworten sowie Autoantikörper untersucht werden. Erst im Nachhinein würde dann die im Rahmen der bereits etablierten Diagnostik gestellte Diagnose mit der bestimmten Immunantwort in Zusammenhang betrachtet werden. Ein solches Studiendesign bietet neben der

genannten Vorteilen einer Beschreibung der Immunantwort zum Zeitpunkt der Diagnose ferner die Chance, die Bandbreite möglicher Differentialdiagnosen bei Verdacht auf Polyneuropathie – wie etwa die Multifokal Motorische Neuropathie, vaskulitische Neuropathien oder auch die Amyotrophe Lateralsklerose – zu erfassen und als Vergleichsgruppen in der Studiauswertung zu nutzen. Damit könnte auch gerade die gewünschte Abgrenzung von diesen Differentialdiagnosen mit Hilfe der Etablierung der Immunmarker gelingen.

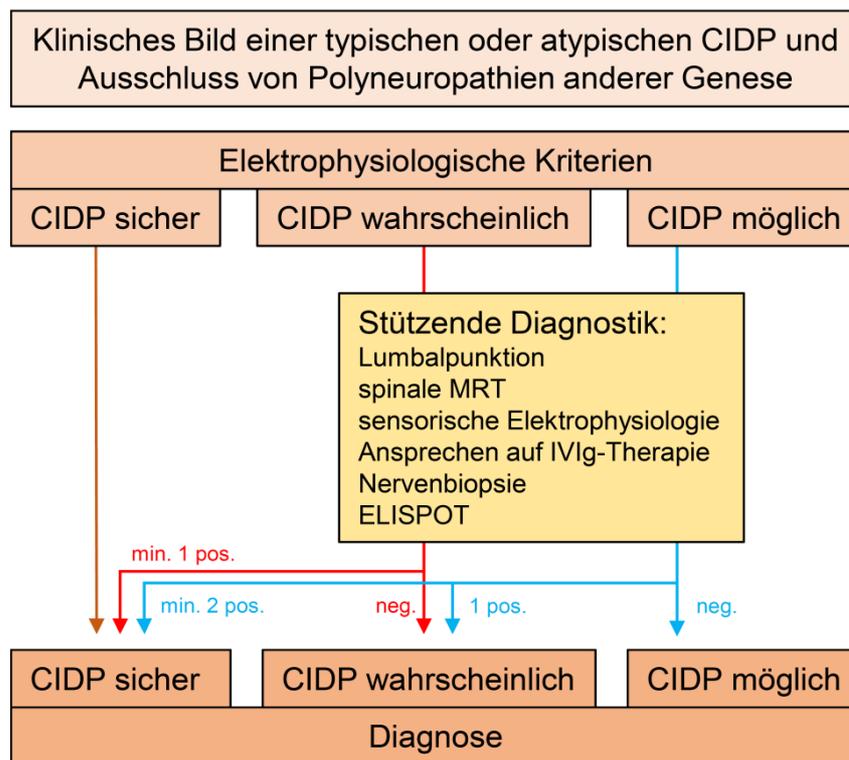


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung des Diagnosealgorithmus der CIDP nach Kriterien der EFNS/PNS [15] mit zusätzlich eingefügter ELISPOT-Untersuchung. Eine ELISPOT-Untersuchung auf die spezifischen Antigene könnte die Diagnostik als weiteres stützendes Kriterium ergänzen und helfen, die CIDP häufiger als „sicher“ oder „wahrscheinlich“ zu diagnostizieren. So könnte beispielsweise eine nach elektrophysiologischen Kriterien „wahrscheinliche CIDP“ bei einer positiv ausgefallenen ELISPOT-Untersuchung als „sicher“ diagnostiziert werden (roter Pfeilweg).

Eine solche Studie zur Bestimmung von in einer frühen Phase der Erkrankung vorhandenen und so in der Diagnostik nutzbaren Immunmarkern bedarf angesichts der Seltenheit der Erkrankungen eines multizentrischen Ansatzes. Durch die Zusammenarbeit mittels gemeinsamer Standards wird es zukünftig möglich sein, Immunmarker – etwa wie in *Abbildung 2* dargestellt – in den Diagnosealgorithmus der CIDP zu integrieren.

Trotz der genannten Limitationen leistet meine Arbeit durch die Identifizierung beteiligter antigenspezifischer Immunantworten und die beispielhafte Errechnung

von möglichen Grenzwerten von Immunmarkern in der Entwicklung diagnostischer Immunmarker einen wichtigen Beitrag. Die hier von mir gezeigte deutliche Assoziation von antigenspezifischen TH1-Antworten im Patient*innenkollektiv mit CIDP ließ eine Differenzierung von Patient*innen mit nicht immunvermittelten Polyneuropathien zu. Ferner lassen die erhöht gemessenen TH1-Reaktionen auf NF186 in der Gruppe der MADSAM sowie auf P0 180–199 und MBP 82–100 in der Gruppe der sensiblen CIDP in diesen antigenspezifischen Reaktionen mögliche Immunmarker für die Diagnostik dieser beiden seltenen atypischen Varianten der CIDP erkennen. Weiterhin waren in meiner Studie spezifische TH1-Reaktionen häufiger mit der CIDP assoziiert als Neurofascin-Antikörper mit der CIDP in den Vorstudien [9, 12, 13]. Dieser Umstand macht die Messung von spezifischen TH1-Reaktionen zu einem guten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Immunmarkern. Wie die praktische Nutzbarkeit dieser Labormethode vonstatten-gehen kann, zeige ich mit der entsprechenden statistischen Auswertung auf, die in meiner wissenschaftlichen Arbeit zu einer beispielhaften Bestimmung von Grenzwerten für die positive Bewertung einer ELISPOT-Untersuchung und damit zu einer Reihe von Immunmarkern für die Diagnose der CIDP führt.

2.5 Referenzen

1. Lunn MP, Manji H, Choudhary PP, Hughes RA, Thomas PK, Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a prevalence study in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999 May;66(5):677-80.
2. Latov N. Diagnosis and treatment of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Nat Rev Neurol*. 2014 Aug;10(8):435-46.
3. Mathey EK, Park SB, Hughes RA, Pollard JD, Armati PJ, Barnett MH, Taylor BV, Dyck PJ, Kiernan MC, Lin CS. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015;Sep;86(9):973-85.
4. Dalakas MC. Pathophysiology of autoimmune polyneuropathies. *Presse Med*. 2013 Jun;42(6 Pt 2):e181-92.
5. Hughes RA, Allen D, Makowska A, Gregson NA. Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2006 Mar;11(1):30-46.
6. Klehmet J, Goehler J, Ulm L, Kohler S, Meisel C, Meisel A, Harms L. Effective treatment with intravenous immunoglobulins reduces autoreactive T-cell response in patients with CIDP. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2015 Jun;86:686-91.
7. Csurhes PA, Sullivan AA, Green K, Pender MP, McCombe PA. T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005 Oct;76(10):1431-9.
8. Staudt M, Diederich JM, Meisel C, Meisel A, Klehmet J. Differences in peripheral myelin antigen-specific T cell responses and T memory subsets in atypical versus typical CIDP. *BMC Neurol* 2017 Apr 26;17(1):81.
9. Ng JK, Malotka J, Kawakami N, Derfuss T, Khademi M, Olsson T, Lington C, Odaka M, Tackenberg B, Prüss H, Schwab JM, Harms L, Harms H, Sommer C, Rasband MN, Eshed-Eisenbach Y, Peles E, Hohlfeld R, Yuki N, Dornmair K, Meinel E. Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology* 2012 Dec 4;79(23):2241-8.
10. Devaux JJ, Odaka M, Yuki N. Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barre syndrome. *J Peripher Nerv Syst* 2012 Mar;17(1):62-71.
11. Stathopoulos P, Alexopoulos H, Dalakas MC. Autoimmune antigenic targets at the node of Ranvier in demyelinating disorders. *Nat Rev Neurol* 2015 Mar;11(3):143-56.
12. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Diaz-Manera J, Pardo J, Ortega-Moreno A, Sedano MJ, Gallardo E, Berciano J, Blesa R, Dalmau J, Illa I. Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIG. *Neurology* 2014 Mar 11;82(10):879-86.
13. Devaux JJ, Miura Y, Fukami Y, Inoue T, Manso C, Belghazi M, Sekiguchi K, Kokubun N, Ichikawa H, Wong AH, Yuki N. Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2016 Mar 1;86(9):800-7.
14. Diederich JM, Staudt M, Meisel C, Hahn K, Meinel E, Meisel A, Klehmet J. Neurofascin and Compact Myelin Antigen-Specific T Cell Response Pattern in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy Subtypes. *Front Neurol*. 2018 Mar 19;9:171.
15. Joint Task Force of the EFNS and the PNS. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--First Revision. *J Peripher Nerv Syst*. 2010 Mar;15(1):1-9.
16. Kleyweg RP, van der Meché FG, Schmitz PI. Interobserver agreement in the assessment of muscle strength and functional abilities in Guillain-Barré syndrome. *Muscle Nerve*. 1991 Nov;14(11):1103-9.
17. Merkies IS, Schmitz PI, Van Der Meché FG, Samijn JP, Van Doorn PA. Psychometric evaluation of a new handicap scale in immune-mediated polyneuropathies. *Muscle Nerve*. 2002 Mar;25(3):370-7.

18. Gorson KC, van Schaik IN, Merkies IS, Lewis RA, Barohn RJ, Koski CL, Cornblath DR, Hughes RA, Hahn AF, Baumgarten M, Goldstein J, Katz J, Graves M, Parry G, van Doorn PA. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy disease activity status: recommendations for clinical research standards and use in clinical practice. *J Peripher Nerv Syst.* 2010 Dec;15(4):326-33.
19. Klehmet J, Meisel C, Meisel A. Efficiency of long-term treatment with intravenous immunoglobulins correlates with reduced autoreactive T cell responses in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Clin Exp Immunol.* 2014 Dec;178 Suppl 1:149-50.
20. Currier JR, Kuta EG, Turk E, Earhart LB, Loomis-Price L, Janetzki S, Ferrari G, Bix DL, Cox JH. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 2002 Feb 1;260(1-2):157-72.
21. Ott PA, Berner BR, Herzog BA, Guerkov R, Yonkers NL, Durinovic-Bello I, Tary-Lehmann M, Lehmann PV, Anthony DD. CD28 costimulation enhances the sensitivity of the ELISPOT assay for detection of antigen-specific memory effector CD4 and CD8 cell populations in human diseases. *J Immunol Methods.* 2004 Feb 15;285(2):223-35.
22. Scheibe F, Alexander T, Prüss H, Wengert O, Harms L, Angstwurm K, Hiepe F, Arnold R, Meisel A. Devastating humoral CIDP variant remitted by autologous stem cell transplantation. *Eur J Neurol.* 2016 Mar; 23(3):e12-4.
23. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988 Sep;44(3):837-45.
24. Allen JA, Lewis RA. CIDP diagnostic pitfalls and perception of treatment benefit. *Neurology.* 2015 Aug. 11;85(6): 498-504.
25. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The Loss of BKV-specific Immunity From Pretransplantation to Posttransplantation Identifies Kidney Transplant Recipients at Increased Risk of BKV Replication. *Am J Transplant.* 2015 Aug;15(8):2159-69.
26. Weinberg A, Huang S, Moscicki AB, Saah A, Levin MJ; IMPAACT P1085 Protocol Team. Persistence of memory B-cell and T-cell responses to the quadrivalent HPV vaccine in HIV-infected children. *AIDS.* 2018 Apr 24;32(7):851-860.
27. Haralambieva IH, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, Poland GA. Detection and Quantification of Influenza A/H1N1 Virus-Specific Memory B Cells in Human PBMCs Using ELISpot Assay. *Methods Mol Biol.* 2018;1808:221-236.
28. Janetzki S, Price L, Schroeder H, Britten CM, Welters MJ, Hoos A. Guidelines for the automated evaluation of Elispot assays. *Nat Protoc.* 2015 Jul;10(7):1098-115.
29. Jafari C, Olaru ID, Daduna F, Ernst M, Heyckendorf J, Lange C, Kalsdorf B. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by combined molecular and immunological methods. *Eur Respir J.* 2018 May 3;51(5).
30. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005 Aug;24(8):529-536.
31. Wen A, Qu XH, Zhang KN, Leng EL, Ren Y, Wu XM. Evaluation of interferon-gamma release assays in extrasanguineous body fluids for diagnosing tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Life Sci.* 2018 Mar 15;197:140-146.
32. Janetzki S, Panageas KS, Ben-Porat L, Boyer J, Britten CM, Clay TM, Kalos M, Maecker HT, Romero P, Yuan J, Kast WM, Hoos A; Elispot Proficiency Panel of the CVC Immune Assay Working Group. Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother.* 2008 Mar;57(3):303-15.

3. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan Markus Diederich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Antigenspezifische T-Lymphozytenantworten als Immunmarker in verschiedenen Varianten der chronisch inflammatorisch demyelinsierenden Polyneuropathie“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

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

Datum, Unterschrift

4. Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation: Diederich JM, Staudt M, Meisel C, Hahn K, Meinel E, Meisel A, Klehmet J. Neurofascin and Compact Myelin Antigen-Specific T Cell Response Pattern in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy Subtypes. Front Neurol. 2018 Mar 19;9:171.

An der oben genannten Publikation habe ich wie in Kapitel 2.2 *Methodik* genauer beschrieben in folgendem Umfang mitgewirkt:

Patient*innen und Kontrollen:

Mitwirkung an der Rekrutierung geeigneter CIDP-Patient*innen und ON-Patient*innen.

Mitwirkung an der Terminabsprache für Blutabnahmen mit den Patient*innen.

Versuchsvorbereitung:

Beschaffung des für den ELISA benötigten Protokolls [9] einschließlich aller benötigten Antikörper [9, 22].

Zusammenstellung der Bestelllisten aller benötigten Materialien, Mithilfe bei der Abwicklung der Bestellungen einschließlich der Durchführung des Transports der Materialien vom Charité-Standort Mitte an den Charité-Standort Virchow-Klinikum.
Ansetzen aller für die Versuche benötigten Lösungen.

Blutabnahmen:

Eigenständige Durchführung der Blutabnahmen für die von mir durchgeführten ELISPOT-Untersuchungen (n = 56) sowie der ELISA (n = 67).

ELISPOT-Untersuchungen:

Gewinnung der PBMC aus pseudonymisierten Blutproben für die von mir eigenständig durchgeführten ELISPOT-Untersuchungen (n = 56).

Eigenständige Durchführung der ELISPOT-Untersuchungen (n = 56), ausgenommen der Untersuchungen 009, 039, 056, 060, 063, 064, 083, K02, K03, K05, K06, K07, K08, K09, K11, K12, K13, K14, K15, K16, deren Durchführung in den Händen von Dr. Maximilian Staudt lag.

ELISA:

Neuetablierung des Neurofascin-ELISA. [9]

Gewinnung, Einfrierung und Auftauung von Blutserum aus pseudonymisierten Blutproben.

Eigenständige Durchführung aller ELISA (n = 72).

Datenerhebung:

Auswertung der von mir eigenständig durchgeführten ELISPOT-Untersuchungen (n = 56), ausgenommen der Auswertung der Untersuchungen 009, 039, 056, 060, 063, 064, 083, K02, K03, K05, K06, K07, K08, K09, K11, K12, K13, K14, K15, K16, deren Auswertung in den Händen von Dr. Maximilian Staudt lag.

Auswertung aller ELISA (n = 72).

Auswertung der demografischen Merkmale aller Studienteilnehmer*innen (n = 76).

Auswertung des klinischen Verlaufs der Patient*innen (n = 67).

Tabellarische Zusammenführung aller erhobenen Daten zur weiteren Datenverarbeitung.

Datenverarbeitung:

Statische Auswertung der erhobenen Daten.

Mitwirken an der Analyse und Interpretation der Ergebnisse.

Manuskript:

Literaturrecherche, Verfassen des Manuskriptes, Erstellung der Abbildungen und der Tabellen.

Mitwirken an der Revision des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

5. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)²

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

Gesamtanzahl: 197 Journale

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

² Abruf unter dem vom Promotionsbüro der Charité – Universitätsmedizin Berlin bereitgestelltem

Link

https://intranet.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/sonstige/medbib/Impact_Faktoren_2017/ISI-WEB-Liste-Kategorie-Clinical_Neurology.pdf

am 06.12.2018.

34	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY	10,206	4.621	0.019350
35	BIPOLAR DISORDERS	5,070	4.490	0.007870
36	NEUROSURGERY	28,592	4.475	0.025930
37	JOURNAL OF NEUROSURGERY	34,561	4.318	0.030750
38	CNS DRUGS	4,364	4.206	0.007540
39	PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	9,823	4.185	0.013170
40	EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	6,920	4.129	0.015110
41	CURRENT OPINION IN NEUROLOGY	5,344	4.010	0.010200
42	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	6,259	3.981	0.014550
43	CEPHALALGIA	8,721	3.882	0.013940
44	International Journal of Stroke	3,825	3.859	0.014880
45	NEUROGASTROENTEROLOGY AND MOTILITY	7,401	3.842	0.014960
46	JOURNAL OF AFFECTIVE DISORDERS	26,957	3.786	0.053380
47	JOURNAL OF NEUROLOGY	14,359	3.783	0.025160
48	NEUROEPIDEMIOLOGY	3,261	3.697	0.005640
49	Expert Review of Neurotherapeutics	3,888	3.692	0.006910
50	AMERICAN JOURNAL OF NEURORADIOLOGY	22,667	3.653	0.029840
51	Journal of Neurologic Physical Therapy	964	3.633	0.001530
52	EUROPEAN ARCHIVES OF PSYCHIATRY AND CLINICAL NEUROSCIENCE	3,837	3.617	0.005400
53	CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY	18,399	3.614	0.023070
54	Frontiers in Neurology	4,272	3.508	0.015580
55	CNS SPECTRUMS	2,200	3.504	0.003180
56	Journal of Neurodevelopmental Disorders	1,106	3.500	0.003410
57	JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY	9,252	3.490	0.008680
58	Current Neurology and Neuroscience Reports	2,770	3.478	0.007410
59	Journal of Neurogastroenterology and Motility	1,207	3.438	0.002930
60	JOURNAL OF SLEEP RESEARCH	5,092	3.433	0.007460
61	JOURNAL OF HEAD TRAUMA REHABILITATION	4,282	3.406	0.005540
62	JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN	2,624	3.403	0.005510
63	Journal of Clinical Sleep Medicine	5,329	3.396	0.011800
64	SLEEP MEDICINE	9,130	3.395	0.016270
65	Current Alzheimer Research	3,740	3.289	0.007910
65	DEVELOPMENTAL MEDICINE AND CHILD NEUROLOGY	11,671	3.289	0.013680

6. Druckexemplar der ausgewählten Publikation



Neurofascin and Compact Myelin Antigen-Specific T Cell Response Pattern in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy Subtypes

Jan-Markus Diederich¹, Maximilian Staudt¹, Christian Meisel², Katrin Hahn³, Edgar Meinl⁴, Andreas Meisel^{1,3} and Juliane Klehmet^{1*}

¹Neurocure Research Center Berlin, Charité University Medicine, Berlin, Germany, ²Department of Medical Immunology, Charité University Medicine, Berlin, Germany, ³Department of Neurology, Charité University Medicine, Berlin, Germany, ⁴Clinical Neuroimmunology, Ludwigs-Maximilians University, Munich, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Robert Weissert,
University of Regensburg, Germany

Reviewed by:

Tomas Per Olsson,
Karolinska Institutet (KI), Sweden
Emily Mathey,
University of Sydney, Australia

*Correspondence:

Juliane Klehmet
juliane.klehmet@charite.de

Specialty section:

This article was submitted to Multiple Sclerosis and Neuroimmunology, a section of the journal *Frontiers in Neurology*

Received: 24 January 2018

Accepted: 06 March 2018

Published: 19 March 2018

Citation:

Diederich J-M, Staudt M, Meisel C, Hahn K, Meinl E, Meisel A and Klehmet J (2018) Neurofascin and Compact Myelin Antigen-Specific T Cell Response Pattern in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy Subtypes. *Front. Neurol.* 9:171. doi: 10.3389/fneur.2018.00171

Objective: The objective of this study is to investigate whether chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) and its subtypes differ in their type 1 T-helper (TH1) cell response against nodal/paranodal neurofascin (NF186, NF155) as well as myelin protein zero (P0 180–199) and myelin basic protein (MBP 82–100).

Methods: Interferon-gamma (IFN- γ) enzyme-linked immunospot assay was used to detect antigen-specific T cell responses in 48 patients suffering typical CIDP ($n = 18$), distal acquired demyelinating polyneuropathy ($n = 8$), multifocal acquired demyelinating sensory and motor polyneuropathy (MADSAM; $n = 9$), and sensory CIDP ($n = 13$) compared to other non-immune polyneuropathy (ON; $n = 19$) and healthy controls ($n = 9$).

Results: Compared to controls, MADSAM and sensory CIDP patients showed broadest IFN- γ T cell responses to all four antigens. Positive IFN- γ responses against two or more antigens were highly predictive for CIDP (positive predictive value = 0.95) and were found in 77% of CIDP patients. Patients with limited antigen-specific response were females, more severely affected with neuropathic pain and proximal paresis. The area under the receiver operating characteristics curve (AUC) of NF186 in MADSAM was 0.94 [95% confidential interval (CI) 0.82–1.00] compared to ON. For sensory CIDP, AUC of P0 180–199 was 0.94 (95% CI 0.86–1.00) and for MBP 82–100 0.95 (95% CI 0.88–1.00) compared to ON.

Conclusion: Cell-mediated immune responses to (para)nodal and myelin-derived antigens are common in CIDP. TH1 response against NF186 may be used as a biomarker for MADSAM and TH1 responses against P0 180–199 and MBP 82–100 as biomarkers for sensory CIDP. Larger multicenter studies study are warranted in order to establish these immunological markers as a diagnostic tools.

Keywords: chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, neurofascin, myelin basic protein, myelin protein zero, T cell response, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy subtypes

INTRODUCTION

Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) is a rare autoimmune disorder of the peripheral nervous system and can be divided clinically into typical CIDP and atypical variants, such as distal acquired demyelinating polyneuropathy (DADS), multifocal acquired demyelinating sensory and motor polyneuropathy (MADSAM), and sensory CIDP (1, 2). Due to its heterogeneous manifestation, different autoimmune targets are likely to be relevant in CIDP (3). T cell responses have been shown to be involved in the immunopathogenesis of CIDP (4, 5). Previously, we and others detected autoreactive T cell responses against the compact myelin antigenic epitopes P2, PMP-22 as well as myelin protein zero 180–199 (P0 180–199), myelin basic protein 82–100 (MBP 82–100) measured by enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay (6–8). Additionally, we found differences between typical and atypical CIDP in antigenic response against P0 180–199 and MBP 82–100 (8).

There is an emerging body of evidence that molecules of the nodal/paranodal complex may be essential targets for blocking propagation of nerve impulses along myelin fibers (9). Thus, autoantibodies against the paranodal protein neurofascin 155 (NF155) have been identified in CIDP patients as well as patients suffering from combined central and peripheral demyelination (10, 11). Antibodies against the nodal NF186 have also been found in CIDP (12). The purpose of this study was to investigate whether CIDP patients show autoreactive T cell responses against NF155 and NF186 and secondly whether CIDP and its clinical variants differ in their T cell response against NF155, NF186 as well as against the myelin epitopes P0 180–199 and MBP 82–100.

MATERIALS AND METHODS

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consent

The study was approved by the ethical committee of Charité University Medicine Berlin. All patients were recruited in the outpatient clinic of the Charité Department of Neurology. All patients gave their written informed consent for the study. Pseudonyms were used for the study.

Patients

For our study, 48 patients with typical CIDP ($n = 18$), DADS ($n = 8$), MADSAM ($n = 9$), and sensory CIDP ($n = 13$) were recruited. Diagnoses were made according to the criteria of the European Federation of Neurological Societies/Peripheral

Nerve Society (EFNS/PNS) (13). We assessed the clinical condition of patients by Medical Research Council (MRC) (14), and the inflammatory neuropathy cause and treatment (INCAT) disability score (15). For classification, we used CIDP disease activity status (CDAS) (16), summarizing unstable active and improving status as unstable stage, stable active status and remission status as stable stage. We used symptoms stated in case histories for analysis of clinical features. Patients had received no immunosuppressive drugs at the time of study entry or during the six previous months. Positive treatment response was defined as an improvement of two or more points on the MRC sum score in two different muscle groups, or an improvement of one point or more on the INCAT score, or an improvement of the walking distance of more than 50% compared to baseline results (6, 17). As controls, we included 19 patients with other non-immune polyneuropathies (ONs) such as idiopathic axonal polyneuropathy ($n = 13$), metabolic or toxic polyneuropathy ($n = 1$), hereditary polyneuropathy ($n = 1$) or diabetic polyneuropathy ($n = 2$), motoneuron disease ($n = 1$), ATTR amyloidosis-associated neuropathy ($n = 1$), and nine healthy controls (HCs). Clinical and experimental data of one patient have been submitted as a case report elsewhere (18). In addition, partial MBP and P0 response data from one MADSAM and one typical patient as well as six HCs have been published previously (8).

Blood Samples

For ELISPOT, blood samples were collected using CPT tubes (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). In patients treated with intravenous immunoglobulins (IVIg), blood was obtained on the first day of IVIg-therapy before starting the infusion. Peripheral blood monocytes (PBMCs) were isolated within 3 h by density gradient centrifugation at 1,500 g for 20 min and diluted in CTL-Test-Medium (CTL-Europe, Bonn, Germany) at a concentration of 6×10^6 cells/mL.

ELISPOT

For ELISPOT assay, we used our established protocol (6) based on the Elispot protocol established previously (19, 20). Briefly, 96-well plates (Millipore, Billerica, MA, USA) were coated with an interferon-gamma (IFN- γ)-specific antibody (eBioscience, San Diego, CA, USA) at 4 $\mu\text{g/mL}$ and left overnight in sterile PBS. After blocking with sterile PBS + 1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 60–120 min, fresh PBMCs were added in a number of 4×10^5 cells/well in presence of anti-CD28 antibody which enhances the costimulatory signal (21) (eBioscience) at 2 $\mu\text{g/mL}$. Peripheral myelin antigens MBP 82–100 and P0 180–199 as well as NF155 and NF186 were added at 40 $\mu\text{g/mL}$. As a positive control, we used CEF at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$. CEF is a peptide pool containing 23 MHC class I restricted viral antigens (22). To detect spontaneous IFN- γ secretion, we used CTL-Test-Medium (CTL, Cleveland, OH, USA). Plates were incubated at 37°C and 5% CO $_2$ for 24 h. For detection, we applied mouse anti-human IFN- γ biotin antibody (eBioscience) at a concentration of 2 $\mu\text{g/mL}$ and conjugated at 1:1,000 to streptavidin-horseradish-peroxidase (BioLegend, San Diego, CA, USA). Plates were developed with 3-amino-9-ethyl carbazole reagent

Abbreviations: CIDP, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; CDAS, CIDP disease activity status; DADS, distal acquired demyelinating polyneuropathy; ELISPOT, enzyme-linked immunospot; EFNS, European Federation of Neurological Societies; HC, healthy control; INCAT, inflammatory neuropathy cause and treatment; IFN- γ , interferon-gamma; IVIg, intravenous immunoglobulin; MADSAM, multifocal acquired demyelinating sensory and motor polyneuropathy; MBP/MBP 82–100, myelin basic protein 82–100; MRC, Medical Research Council; NF155, neurofascin 155; NF186, neurofascin 186; ON, other non-immune polyneuropathy; P0/P0 180–199, myelin protein zero 180–199; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells.

(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The resulting spots were detected, counted and analyzed *via* Elispot Reader (Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany) and appendant iSpot 04 Software. Spot forming units (SFU) for each antigen triplicate were averaged and subtracted by average SFU of spontaneous IFN- γ secretion and then calculated for a cell quantity of 10^6 cells. Analyzing of the data was performed in a blinded fashion.

Antigens

Recombinant NF155 and NF186 were kindly provided by E. Meinel (MD, LMU Munich, Germany) and were described earlier (10). P0 180–199 and MBP 82–100 were provided by R. Volkmer (SD, Charité Berlin, Germany) and were described earlier (8).

Statistics

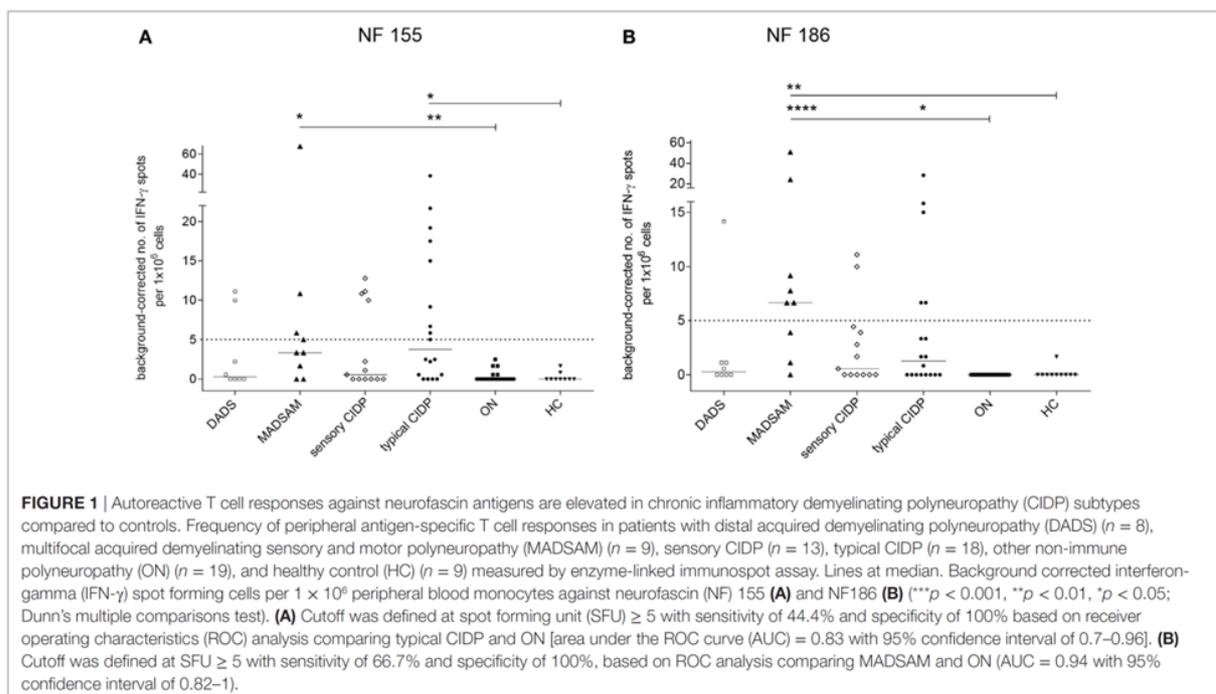
We compared clinical baseline measurements (age, time since diagnosis, MRC, INCAT) as well as antigen-specific IFN- γ responses using Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test or Mann–Whitney *U*-test, when suitable. Fisher's exact test was used to compare frequencies of the non-metric clinical parameters sex, response to IVIg-treatment, CDAS, tremor, sensory ataxia, neuropathic pain, asymmetric paresis, proximal paresis, drop foot, distal motoric latency, F-wave latencies, nerve conduction velocities, conduction block, and positive CSF. We calculated Spearman's rho to analyze the relation of P0 to MBP. In order to evaluate the discrimination properties of the different antigen T cell responses for differentiating a specific type of CIDP from ON or other atypical CIDP variants, we calculated the area under the curve (AUC) and 95% confidential interval (CI) from

receiver operating characteristics (ROC)-curve analyses. Good discriminative potential of an antigen response in a CIDP subtype compared to the control group was defined as an AUC > 7, which did not include 0.5 in 95% CI. To achieve higher discrimination properties, we also analyzed combinations of promising markers using multiple logistic regression with regard to the discrimination of specific disease types from ON. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 6.0 (La Jolla, CA, USA). No adjustment for multiple testing was made. A *p*-value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Identification of Neurofascin- and Myelin-Derived Antigens as T Cell Targets in CIDP

The NF155-specific IFN- γ response was higher in typical CIDP and MADSAM than in HC and ON (Figure 1A). Similarly, the IFN- γ response against NF186 was significantly increased in MADSAM and to a lesser extent in typical CIDP compared to HC and ON (Figure 1B). By using *post hoc* defined cutoff values (Figure 1), 9 out of 18 (50%) typical CIDP as well as 4/9 (44%) MADSAM patients responded to NF155. For NF186, 5/18 (28%) typical CIDP and 6/9 (67%) MADSAM patients exhibited positive IFN- γ responses. In contrast, DADS and sensory CIDP showed lower IFN- γ responses to NF155 and NF186. Importantly, ON and HC showed no NF-specific IFN- γ response at all. Type 1 T-helper (TH1) responses against CEF positive controls showed no differences between any of the groups (data not shown).



Serum samples from patients with immune-polyneuropathy and from controls with other polyneuropathies were analyzed for antibodies to NF155 and NF186 by ELISA. However, none of our samples showed antibody reactivity specific to NF155 or NF186 (data not shown).

Sensory CIDP and typical CIDP patients showed significantly elevated P0 180–199-specific IFN- γ secretion compared to both control groups, whereas DADS patients differed significantly only from HC (Figure 2A). IFN- γ response to MBP 82–100 was elevated in all CIDP subtypes (Figure 2B). For P0 180–199, we found a positive response in 11/16 (69%) typical CIDP, in 12/13 (92%) sensory CIDP, in 5/9 (56%) MADSAM and in 4/8 (50%) DADS patients when we used *post hoc* defined cutoffs (legend Figure 2). For MBP, a positive response was detected in 10/16 (63%) typical CIDP patients, in 12/13 (92%) sensory CIDP, in 6/9 (67%) MADSAM and in 4/8 (50%) DADS patients. For ON, we found P0-specific responses in 3/19 (16%) and MBP-specific responses in 2/19 (11%), whereas investigation of HC samples revealed no antigen-specific T cell responses. Interestingly, there was a positive correlation between P0 180–199- and MBP 82–100-specific IFN- γ responses ($r = 0.82$; $p < 0.001$; Spearman r ; Figure 2C).

In ROC analysis, the anti-NF155 response exhibited good discrimination properties when we compared typical CIDP or MADSAM to ON (Table 1A) but not to other CIDP subtypes (Table 1B). The AUC of NF186 was highest in MADSAM compared to ON (Table 1A) but also to other CIDP subtypes (Table 1B). The P0 180–199 response demonstrated good discrimination properties against ON in all but the MADSAM group, and MBP 82–100 had good discriminative potential between each CIDP subtype and ON (Table 1A). AUCs of P0

and MBP were highest in sensory CIDP compared to ON and by trend to other CIDP subtypes (Table 1). Combinations of all four markers indicated an advantage over using only the best single biomarker, but improvement was not significant (Table 1A).

Antigen-Specific IFN- γ Response as Supportive Diagnostic Criteria for CIDP

We used cutoff values (Figure 11) to define positive responses to tested antigens. In contrast to ON, positive IFN- γ responses against two or more antigens proved highly predictive for any subtype of CIDP (positive predictive value = 0.95) and were found in 77% of CIDP patients (Figure 3). Negative IFN- γ responses to three or four antigens were observed in 23% CIDP patients (Figure 3; negative predictive value = 0.61). In contrast, only two patients (10.5%) of ON showed responses against at least two antigens; 89.5% did not. These two responding patients had been diagnosed with diabetic polyneuropathy based on clinical manifestation and nerve conduction studies. Regarding the distribution for each CIDP subtype, we found that MADSAM and sensory CIDP most often displayed widespread antigen-specific response in contrast to DADS, where the majority responded only to one or two antigens (Figure 3).

Clinical Characteristics of Patients Stratified by Antigen-Specific T Cell Responses

Asymmetric paresis was seen in the NF186 responsive group. The MBP responsive group was male and showed a shorter disease duration compared to the MBP-unresponsive group. Similarly, patients responsive to P0 were male and younger than the P0

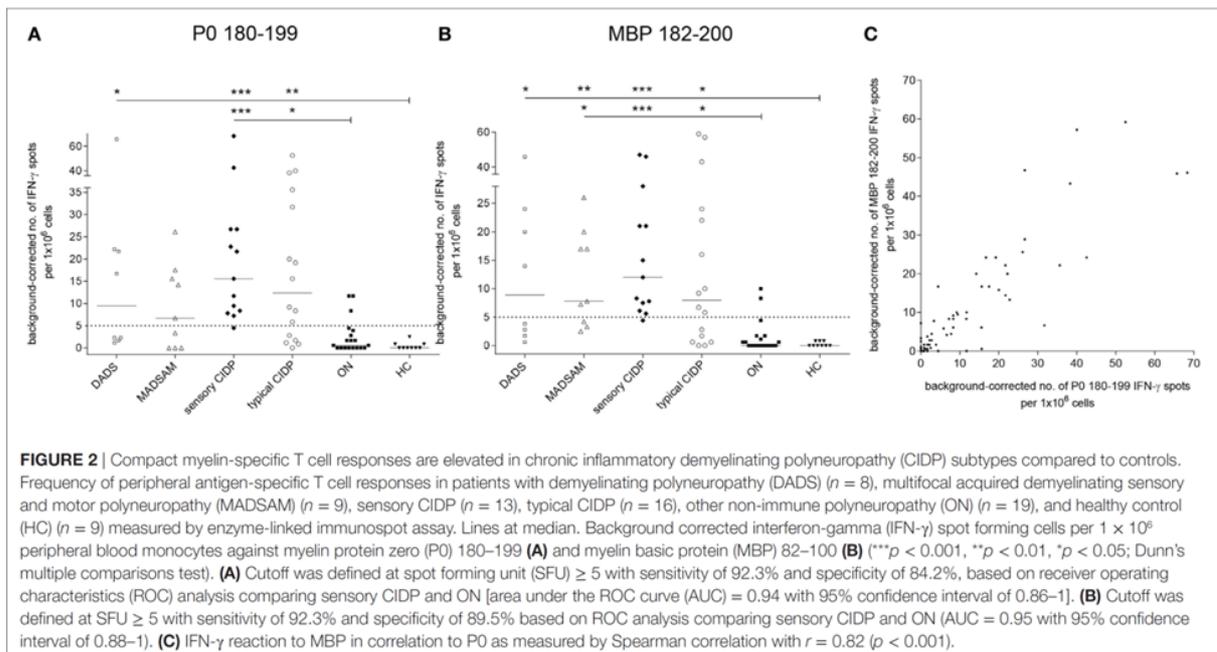


TABLE 1 | ROC analysis of antigen-specific T cell responses as markers for CIDP and its subtypes.

	<i>n</i> of specific type	<i>n</i> total	NF155	NF186	P0 180–199 ^a	MBP 82–100 ^a	<i>p</i> -Value ^b	AUC (95% CI) for combination of all 4 markers <i>p</i> -Value ^c
A. AUC (95% CI) of specific subtype versus ON								
Typical CIDP	18	37	0.83 (0.70–0.96)	0.75 (0.62–0.89)	0.82 (0.68–0.96)	0.77 (0.61–0.93)	0.664	0.86 (0.73–1.00) (<i>p</i> = 0.362)
DADS	8	27	0.65 (0.42–0.88)	0.72 (0.52–0.93)	0.81 (0.64–0.99)	0.88 (0.76–1.00)	0.043	0.95 (0.86–1.00) (<i>p</i> = 0.147)
MADSAM	9	28	0.85 (0.67–1.00)	0.94 (0.82–1.00)	0.69 (0.44–0.94)	0.92 (0.83–1.00)	0.094	1.00 (1.00–1.00) (<i>p</i> = 0.318)
Sensory CIDP	13	32	0.67 (0.50–0.86)	0.74 (0.59–0.90)	0.94 (0.86–1.00)	0.95 (0.88–1.00)	0.011	0.99 (0.97–1.00) (<i>p</i> = 0.183)
B. AUC (95% CI) of specific subtype versus all other subtypes								
Typical CIDP	18	48	0.62 (0.45–0.78)	0.53 (0.35–0.7)	0.51 (0.33–0.77)	0.57 (0.37–0.76)	0.602	
DADS	8	48	0.63 (0.43–0.84)	0.64 (0.44–0.83)	0.54 (0.31–0.77)	0.55 (0.32–0.79)	0.907	
MADSAM	9	48	0.57 (0.38–0.77)	0.76 (0.59–0.93)	0.68 (0.49–0.87)	0.52 (0.34–0.7)	<0.001	
Sensory CIDP	13	48	0.6 (0.42–0.79)	0.58 (0.4–0.75)	0.65 (0.49–0.81)	0.63 (0.47–0.8)	0.504	

Results of ROC analysis of each antigen IFN- γ response to study discriminative potential of antigenic T cell response between CIDP subtypes and ON (A) or compared to other subtypes (B).

^aTwo values are missing in group of typical CIDP.

^b*p*-Value of differences between markers.

^c*p*-Value of combination of all four vs. best single marker.

CIDP, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; DADS, distal acquired demyelinating polyneuropathy; MADSAM, multifocal acquired demyelinating sensory and motor polyneuropathy; MBP 82–100, myelin basic protein 82–100; NF155, neurofascin 155; NF186, neurofascin 186; ON, other non-immune polyneuropathy; P0 180–199, myelin protein zero 180–199.

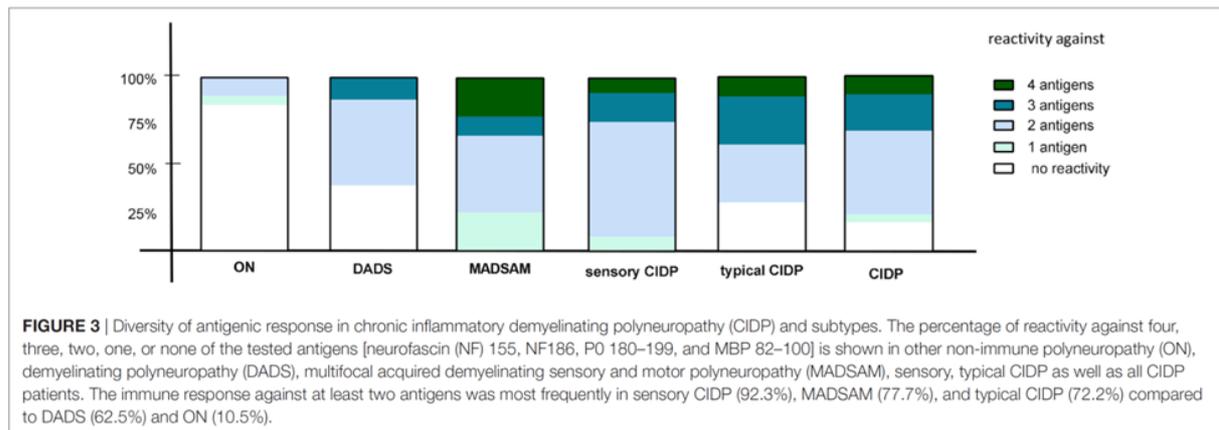


FIGURE 3 | Diversity of antigenic response in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) and subtypes. The percentage of reactivity against four, three, two, one, or none of the tested antigens [neurofascin (NF) 155, NF186, P0 180–199, and MBP 82–100] is shown in other non-immune polyneuropathy (ON), demyelinating polyneuropathy (DADS), multifocal acquired demyelinating sensory and motor polyneuropathy (MADSAM), sensory, typical CIDP as well as all CIDP patients. The immune response against at least two antigens was most frequently in sensory CIDP (92.3%), MADSAM (77.7%), and typical CIDP (72.2%) compared to DADS (62.5%) and ON (10.5%).

negative group. Looking at demyelinating parameters, we found by trend an association between the NF186 response and conduction blocks (*p* = 0.06; Fisher's exact test). Clinical disease activity status, however, improvement upon IVIg-treatment, or clinical features such as tremor and ataxia were independent of T cell reaction specific to NF155, NF186, P0 180–199, or MBP 82–100 (Table 2). Limited antigen-specific T cell responses (response against <2 antigens) were seen in patients who were female and older than patients who showed a positive response against ≥ 2 antigens. Patients with limited antigen-specific response showed a lower MRC and increased INCAT score as well as more neuropathic pain and proximal paresis. F-wave latencies were less likely to be prolonged (Table 2).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated specific IFN- γ T cell responses against the paranodal/nodal antigens NF155 and

NF186 as well as against myelin-derived antigens MBP 82–100 and P0 180–199 in CIDP compared to ON. Positive IFN- γ responses against two or more antigens were highly predictive for any subtype of CIDP, with MADSAM and sensory CIDP showing the broadest immune response to the four tested antigens. ROC analysis indicated highest discriminative potential of NF186-specific T cell responses in MADSAM and the highest discriminative potential of P0 180–199 and MBP 82–100-specific response in sensory CIDP, suggesting the presence of cell-mediated immune responses against these antigens as a suitable biomarker for CIDP diagnosis.

The autoreactive T cell responses against NF155 and NF186 that we demonstrated here for typical CIDP and MADSAM might be of particular relevance. Recently, IgG4 antibodies to NF155 have been found in a clinically distinct subgroup of CIDP that show a younger age at onset, tremor, ataxia, CNS demyelination and a poor response to IVIg treatment which was not compatible with established EFNS classification criteria (11, 23). Based on

TABLE 2 | Clinical characteristics of ELISPOT antigen-responsive patients and patients with limited antigen-specific response.

	NF155 pos.	NF186 pos.	P0 180–199 pos.	MBP 82–100 pos.	Limited response (<2 antigen pos.)
n of patient (%)	19/48 (40)	14/48 (29)	32/48 (67)	32/48 (67)	11/48 (23)
Sex, male (%)	14 (74)	11 (79)	26 (81) ^a	26 (81) ^a	4 (36) ^b
Age, mean (range)	58 (27–80)	61 (53–77)	60 (27–82) ^a	60 (27–82)	73 (63–77) ^b
Time since diagnosis, median (range)	4 (0–10)	3 (0–10)	3 (0–17)	2 (0–17) ^a	5 (1–23)
Good response to IVIg-therapy, n (%)	16/18 (89)	11/14 (79)	21/29 (72)	23/30 (77)	9/10 (90)
Unstable disease, n (%)	8 (42)	8 (57)	16 (50)	17 (53)	6 (55)
MRC, mean (range)	74 (63–80)	74 (66–78)	73 (45–80) ^a	73 (45–80)	72 (62–76) ^b
INCAT, median (range)	3 (1–4)	3 (1–6)	3 (1–7)	3 (1–7)	4 (2–6) ^b
Tremor, n (%)	8 (42)	6 (43)	12 (38)	13 (41)	8 (73)
Sensory ataxia, n (%)	14 (74)	10 (71)	22 (69)	20 (63)	9 (82)
Neuropathic pain, n (%)	7 (37)	6 (43)	13 (41)	13 (41)	10 (91) ^c
Asymmetric paresis, n (%)	9 (47)	10 (71) ^a	13 (41)	14 (44)	3 (27)
Proximal paresis, n (%)	10 (52)	10 (71)	12 (38) ^a	13 (41)	9 (82) ^b
Drop foot, n (%)	13 (68)	12 (86)	18 (56)	18 (56)	10 (91)
Distal motoric latency, n (%)	8 (42)	5 (36)	10 (31)	9 (28)	5 (10)
F-wave latencies, n (%)	15 (79)	12 (86)	23 (72)	22 (69)	4 (8) ^b
Nerve conduction velocities, n (%)	15 (79)	8 (57)	20 (63)	20 (63)	7 (15)
Conduction block, n (%)	4 (21)	6 (43)	7 (22)	9 (28)	2 (4)
Positive CSF, n (%)	13 (68)	10 (71)	16 (50) ^a	16 (50) ^a	8 (17)

Positive electroneurographic parameters (prolonged distal motor latency, F-wave latency, nerve conduction velocity, conduction block) were defined according electrodiagnostic criteria of EFNS (13).

^ap-Value for antigen positive patients in comparison to negative group: $p < 0.05$.

^bp-Value for group of patients with negative reaction to three or more antigens in comparison to group with two or more positive reaction: $p < 0.05$.

^cp-Value for group of patients with negative reaction to three or more antigens in comparison to group with two or more positive reaction: $p < 0.001$.

INCAT, inflammatory neuropathy cause and treatment; IVIg, intravenous immunoglobulin; MBP 82–100, myelin basic protein 82–100; MRC, Medical Research Council; NF155, neurofascin 155; NF186, neurofascin 186; P0 180–199, myelin protein zero 180–199.

the fact, that NF155-specific antibodies have been found in this clinically distinctive subgroup, we also correlated antigen-specific IFN- γ response with a number of clinical features (Table 2). We did not find any association between ataxia, tremor, pain, or type of paresis. In contrast to recent NF155 antibody studies (11), however, patients showing IFN- γ T cell responses against NF155 responded well to immunomodulatory treatment, which may suggest a more active T cell driven autoimmune process. In the present study, we found that positive T cell responses against NF155 and NF186 were more frequent than has been reported up to now in published antibody findings (10, 11, 23). This supports the hypothesis of an underlying T cell-mediated immune response (5, 6). Our results of NF-specific T cell reactivity further support the importance of the Ranvier node as an immunological target in CIDP. However, evidence is still lacking whether the detected antigen-specific T cell response may contribute to the disease. On the other hand, T cell response may just have evolved by tissue damage and not be pathogenic. Based on our control data of patients with non-immune neuropathy showing no or very low T cell reactivity a secondary immune response does not seem to play an important role. The elevated IFN- γ response against NF186 in MADSAM was clearly distinct from ON and other CIDP subtypes, which points to NF186 as a promising diagnostic marker to be validated in a larger multicentric study.

In the present study, we detected IFN- γ responses against P0 and MBP in 67% of our CIDP cohort. P0 is one of the major peripheral myelin proteins that functions as autoantigen in models of autoimmune peripheral neuropathy (24, 25). There is still little evidence about the role of MBP 82–100 in the pathogenesis of CIDP even though MBP has been detected as part of the myelin sheath of peripheral nerves (26). Here, we found in CIDP elevated

IFN- γ responses against both P0 and MBP that show highest discriminating properties in sensory CIDP compared to ON and by trend to other subtypes. Sensory CIDP is often difficult to differentiate from non-immune polyneuropathy, since it often does not correspond with the current EFNS/PNS diagnostic criteria (13, 27, 28). P0 180–199 and MBP 82–100-specific responses may therefore be suitable candidates as diagnostic markers to support the diagnosis of sensory CIDP. Early diagnosis of CIDP and treatment initiation is essential in order to prevent irreversible axonal damage and thus disability. On the other hand, there is increasing evidence that many patients are misdiagnosed with CIDP. Recently, Allen et al. showed in a retrospective analysis of 58 patients that about 47% of all cases had been misdiagnosed with CIDP and subsequently treated for long periods without clear evidence for efficacy of treatment (27). A diagnostic marker could help to prevent misdiagnosis and reduce side effects and costs of unnecessary treatment. It would be therefore of high relevance to validate our findings in larger multicentric studies. Even though this study is comparatively large, with a total number of 48 patients, it is still too small to firmly identify T cell epitopes and correlate them with clinical features or a specific CIDP subtype. Another limitation may be the fact that the patients included were not treatment-naive and had a rather long disease duration. This may have affected our results and thus limit the predictive evidence. Despite the fact that CIDP single subtype divisions are small we still found significant higher antigen-specific T cell responses compared to controls whereas no difference could be found for the control peptide pool (CEF). Thus, our prospectively generated explorative data support a strong hypothesis. However, due to the small numbers of CIDP subtypes the present work represents a basis for validation in a greater multicenter study

In addition, including other demyelinating diseases such as Guillain-Barré-Syndrom, Multifocal Motoric Neuropathy of hereditary Charcot-Marie-Tooth1 neuropathy as controls would be helpful for understanding pathomechanism as well as for developing T cell-specific responses as a biomarker of CIDP. For that, the Elispot assay provides robust, highly reproducible data. The Elispot technique can be easily used with frozen and subsequently thawed PBMCs. ELISPOT appears to be one of the fast growing applications in biomedical research such as in vaccine development (29), HIV research (30), and cancer and allergy research (31), most of them in multicenter trials. Furthermore, comparative B and T cell ELISPOT assays are useful in the process control of kidney transplant recipients (32). The great advantage of ELISPOT assay over flow cytometry is its unsurpassed sensitivity in detecting low frequency antigen-specific T cells that secrete effector molecules. A simultaneously performed T and B cell ELISPOT assay in patients with CIDP could allow a direct comparison of memory T and B cell response in the peripheral blood. Since PBMCs can be efficiently frozen without loss of function when tested in ELISPOT assay, it can be easily used to investigate suitable progression or treatment efficacy parameters.

In our cohort, eleven CIDP patients showed only a limited antigen-specific response. Looking at their clinical characteristics, we found these patients were older, had a longer disease duration, a lower MRC, and increased INCAT score with manifest long-term damages such as severe paresis and pain syndromes. Thus, the lack in autoimmune responses in this non-responder group could be attributable to a somewhat “burnt-out” disease status. We observed asymmetric paresis in the NF186 responsive group, which is compatible with the clinical definition of MADSAM patients. Patients responding to MBP and P0 were male and younger than those in the non-responsive group. This concurs with a recent clinical description of sensory CIDP (28). In contrast, there were two patients in the ON group who responded to two antigens. These patients had been diagnosed with diabetic polyneuropathy based on clinical manifestation and nerve conduction studies. However, the antigenic response in these patients may suggest an underlying immune-mediated mechanism as is being discussed with increasing frequency regarding some forms of diabetic neuropathy (33, 34).

In summary, we provide evidence for underlying auto-reactive T cell immune responses against neurofascin as well as compact myelin epitopes in CIDP and variants. P0 180–199 and MBP 82–100 IFN- γ responses were associated with sensory CIDP, whereas NF186-specific IFN- γ response was associated with MADSAM. Further multicentric studies including other

inflammatory neuropathies are required to validate these promising biomarkers with reliable cut offs as useful diagnostic tools for CIDP, its subtypes, and for treatment guidance.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the ethical committee of Charité University Medicine Berlin. All patients were recruited in the outpatient clinic of the Charité Department of Neurology. All patients gave their written informed consent for the study. Pseudonyms were used for the study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J-MD: acquisition, analysis, and interpretation of data, writing of manuscript. MS: acquisition and analyses of data. CM: analyses of data and critical revision of manuscript for intellectual content. KH, patient recruitment, critical revision of manuscript for intellectual content. EM, provision of peptides, analysis, and interpretation of data. AM: critical revision of manuscript for intellectual content, conduct of study, and supervision. JK: study concept and design, patient recruitment, analysis and interpretation of data, study supervision, and writing of manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Ulrike Grittner (Institute for biometry and clinical epidemiology, Charité University Medicine, Berlin). They thank Christin Köppen (Department of Clinical Immunology, Charité University Medicine, Berlin) and Maik Stein (Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies, Berlin) for support with ELISPOT, Anita Kaiser-Friedrich, Jessica Passon, Marina Schreiber, and Susanne Stark (Outpatient clinic, Department of Neurology, Charité University Medicine, Berlin) for patient's care, Heike Israel-Willner for support in recruitment of HC. Sandra Bauer, Sonya Becker, Anke Jurisch, and Susanne Metzkow (Department of Clinical Immunology, Charité University Medicine, Berlin) for technical support.

FUNDING

The study was funded by a research grant from Grifols and supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft = German Research Foundation (NeuroCure Cluster of Excellence, Exc. 257) and the Open Access Publication Fund of Charité—Universitätsmedizin Berlin.

REFERENCES

1. Latov N. Diagnosis and treatment of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Nat Rev Neurol* (2014) 10:435–46. doi:10.1038/nrneurol.2014.117
2. Eftimov F, van Schaik I. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: update on clinical features, phenotypes and treatment options. *Curr Opin Neurol* (2013) 26:496–502. doi:10.1097/WCO.0b013e328363bf44
3. Dalakas MC. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat Rev Neurol* (2011) 7:507–17. doi:10.1038/nrneurol.2011.121
4. van den Berg LH, Mollee I, Wokke JH, Logtenberg T. Increased frequencies of HPRT mutant T lymphocytes in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: further evidence for a role of T cells in the etiopathogenesis of peripheral demyelinating diseases. *J Neuroimmunol* (1995) 58:37–42. doi:10.1016/0165-5728(94)00185-Q
5. Klehmet J, Staudt M, Ulm L, Unterwalder N, Meisel A, Meisel C. Circulating lymphocyte and T memory subsets in glucocorticosteroid versus IVIG treated patients with CIDP. *J Neuroimmunol* (2015) 283:17–22. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.03.023
6. Klehmet J, Goehler J, Ulm L, Kohler S, Meisel C, Meisel A, et al. Effective treatment with intravenous immunoglobulins reduces autoreactive T-cell response in patients with CIDP. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2015) 86:686–91. doi:10.1136/jnnp-2014-307708

7. Csurhes PA, Sullivan AA, Green K, Pender MP, McCombe PA. T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2005) 76:1431–9. doi:10.1136/jnnp.2004.052282
8. Staudt M, Diederich JM, Meisel C, Meisel A, Klehmet J. Differences in peripheral myelin antigen-specific T cell responses and T memory subsets in atypical versus typical CIDP. *BMC Neurol* (2017) 17(1):81. doi:10.1186/s12883-017-0860-z
9. Stathopoulos P, Alexopoulos H, Dalakas MC. Autoimmune antigenic targets at the node of Ranvier in demyelinating disorders. *Nat Rev Neurol* (2015) 11:143–56. doi:10.1038/nrneurol.2014.260
10. Ng JK, Malotka J, Kawakami N, Derfuss T, Khademi M, Olsson T, et al. Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology* (2012) 79:2241–8. doi:10.1212/WNL.0b013e31827689ad
11. Querol L, Nogales-Gadea G, Rojas-Garcia R, Diaz-Manera J, Pardo J, Ortega-Moreno A, et al. Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology* (2014) 82:879–86. doi:10.1212/WNL.0000000000000205
12. Devaux JJ, Odaka M, Yuki N. Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barre syndrome. *J Peripher Nerv Syst* (2012) 17:62–71. doi:10.1111/j.1529-8027.2012.00372.x
13. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society. Guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society – first revision. *J Peripher Nerv Syst* (2010) 15:1–9. doi:10.1111/j.1529-8027.2010.00245.x
14. Klehmet J, Meisel C, Meisel A. Interobserver agreement in the assessment of muscle strength and functional abilities in Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve* (1991) 14:1103–9. doi:10.1002/mus.880141111
15. Merkies IS, Schmitz PI, Van Der Meché FG, Samijn JP, Van Doorn PA. Psychometric evaluation of a new handicap scale in immune-mediated polyneuropathies. *Muscle Nerve* (2002) 25:370–7. doi:10.1002/mus.10045
16. Gorson KC, van Schaik IN, Merkies IS, Lewis RA, Barohn RJ, Koski CL, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy disease activity status: recommendations for clinical research standards and use in clinical practice. *J Peripher Nerv Syst* (2010) 15:326–33. doi:10.1111/j.1529-8027.2010.00284.x
17. Klehmet J, Meisel C, Meisel A. Efficiency of long-term treatment with intravenous immunoglobulins correlates with reduced autoreactive T cell responses in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Clin Exp Immunol* (2014) 178(Suppl 1):149–50. doi:10.1111/cei.12549
18. Klehmet J, Staudt M, Diederich JM, Siebert E, Meinel E, Harms L, et al. Neurofascin (NF)155- and NF186-specific T cell response in a patient developing a central pontocerebellar demyelination after 10 years of CIDP. *Front Neurol* (2017) 8:724. doi:10.3389/fneur.2017.00724
19. Kabilan L, Andersson G, Lolli F, Ekre HP, Olsson T, Troye-Blomberg M. Detection of intracellular expression and secretion of interferon-gamma at the single-cell level after activation of human T cells with tetanus toxoid in vitro. *Eur J Immunol* (1990) 20:1085–9. doi:10.1002/eji.1830200521
20. Olsson T, Zhi WW, Höjeberg B, Kostulas V, Jiang YP, Anderson G, et al. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J Clin Invest* (1990) 86:981–5. doi:10.1172/JCI114800
21. Ott PA, Berner BR, Herzog BA, Guerkov R, Yonkers NL, Durinovic-Bello I, et al. CD28 costimulation enhances the sensitivity of the ELISPOT assay for detection of antigen-specific memory effector CD4 and CD8 cell populations in human diseases. *J Immunol Methods* (2004) 285:223–35. doi:10.1016/j.jim.2003.12.007
22. Currier JR, Kuta EG, Turk E, Earhart LB, Loomis-Price L, Janetzki S, et al. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J Immunol Methods* (2002) 260:157–157. doi:10.1016/S0022-1759(01)00535-X
23. Devaux JJ, Miura Y, Fukami Y, Inoue T, Manso C, Belghazi M, et al. Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* (2016) 86:800–7. doi:10.1212/WNL.0000000000002418
24. Inglis HR, Csurhes PA, McCombe PA. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2007) 78:419–22. doi:10.1136/jnnp.2006.106617
25. Louvet C, Kabre BG, Davini DW, Martinier N, Su MA, DeVoss JJ, et al. A novel myelin P0-specific T cell receptor transgenic mouse develops a fulminant autoimmune peripheral neuropathy. *J Exp Med* (2009) 206:507–14. doi:10.1084/jem.20082113
26. Nave KA, Werner HB. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2014) 30:503–33. doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013101
27. Allen JA, Lewis RA. CIDP diagnostic pitfalls and perception of treatment benefit. *Neurology* (2015) 85:498–504. doi:10.1212/WNL.0000000000001833
28. Aygnac X, Viala K, Koutlidis RM, Taïeb G, Stojkovic T, Musset L, et al. Sensory chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an under-recognized entity? *Muscle Nerve* (2013) 48:727–32. doi:10.1002/mus.23821
29. Malyguine AM, Strobl S, Dunham K, Shurin MR, Sayers TJ. ELISPOT assay for monitoring cytotoxic T lymphocytes (CTL) activity in cancer vaccine clinical trials. *Cells* (2012) 10:111–26. doi:10.3390/cells1020111
30. Fiore-Gartland A, Manso BA, Friedrich DP, Gabriel EE, Finak G, Moodie Z, et al. Pooled-peptide epitope mapping strategies are efficient and highly sensitive: an evaluation of methods for identifying human T cell epitope specificities in large-scale HIV vaccine efficacy trials. *PLoS One* (2016) 11(2):e0147812. doi:10.1371/journal.pone.0147812
31. Janetzki S, Panageas KS, Ben-Porat L, Boyer J, Britten CM, Clay TM, et al. Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother* (2008) 57(3):303–15. doi:10.1007/s00262-007-0380-6
32. Schachtner T, Stein M, Babel N, Reinke P. The loss of BKV-specific immunity from pretransplantation to posttransplantation identifies kidney transplant recipients at increased risk of BKV replication. *Am J Transplant* (2015) 15:2159–69. doi:10.1111/ajt.13252
33. Bril V, Blanchette CM, Noone JM, Runken MC, Gelinas D, Russell JW. The dilemma of diabetes in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Diabetes Complications* (2016) 30:1401–7. doi:10.1016/j.jdiacomp.2016.05.007
34. Dunnigan SK, Ebadi H, Breiner A, Katzberg HD, Barnett C, Perkins BA, et al. The characteristics of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in patients with and without diabetes – an observational study. *PLoS One* (2014) 9:e89344. doi:10.1371/journal.pone.0089344

Conflict of Interest Statement: J-MD, MS, and CM report no disclosure. KH has received speaker honoraria or refunding of conference travel costs from Abbvie, Astellas, CSL Behring, Gilead Sciences GmbH, Pfizer, ViiV Healthcare GmbH. AM reports grants from Grifols during the conduct of the study; personal fees from Grifols and Octapharma. EM received grant support from Novartis and personal compensations from Novartis, Genzyme, and Roche. JK was supported by a Rahel-Hirsch scholarship from the Charité University Medicine, Berlin. She received personal compensation for speaker fees and advisory boards outside the submitted work from Grifols, Octapharma and CSL Behring.

Copyright © 2018 Diederich, Staudt, Meisel, Hahn, Meinel, Meisel and Klehmet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

7. Lebenslauf

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

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

8. Komplette Publikationsliste

1. **Diederich JM**, Staudt M, Meisel C, Hahn K, Meinl E, Meisel A, Klehmet J. Neurofascin and Compact Myelin Antigen-Specific T Cell Response Pattern in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy Subtypes. *Front Neurol.* 2018 Mar 19;9:171.
(Journal Impact Factor 3,508)³
2. Klehmet J, Staudt M, **Diederich JM**, Siebert E, Meinl E, Harms L, Meisel A. Neurofascin (NF)155- and NF186-Specific T Cell Response in a Patient Developing a Central Pontocerebellar Demyelination after 10 Years of CIDP. *Front Neurol.* 2017 Dec 22;8:724.
(Journal Impact Factor 3,508)³
3. Staudt M, **Diederich JM**, Meisel C, Meisel A, Klehmet J. Differences in peripheral myelin antigen-specific T cell responses and T memory subsets in atypical versus typical CIDP. *BMC Neurol.* 2017 Apr 26;17(1):81.
(Journal Impact Factor 2,170)³

³ Journal Impact Factor laut Promotionsbüro der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Abruf unter https://intranet.charite.de/fileadmin/user_upload/microsites/sonstige/medbib/Impact_Faktoren_2017/ISI-WEB-Liste-Kategorie-Clinical_Neurology.pdf am 06.12.2018.

9. Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Juliane Klehmet herzlich bedanken, die dieses Projekt immer mit freundlichem Rat und hilfreicher Tat unterstützt sowie in unzähligen Arbeitsstunden mit zum Erfolg beigetragen hat. Auch möchte ich großen Dank meinem betreuenden Hochschullehrer Prof. Dr. Andreas Meisel für die stete Unterstützung des Projekts und meiner Promotion richten.

Für die gelungene Einarbeitung und die Weitergabe kleiner Tipps und Tricks beim Pipettieren danke ich meinem Kollegen Dr. Maximilian Staudt. Dr. Christian Meisel möchte ich für die theoretische Unterstützung bei der Etablierung der ELISA danken, Dr. Ulrike Grittner für die Unterstützung in mathematisch-statistischen Fragen. Meinen Kolleg*innen Susanne Metzchow, Christin Köppen und Maik Stein möchte ich danken, da sie durch den gemeinsamen wissenschaftlichen Austausch zum Gelingen dieser Forschungsarbeit beitrugen.

Auch möchte ich den Geldgebern dieses Projekts danken. Diese Forschungsarbeit hat finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft als Förderin des *NeuroCure Cluster of Excellence, Exc. 257* erhalten. Außerdem stellten die Grifols Aktiengesellschaft sowie der Publikationsfond für Open-Access-Artikel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Charité – Universitätsmedizin Berlin finanzielle Mittel für dieses Projekt zur Verfügung.

Für ihre tagtägliche Sorge um die Patient*innen der Hochschulambulanz der Klinik für Neurologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin danke ich Anita Kaiser-Friedrich, Jessica Passon, Marina Schreiber und Susanne Stark. Auch danke ich herzlich für ihre Unterstützung meiner Arbeit in der Hochschulambulanz, egal was gerade fehlte, ob Desinfektionsmittel, Tupfer, Bienenstich oder Kaffee, sie fanden eine Lösung um meine Arbeit voran oder meinen Kopf wieder fit zu kriegen.

Besonderen Dank möchte ich an meine Eltern Petra und Jürgen Diederich richten. Ihre jahrzehntelange kontinuierliche Unterstützung und Förderung ist als die grundlegende Bedingung der Möglichkeit unter anderem dieser Arbeit anzusehen. Abschließend möchte ich Freund*innen und Familie für die interessierte Verfolgung des Fortgangs meiner Forschungsarbeit und vor allem die unterhaltsamen und aufheiternden Momente an und jenseits der mikro-biologischen Sicherheitswerkbank danken.