

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper bei Müttern von
Kindern mit neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen und
gesunden Kontrollen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Katharina Sophie Lang
aus
Esslingen am Neckar

Datum der Promotion: 3.12.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit sind bereits Gegenstand zweier Veröffentlichungen. Teilergebnisse der Literaturrecherche unter den Abschnitten 5.1 und 6.1 wurden veröffentlicht in:

<Lang K, Prüß H. *Frequencies of neuronal autoantibodies in healthy controls: Estimation of disease specificity.* Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.>/ <2017>

Teilergebnisse der klinischen Daten unter Abschnitt 5.2 und 6.2.1 sowie Teile der FACS-Ergebnisse unter 5.5 wurden veröffentlicht in:

<Jurek B, Chayka M, Kreye J, Lang K, Kraus L, Fidzinski P, Kornau HC, Dao LM, Wenke NK, Long M, Rivalan M, Winter Y, Leubner J, Herken J, Mayer S, Mueller S, Boehm-Sturm P, Dirnagl U, Schmitz D, Kölch M, Prüß H. *Human gestational N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies impair neonatal murine brain function.* Ann Neurol.>/ <2019>

Detaillierte Angaben zum eigenen Beitrag an den Publikationen finden sich in der Anteilserklärung.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	2
3 Einleitung	4
3.1 Neuronale Antikörper und ihre klinische Relevanz	4
3.2 Mütterliche neuronale Antikörper als Risikofaktor für neuropsychiatrische Entwicklungsstörungen des Kindes	7
3.3 Zielsetzung dieser Arbeit	10
4 Methoden	12
4.1 Systematische Literaturrecherche und Analyse	12
4.2 Aufbau der Studiengruppe: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung	15
4.3 Immunhistochemie	15
4.4 Kommerzieller CBA und kommerzieller IHC-Assay	18
4.5 FACS-Assay	19
4.6 Statistik und Software	20
5 Ergebnisse	21
5.1 Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche zur Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper in Kontrollgruppen	21
5.1.1 Anzahl der verfügbaren Studien und Antikörpertests	21
5.1.2 Verschiedene Testmethoden	23
5.1.3 Seroprävalenz der Antikörper in verschiedenen Kohorten	24
5.1.4 Verfügbare Liquordaten	28
5.1.5 Größe der Kontrollgruppen	31
5.2 Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper bei Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung	32
5.2.1 Klinische Daten	32
5.2.2 Immunhistochemie	35

5.2.3	Neuronale Antikörper in kommerziellem CBA	41
5.2.4	Neuronale Antikörper in kommerzieller Immunhistochemie	42
5.2.5	NMDAR/NR1-Antikörper im FACS-Assay	43
6	Diskussion	52
6.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
6.2	Limitationen der Literatur: Wenige Liquordaten und wenige systematische Studien zur Antikörperprävalenz in Kontrollgruppen	53
6.3	Die Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper in Kontrollgruppen im Vergleich zu der Prävalenz anderer Antikörper	54
6.4	Verschiedene Methoden, verschiedene Ergebnisse?	57
6.5	Interpretation der seropositiven Ergebnisse in der eigenen Kohorte	60
6.6	Antikörper bei Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung - uneindeutige Datenlage	63
6.7	Schlussfolgerung und Ausblick	65
7	Literatur	67
	Eidesstattliche Versicherung	78
	Anteilerklärung	79
	Lebenslauf	80
	Publikationsliste	83
	Danksagung	84

Abbildungsverzeichnis

1	Semiquantitative Einteilung der Fluoreszenzintensitäten in vier Stufen 0 bis 3	17
2	Anzahl der in der Literatur verfügbaren Antikörpertests für neuronale Oberflächenantikörper bei verschiedenen Kohorten	22
3	Größte Kohorte Gesunder Kontrollen pro Antikörper	32
4	Größte Kohorte der Kontrollgruppe Erkrankter pro Antikörper	33
5	Immunhistochemisches Fluoreszenzmuster der NMDAR/NR1-Antikörper . .	38
6	Gewebereaktivität und bindende Antikörper in MPE- und KM-Seren auf unfixiertem Maushirngewebe	39
7	Intrazellulär bindende Antikörper in MPE- und KM-Seren auf fixiertem Mausehirngewebe	40
8	Definition der verschiedenen Populationen NMDAR/NR1-exprimierender HEK-Zellen	45
9	Positive Korrelation zwischen NR1 _{neg} - und NR1 _{high} -Reaktivität der MPE- und KM-Seren	48
10	Verteilung der Anti-NR1-Reaktivität der MPE- und KM-Seren	49
11	Anti-NR1-Reaktivität der MPE- und KM-Seren	50

Tabellenverzeichnis

1	Assoziierte Krankheitsbilder bei Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene neuronale Oberflächenantigene	14
2	Anzahl der Studien und Testungen pro Antikörper	23
3	Vergleich verschiedener Methoden der Antikörpertestung	25
4	Anzahl positiver Serumproben für neuronale Oberflächenantikörper nach Standardmethode	27
5	Anzahl positiver Liquorproben für neuronale Oberflächenantikörper nach Standardmethode	30
6	Klinische Daten	34
7	Psychiatrische Diagnosen der Kinder der MPE	35
8	Neuronale Oberflächenantikörper im kommerziellen CBA	42
9	Charakteristika der CBA-positiven Proben	43
10	Antikörper gegen intrazelluläre Antigene im kommerziellen CBA	44
11	Neuronale Antikörper in kommerzieller Immunhistochemie	44
12	Mediane Fluoreszenzintensität (MFI 647) für die verschiedenen NR1 _{pos} - Populationen	46
13	Klinische Daten zu den Seren mit einer Anti-NR1-Reaktivität Δ MFI 647* > 2 SD über dem Mittelwert	51

Abkürzungsverzeichnis

ADEM: akute disseminierte Enzephalomyelitis
ADH: antidiuretisches Hormon
ADHS: Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätssyndrom
AE: Kontrollgruppe mit anderer nichtneurologischer Erkrankung - infl (inflammatorisch) oder - non-infl (nichtinflammatorisch)
AK: Antikörper
AMPA1+2, AMPA3: (engl.) alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor, Untereinheit 1+2 oder 3
ANE: Kontrollgruppe mit anderer neurologischer Erkrankung - infl (inflammatorisch) oder - non-infl (nichtinflammatorisch)
ANNA: antineuronale nukleäre Antikörper
AQP4: Aquaporin 4
BS: (engl.) blocking solution
BSA: (engl.) bovine serum albumine
Caspr2: (engl.) contactin associated protein-like 2
CBA: (engl.) cell-based assay
CCPD: combined central and peripheral demyelination
CIDP: chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CIS: clinically isolated syndrom
CV2: (engl.) collapsin response mediator protein family number 5 (CRMP5)
D2R: Dopaminrezeptor D2
Delta-MFI oder Δ MFI: Differenz zweier medianer Fluoreszenzintensitäten
DNER: (engl.) delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor
DPPX: (engl.) dipeptidyl-peptidase-like protein-6
ELISA: (engl.) enzyme-linked immunosorbent assay
ERC1: (engl.) elks/rab6-interacting/cast family member 1
Et al.: (lat.) et alii
EYFP: enhanced yellow fluorescent protein
FACS: (engl.) fluorescence-activated cell sorting
FCS: heat-inactivated fetal bovine serum
FIPA: (engl.) fluorescence immunoprecipitation assay
FSC: (engl.) forward scatter GABA_AR, GABA_BR: (engl.) gamma-aminobutyric acid receptor, type A or B
GAD65: Glutamatdecarboxylase 65
GBS: Guillan-Barré Syndrom

GFAP: (engl.) glial fibrillary acidic protein
 GlyR: Glyzinrezeptor
 Homer-3: (engl.) homer protein homolog 3
 Hu (Anti-): Synonym für (engl.) anti-neuron specific cell nuclear antibodies (ANNA) -1
 IgLON5: (engl.) cell adhesion molecule IgLON family member 5
 IHC: Immunhistochemie
 ITPR1: Inositol-1,4,5-Trisphosphatrezeptor
 KE: Kontrollgruppe Erkrankter
 KG: Kontrollgruppe Gesunder
 KM: Kontrollmutter mit Kind ohne psychiatrische Diagnose
 KW: weibliche Kontrolle ohne Kind
 k.A.: keine Angabe
 Lgi1: (engl.) leucine-rich, glioma inactivated 1
 Ma2: paraneoplastisches Antigen Ma2
 MFI: mediane Fluoreszenzintensität
 mGluR1, mGluR5: metabotroper Glutamatrezeptor 1 und 5
 MMN: Multifokale Motorneuropathie
 MOG: (engl.) myelin oligodendrocyte glycoprotein
 MS: multiple Sklerose
 MPE: Mutter eines Kindes mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung
 NGS: (engl.) normal goat serum
 NMDAR/NR1, NMDAR/NR2: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor / Untereinheit GluN1, Untereinheit GluN2
 NMO: Neuromyelitis optica
 NMOSD: (engl.) neuromyelitis optica spectrum diseases. Dazu gehören: longitudinale extensive transverse Myelitis, Optikusneuritis, Myelitis und optikospinale multiple Sklerose
 PBS: (engl.) phosphate-buffered saline (Phosphatpuffer)
 PERM: progressive Enzephalitis mit Rigidität und Myoklonus
 SD: (engl.) standard deviation (Standardabweichung)
 SSC: (engl.) side scatter
 Ri (Anti-): Synonym für (engl.) anti-neuron specific cell nuclear antibodies (ANNA) -2
 RIA: Radioimmunassay
 TPO: Thyreoperoxidase
 VGKC: (engl.) voltage-gated potassium channel
 Yo (Anti-): Synonym für (engl.) purkinje cell cytoplasmic antibody type 1 (PCA1)
 ZIC4: Zinkfingerprotein des Cerebellums 4
 ZNS: zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Hintergrund. Seit Antikörper gegen die NR1-Untereinheit des in der Zellmembran gelegenen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDAR) bei Enzephalitispatientinnen identifiziert wurden, folgten zahlreiche weitere Erstbeschreibungen neuronaler Oberflächenantikörper im Zusammenhang mit autoimmunen Enzephalitiden. Außerdem werden maternale neuronale Oberflächenantikörper als Ursache für neuropsychiatrische Entwicklungsstörungen der Nachkommen diskutiert. Um die klinisch-diagnostische Rolle der neuen Oberflächenantikörper zu beurteilen, ist die Kenntnis ihrer Prävalenz in Kontrollgruppen wesentlich. Die Hypothese dieser Arbeit lautet, dass neuronale Oberflächenantikörper bei Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung (MPE) häufiger als bei Müttern gesunder Kinder (KM) sind.

Methoden. Für eine umfassende Darstellung der Literatur wurde die PubMed-Datenbank auf Studien durchsucht, die Kontrollserum oder -liquor auf mindestens einen von 22 zuvor definierten Oberflächenantikörpern testeten. Zwischen 2015 und 2017 wurden 123 Seren von MPE, 110 von KM und 21 Seren kinderloser Frauen (KW) akquiriert. Diese Seren wurden auf neuronale Antikörper mittels Immunhistochemie (IHC) auf Maushirnschnitten sowie mit einem FACS-Assay auf NMDAR/NR1-Antikörper getestet. Für einen Überblick über mögliche Antikörper erfolgten durch ein Routinelabor IHC- und zellbasierte Assays (CBA) auf 17 Oberflächenantikörper und 15 intrazellulär bindende Antikörper.

Ergebnisse. Die Literaturrecherche identifizierte zwischen 1974 und 2016 bei Kontrollen 115.005 Antikörpertests für Oberflächenantikörper. Im CBA (81% aller Tests) waren 1,1% der Kontrollpopulationen positiv, im FACS-Assay 2,35% und in anderen Methoden 5,81%. Gesunde hatten mit 0,23% die niedrigste Prävalenz. Limitationen der Literatur sind der Mangel an Studien mit systematischem Einschluss großer Kontrollkohorten sowie an Liquor-daten. In der eigenen IHC konnten Antikörper gegen intrazelluläre Antigene, aber nicht gegen Oberflächenantigene gefunden werden. Im kommerziellen CBA waren 0,23% der Oberflächenantikörpertests positiv. Entgegen der Hypothese waren Oberflächenantikörper bei MPE nicht häufiger als bei Kontrollen. Acht der KM und KW hatten Antikörper gegen GlyR (n=7, eine mit zusätzlich NMDAR/NR1-Antikörpern), AQP4 und NMDAR/NR1 (je n=1). Unter den MPE war eine Probe positiv für GABA_BR-Antikörper. Der FACS-Assay ergab dagegen signifikant höhere NMDAR/NR1-Antikörpertiter bei MPE (p=0,03). Bei einem Schwellenwert von 2 Standardabweichungen über dem Mittelwert waren 7,5% der MPE und 1,9% der KM Anti-NMDAR/NR1-positiv, ohne Korrelation zu einer psychiatrischen Diagnose des Kindes.

Schlussfolgerung. Neuronale Oberflächenantikörper können aufgrund ihrer niedrigen Prävalenz bei Gesunden unter Einbeziehung der Klinik als diagnostisches Mittel geeignet sein. Die Hypothese, Oberflächenantikörper seien häufiger bei MPE als bei KM, kann hier nicht eindeutig belegt werden. Unterschiedliche Ergebnisse im CBA und FACS-Assay weisen auf mögliche technische Schwierigkeiten bei der Testung von Seren Gesunder hin. Weitere belastbare Forschungsdaten erfordern epidemiologische Studien mit Liquorproben, einen systematischen Einschluss Gesunder und MPE, sowie eine Optimierung des FACS-Assays für NMDAR/NR1-Antikörper.

2 Abstract

Background. Since the discovery of antibodies against the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate-receptor (NMDAR) on neurons' cell surfaces in patients with encephalitis, many other novel neuronal cell surface antibodies (NSAbs) have been identified related to autoimmune encephalitis. Further, maternal NSAbs may cause psychiatric disorders in the offspring. The knowledge of NSAbs' prevalence in control groups is crucial in order to determine the clinical and diagnostic role of these novel antibodies. This dissertation hypothesizes that NSAbs are more frequent in mothers of children with psychiatric disorders (MPE) than in mothers of healthy children (KM).

Methods. The PubMed-database was searched systematically for studies that tested control serum or cerebrospinal fluid (CSF) for at least one of 22 initially defined NSAbs. From 2015 to 2017, 123 sera from MPE, 110 from KM and 21 sera from women without children (KW) were collected. These sera were tested for NSAbs by immunohistochemistry (IHC) on mouse brain sections and for NMDAR/NR1 antibodies by FACS analysis. Commercial IHC and cell-based assays (CBA) were conducted by a routine laboratory for 17 NSAbs and 15 antibodies against intracellular antigens.

Results. Literature research identified 115.005 antibody tests for NSAbs in controls between 1974 and 2016. CBAs (81% of all tests) yielded 1.1% positive results in controls, FACS assays 2.35% and other methods 5.81%. NSAbs were least frequent in healthy controls (HC, 0.23%). However, studies that systematically included large control groups and data on CSF samples were lacking. The own IHC revealed antibodies against intracellular antigens but no NSAbs. 0.23% of all tests for NSAbs in MPE, KM and KW were positive by CBA. Contrary to the hypothesis, NSAbs were less frequent in MPE than in controls. Eight control individuals had antibodies against GlyR (n=7), AQP4 and NMDAR/NR1 (n=1 each). One MPE had GABA_BR antibodies. However, FACS analysis showed significantly higher

NMDAR/NR1 antibody levels in MPE ($p=0.03$). 7.5% of MPE and 1.9% of KM had NMDAR/NR1 antibodies without correlation to a child's psychiatric diagnosis.

Conclusion. Considering the low prevalence in HC, NSAbs may be a useful diagnostic tool in an appropriate clinical context. The data does not clearly support the original hypothesis. Different results in CBA and FACS indicate possible technical difficulties in testing serum from HC. Further epidemiological studies with CSF samples, systematic inclusion of HC and MPE as well as optimizing the FACS assay for NMDAR/NR1 antibodies would be necessary.

3 Einleitung

3.1 Neuronale Antikörper und ihre klinische Relevanz

Die Beschreibung eines neuen Antikörpers bei zwölf jungen Frauen mit Enzephalitis und Ovarialteratom im Jahre 2007 hat in Neurologie und Psychiatrie weitreichende Wellen geschlagen [51]. Gerichtet war dieser Antikörper gegen NMDA-Rezeptoren, das sind ionotrope Glutamatrezeptoren, die eine wichtige Funktion für die synaptische Plastizität haben [18]. Aufgrund der Assoziation mit einem Teratom wurde zunächst von einer paraneoplastischen Enzephalitis bei jungen Frauen gesprochen [18][51].

Als paraneoplastisch werden Syndrome bezeichnet, die im Zusammenhang mit einer Krebserkrankung entstehen, jedoch nicht durch den Tumor, dessen Metastasen oder Therapie bedingt sind [20]. Am häufigsten sind nicht-neurologische Syndrome wie das SIADH (Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion). Neurologische paraneoplastische Syndrome umfassen unter anderen die limbische Enzephalitis, Enzephalomyelitis, Hirnstammenzephalitis, subakute Kleinhirndegeneration und subakute sensorische Neuropathien. Assoziierte Tumore sind vor allem kleinzellige Bronchialkarzinome, gynäkologische Tumore, Thymome und Lymphome [20]. Die Prognose wird im Allgemeinen als schlecht bewertet, die Behandlung zielt hauptsächlich auf die Tumorthherapie und zudem sprechen Immunsuppressiva kaum an [18][30]. Gleichwohl wird eine immunvermittelte Genese angenommen; gestützt durch den Nachweis von Antikörpern als diagnostisches Kriterium. 1985 wurde der erste paraneoplastische Antikörper gegen neuronale Nuclei bei zwei Patienten mit Lungenkarzinom und subakuter sensorischer Neuropathie beschrieben und als *Anti-Hu* bezeichnet [29]. Gemäß einer neueren Studie zu Hu-Antikörpern, treten 70 % der paraneoplastischen Syndrome bereits *vor* der Tumordiagnose auf [30]. Berücksichtigt man, dass der Nachweis gut charakterisierter neuronaler Antikörper wie Anti-Hu in über 95 % der Fälle mit einem Tumor assoziiert sind [20], so wird der große diagnostische Wert dieser Antikörper deutlich. Die konkrete biologische Rolle der Antikörper ist jedoch bis heute unbekannt. Aufgrund der intrazellulären Lokalisation wird nicht von einer direkt pathogenen Funktion ausgegangen, sondern eher von einer T-Zell-vermittelten Zytotoxizität mit irreversiblen Schäden im Rahmen einer überschießenden Immunantwort bei dem Versuch, den Tumor zu bekämpfen [30][79].

Anders verhält es sich für die 2007 beschriebenen Antikörper gegen NMDA-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Für diese konnte eine direkte pathogene Wirkung über Internalisierung der NMDA-Rezeptoren und damit Reduktion der Rezeptordichte gezeigt werden [37][51]. Das exakte Zielepitop ist für diese Antikörper die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Sie werden im Folgenden NMDAR/NR1-Antikörper genannt. Die Erkrankung verläuft typischerweise in vier Stadien. Nach einem grippeartigen Prodrom entwickeln sich prädominant

psychiatrische Symptome, von Wesensänderung bis hin zu Wahnvorstellungen, gefolgt von Dyskinesien oder epileptischen Anfällen und anschließend schweren vegetativen Störungen, die bis zum Koma oder Tod führen können. Bei weniger als 60 % der Patienten liegt ein Tumor vor [51][75]. Eine immunsuppressive Therapie mit Steroiden, Plasmapherese, Cyclophosphamid oder Rituximab ist dabei effektiv und bei frühzeitigem Beginn der Therapie kann ein schwerer Verlauf abgewendet werden oder vollständig reversibel ausheilen [51].

Zusammenfassend unterscheiden sich NMDAR/NR1-Antikörper von den klassischen paraneoplastischen in vier wesentlichen Aspekten:

1. Sie sind gegen Proteine auf der *Oberfläche* von Neuronen gerichtet.
2. Sie sind direkt pathogen.
3. Sie sprechen auf eine Immuntherapie an.
4. Ihnen liegt nicht zwingend ein Tumor zugrunde, weshalb sie auch *fakultativ paraneoplastische Antikörper* genannt werden [20][51].

In der Folge wurden im Zusammenhang mit Enzephalitiden zahlreiche neue Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene identifiziert, die ebenfalls diese vier Eigenschaften aufweisen und die neue Krankheitsentität der autoimmunen Enzephalitiden begründeten. Nachfolgend sind die wichtigsten Neubeschreibungen aufgeführt:

NMDA-Rezeptor	Dalmau 2007 [18]
Glyzinrezeptor	Hutchinson 2008 [38]
AMPA-Rezeptor	Lai 2009 [46]
GABA _B -Rezeptor	Lancaster 2010 [48]
Lgi1 und Caspr2	Irani 2010 [40]
mGluR5	Lancaster 2011 [49]
D2-Rezeptor	Dale 2012 [17]
DNER	de Graaff 2012 [28]
DPPX	Boronat 2013 [7]
IgLON5	Sabater 2014 [67]
PRG5	Van Coevorden-Hameete 2015 [12]
Neurexin-3a	Gresa-Arribas 2016 [33]

Viele der Antikörper richten sich gegen zentralnervöse Rezeptoren. Darunter sind Rezeptoren für Glutamat, wie NMDAR, AMPAR (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) oder mGluR (metabotroper Glutamatrezeptor) mit je verschiedenen Untereinheiten; außerdem Rezeptoren für Dopamin (D2R), Glyzin (GlyR) oder Gamma-Aminobuttersäure

(GABA-Rezeptor), letzterer als ionotroper GABA_A-Rezeptor oder metabotroper GABA_B-Rezeptor. Weitere Antigene sind Teile von Ionenkanaluntereinheiten wie Lgi1 (leucine-rich, glioma inactivated 1), Caspr2 (contactin associated protein-like 2) und DPPX (dipeptidyl-peptidase-like protein-6) oder fungieren als Zelladhäsionsmoleküle (Neurexin-3a, IgLON5). Außerdem konnte die ehemals unbekannte Zielstruktur des klassischen paraneoplastischen Anti-Tr Antikörpers, einem diagnostischen Marker bei Hodgkin Lymphom und paraneoplastischer zerebellärer Degeneration, im Jahre 2012 charakterisiert werden. Anti-Tr ist gegen ein neuronales Transmembranprotein mit Ähnlichkeit zum epidermalen Wachstumsfaktor (Delta/Notch-like epidermal growth factor-related receptor, kurz DNER) gerichtet [28].

Jedes der Antigene trägt eine wesentliche Rolle für verschiedene, grundlegende synaptische oder elektrophysiologische Prozesse des Nervensystems. Unter anderem deshalb präsentieren die Antikörper sich klinisch divers, wobei in der Regel ein subakuter oder akuter Verlauf beobachtet wird und die Krankheitsbilder unter dem Oberbegriff der *autoimmunen Enzephalitis* zusammengefasst werden.

Typisch für einige dieser Antikörper, zum Beispiel gegen AMPAR, GABAR, Lgi1 und mGluR5, ist eine limbische Enzephalitis mit Verlust des Kurzzeitgedächtnisses, Affektlabilität und temporalen Krampfanfällen. Neben dem limbischen System kann die Entzündung auch vorrangig in den benachbarten Basalganglien lokalisiert sein, wie zum Beispiel bei D2-Rezeptor-Antikörpern. Dies äußert sich klinisch mit einer Kombination aus Bewegungsstörung und psychiatrischen Symptomen. Entsprechend dem Ort der Inflammation korreliert jeder Antikörper mit einem typischen klinischen Syndrom. Zum Beispiel können Patienten mit Lgi1-Antikörpern außer einer limbischen Enzephalitis auch faziobrachiale dystone Anfälle haben, die pathognomonisch für die Anti-Lgi1-Enzephalitis sind. Die NMDAR-Enzephalitis geht dagegen vorrangig mit psychiatrischen Auffälligkeiten wie Wesensänderung, Gedächtnisstörung und Wahn oder Halluzinationen einher - letztlich mit dem Vollbild eines schizophreniformen Syndroms, sodass nicht wenige Patienten initial unter dem Verdacht auf eine primär psychiatrische Erkrankung behandelt werden [18][51]. Andere äußern sich vorrangig mit zerebellärer Ataxie, aufgrund des Antikörperbindemusters in der Immunhistochemie auch *Medusa head-Ataxie* genannt [41]. Dazu gehören die auf neuronale Oberflächen gerichteten DNER-Antikörper. Mit ähnlicher zerebellärer Symptomatik äußern sich auch die klassischen paraneoplastischen Anti-Yo Antikörper, die mit gynäkologischen Tumoren assoziiert sind.

Zudem wurden in den letzten Jahren weitere Antikörper gegen intrazelluläre Antigene in Zusammenhang mit subakuter zerebellärer Degeneration identifiziert, bei denen bisher keine starke Assoziation zu Tumoren festgestellt wurde: Homer protein homolog 3 (Homer-3)-, Inositol-1,4,5-Trisphosphatrezeptor (ITPR1)- und Neurochondrin-Antikörper [41][57]. Von den wenigen beschriebenen Patienten hatte nur ein Patient mit Homer-3-Antikörpern

ein Lungenkarzinom [41]. Aufgrund der intrazellulären Lokalisation der Antigene ist die pathophysiologische Funktion der Antikörper unklar, dennoch werden sie für diagnostische Zwecke eingesetzt.

Immer mehr Antikörper werden beschrieben und die Antikörperdiagnostik wird breiter verfügbar. Dies trägt zu steigenden Inzidenzzahlen der autoimmunen Enzephalitiden bei. Zwischen 2006 und 2015 wurden mit 1,2/100.000 dreimal mehr Neuerkrankungen beschrieben als zwischen 1995 und 2005 [22]. Zudem existieren Fallberichte über atypische Verläufe: bei NMDAR-Antikörpern zum Beispiel in Form einer Postpartum-Psychose [4][51] und anderen rein psychiatrischen Verlaufsformen [75], bei Caspr2-Antikörpern zum Beispiel als epileptische Anfälle und Schmerzsyndrome ohne weitere Zeichen einer limbischen Enzephalitis [25][70].

3.2 Mütterliche neuronale Antikörper als Risikofaktor für neuropsychiatrische Entwicklungsstörungen des Kindes

Neuronale Oberflächenantikörper haben auch das Interesse in der Erforschung kinder- und jugendpsychiatrischer Erkrankungen geweckt; unter anderem in der Hoffnung, Erkenntnisse über zumindest einen Teil der noch überwiegend unverstandenen Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen zu gewinnen.

Insbesondere die zunehmende Anzahl kinder- und jugendpsychiatrischer Diagnosen (der umfassenden Kiggs-Studie zufolge sind 20 % der Heranwachsenden in Deutschland psychisch auffällig [44]) bedeutet für unsere Gesellschaft eine große Herausforderung. Denn diese stellen einen negativen Einflussfaktor auf die berufliche und soziale Entwicklung sowie einen Risikofaktor für somatische Erkrankungen dar [44]. Die Ätiologie der meisten multifaktoriellen Erkrankungen beruht grundsätzlich auf einem Zusammenspiel aus sozioökonomischen Umständen, Exposition und genetischer Veranlagung. Neben dem Bestreben, soziale Ungleichheiten zu bekämpfen und ein kinderfreundliches Heranwachsen zu ermöglichen, könnte ein Ansatz darin liegen, neurobiologische Grundlagen kinder- und jugendpsychiatrischer Erkrankungen zu verstehen und damit therapeutische oder präventive Optionen zu erhalten.

Die Rolle einer Exposition in utero für die Genese psychiatrischer Erkrankungen wird bereits seit Längerem diskutiert [26]. Insbesondere bei neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen mit Beginn im Kindesalter erscheint ein Einfluss der intrauterinen Umgebung naheliegend. Dalton et al. fanden im Jahr 2003 neuronale Antikörper im Serum einer Mutter mit zwei auffälligen Kindern (davon eines mit Autismus, das andere mit Sprachstörung) und zeigten im Tiermodell, dass diese Antikörper die Hirnentwicklung und Verhaltensweisen der Nachkommen beeinflussen [19]. 13 Jahre später konnte erstmals ein spezifischer Antikörper in diesem Zusammenhang isoliert werden: Antikörper gegen Caspr2 waren in einer

Studie gehäuft in Serien von Müttern autistischer Kinder nachzuweisen und führten in einem Mausmodell bei den Nachkommen zu einem autistischen Phänotyp [9].

Hinter der hier zugrundeliegenden Hypothese, dass mütterliche neuronale Antikörper zu neuropsychiatrischen Auffälligkeiten bei den Nachkommen führen, stehen folgende pathophysiologische Annahmen:

1. Antikörper des Typs IgG werden aktiv transplazentar von der Mutter auf den Fötus übertragen.

Dieser Mechanismus hat für das Ungeborene vorrangig protektiven Effekt. Ab etwa der 13. Schwangerschaftswoche werden mütterliche Immunglobuline (IgG) über den fetalen Fc-Rezeptor auf Synzytiotrophoblastzellen aktiv transplazentar transportiert. Dieser Transport ist abhängig von der Antikörpermenge im mütterlichen Blut und nimmt mit dem Schwangerschaftsalter zu. So beträgt die Antikörperkonzentration um die 20. Schwangerschaftswoche im fetalen Blut nur etwa 5 % der mütterlichen Konzentration, am Entbindungstermin übersteigt die fetale sogar die mütterliche Konzentration [45][81].

Die mütterlichen Immunglobuline verleihen dem Ungeborenen und für die ersten Lebensmonate auch dem Neugeborenen Immunität gegen die Pathogene, mit denen die Mutter im Laufe ihres Lebens Kontakt hatte. Dies ist essentiell, da sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem des Neugeborenen noch hoch defizitär sind. Es ist zwar in Grundzügen ausgebildet, jedoch wird die volle Effektivität oder „Reife“ des Immunsystems erst im Laufe des Jugendalters erreicht [81].

2. Immunglobuline passieren die fetale Bluthirnschranke.

Die Bluthirnschranke gewährt nur einen eingeschränkten Austausch zwischen Blut und Räumen des ZNS. Proteine werden nicht aktiv transportiert, sondern folgen abhängig von ihrer Molekülgröße dem Diffusionsgradienten zwischen Serum und Liquor. Im Vergleich zum Serum sind im Liquor kleine Proteine in größerer Konzentration zu finden, als große Proteine. Zum Beispiel liegt das Liquor-Serumverhältnis der IgGs bei 1:440 und der IgMs sogar bei 1:3.400, während der Quotient des kleineren Albumin bei 1:205 liegt [65]. Durch kontinuierlichen Liquorfluss wird dieses Gleichgewicht aufrechterhalten, sodass die Liquorkonzentration der peripher gebildeten Antikörper gering bleibt. Bei Geburt ist die Konzentration von Albumin und IgG proportional zueinander deutlich erhöht und fällt postnatal rasch ab [65]. Dies könnte bedeuten, dass Feten in utero einer höheren Antikörperkonzentration im ZNS ausgesetzt sind. Während der fetalen Hirnentwicklung scheint es zudem einen kritischen Zeitraum zu geben, in dem besonders viele Antikörper Zutritt zum Gehirn haben.

Dies legen Mausmodelle nahe, bei denen schwangeren Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft Antikörper injiziert wurden. Erfolgt die Injektion in einer frühen Schwangerschaftswoche, gelangen sie ins fetale Gehirn. Ab einem bestimmten Zeitpunkt der Schwangerschaft sind sie jedoch nicht mehr im fetalen ZNS nachweisbar [45].

3. Neuronale Antikörper können die Hirnentwicklung beeinflussen.

Die im ersten Kapitel der Einleitung vorgestellten pathogenen Oberflächenantikörper spielen nicht nur eine wichtige Rolle für im Moment ablaufende neurologische Prozesse, sondern auch für die Hirnentwicklung. Zum Beispiel tragen die IgLON5-Proteine sowie Neurexin-3a zur Ausbildung der Synapsen bei [33][67]. Auch das Protein Caspr2 gehört zur Familie der Neurexine, trägt zur neuronalen Entwicklung bei und wird dementsprechend während der Fetalzeit in proliferierenden Neuronen stark exprimiert [9]. NMDA-Rezeptoren werden insbesondere im zweiten Schwangerschaftsdrittel sowohl von glutamatergen als auch gabaergen Neuronen des sich entwickelnden fetalen Kortex exprimiert. Es wird davon ausgegangen, dass diese wesentlich an der Reifung des kortiko-kortikalen Netzwerkes beteiligt sind [3].

Wenn Antikörper die Hirnentwicklung in einer entwicklungskritischen Phase beeinflussen, kann dies zu morphologischen Veränderungen des fetalen Gehirns führen, die sich womöglich auch Jahre später in neuropsychiatrischen Auffälligkeiten äußern, wenn der Antikörper selbst nicht mehr im Kind vorhanden ist.

Hierfür gibt es bereits experimentelle Evidenz aus Tierstudien. Wurden Caspr2-Antikörper einer schwangeren Maus injiziert, zeigten die Nachkommen einen Autismus-ähnlichen Phänotyp und morphologisch ließ sich eine reduzierte Anzahl GABAerger Neurone und Dendriten im Hippocampus nachweisen [9][26]. Ebenfalls in einem Mausmodell, führen NMDAR/NR1-Antikörper bei Exposition in utero zu verschiedenen morphologischen und neurophysiologischen Veränderungen mit langfristig reduziertem Volumen von Kleinhirn, Mittelhirn und Hirnstamm [42]. Phänotypisch zeigen die Mausnachfahren unter anderem reduziertes Angstverhalten und gesteigerte Aktivität. Diese Verhaltensweisen wurden in Tiermodellen für verschiedene neuropsychiatrische Störungen beobachtet: darunter für das Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS), für Schizophrenie, Bipolare Störung oder Autismus [42]. Analog dem aktiven transplazentaren Antikörpertransfer beim Menschen lagen die Antikörper bei den Nachkommen in höherer Konzentration als bei der Mutter vor [42]. Auch die NR2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors scheint für die Hirnentwicklung relevant zu sein. Diese wird von kreuzreagierenden Anti-DNS Antikörpern bei Patientinnen mit systemischem Lupus erythematodes erkannt. In einem Mausmodell führen diese nach intrauteriner Exposition zu einem geringeren Neokortexvolumen und kognitiven Einbußen bei den Nachkommen [53].

3.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Forschung zu neuronalen Antikörpern ist konfrontiert mit einer Ausweitung des klinischen Spektrums und zahlreichen Neubeschreibungen von sowohl Oberflächenantikörpern als auch Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene, mit teilweise nur einzelnen Fallberichten. Außerdem besteht die Aussicht, die Entstehung kinder- und jugendpsychiatrischer Erkrankungen erklären zu können. Es stellt sich dabei die Frage, welche Rolle die Antikörper in der klinischen Diagnostik spielen oder spielen könnten: Wie wahrscheinlich ist es, dass bei einem positiven Antikörperergebnis der Antikörper auch tatsächlich mit der Symptomatik im Zusammenhang steht und somit klinisch relevant ist? Dies ist die Frage nach dem positiven prädiktiven Wert der Antikörpertestung. Um den positiven prädiktiven Wert zu bestimmen, müsste für jeden Antikörper eine Studie mit einer repräsentativen Bevölkerungsgruppe vorliegen, um die Prävalenz der antikörperbezogenen Erkrankung, die Sensitivität und Spezifität zu bestimmen. Allerdings ist das Forschungsgebiet der Oberflächenantikörper jung und zu einigen der Antikörper existieren nur einzelne Fallberichte, sodass für die Bestimmung des positiven prädiktiven Wertes nicht ausreichend Erkenntnisse vorliegen. Daher soll in dieser Arbeit ein Baustein für den positiven prädiktiven Wert untersucht werden: die Spezifität. Wie häufig werden neuronale Oberflächenantikörper bei Kontrollen gefunden? Wie häufig sind sie insbesondere bei gesunden Kontrollen, die per definitionem nicht krank und damit auch nicht Teil eines erweiterten klinischen Spektrums sind?

Im ersten Teil dieser Arbeit soll hierzu eine systematische Literaturrecherche durchgeführt werden. Das Ziel dabei ist eine möglichst umfassende Darstellung der verfügbaren Literatur zur Häufigkeit von neuronalen Oberflächenantikörpern bei unterschiedlichen Kontrollpopulationen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll die Hypothese, dass mütterliche neuronale Oberflächenantikörper zu neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen bei den Nachkommen führen können, über einen epidemiologischen Ansatz untersucht werden. Wenn neuronale Oberflächenantikörper kinder- und jugendpsychiatrische Erkrankungen bedingen, dann könnten sie bei Müttern neuropsychiatrisch auffälliger Kinder häufiger zu finden sein, als bei gesunden Kontrollen. Um diese Hypothese zu testen, soll zunächst eine Studiengruppe aus Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Diagnose sowie eine geeignete Kontrollgruppe aus Müttern gesunder Kinder aufgebaut werden. Da bisher nur wenige Studien zur Assoziation zwischen kinder- und jugendpsychiatrischen Erkrankungen und einem bestimmten Antikörper vorliegen, sollen a priori alle Diagnosen eingeschlossen werden und die Seren zunächst auf eine breite Palette an Antikörpern mittels zell- sowie gewebebasierter indirekter Immunfluoreszenz (CBA und IHC) getestet werden. Da NMDAR-Antikörper zu den häufigsten sowohl bei

Patienten als auch bei Gesunden gehören und ein direkter Einfluss auf die Hirnentwicklung in unserem Labor kürzlich gezeigt werden konnte [16][22][42], soll besonderes Augenmerk auf NMDAR/NR1-Antikörper gelegt werden.

4 Methoden

4.1 Systematische Literaturrecherche und Analyse

Methodik und Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche sind bereits Gegenstand einer eigenen Veröffentlichung [52].

Die Pubmed-Datenbank wurde nach Studien zwischen 1974 bis Oktober 2016 für die Suchbegriffe „antibody“ und „encephalitis“ jeweils in Kombination mit einem der bis dahin beschriebenen neuronalen Oberflächenantigenen durchsucht: acetylcholine receptor, nAChR, AMPA receptor, AQP4, aquaporin-4, caspr2, d2 receptor, dopamine-2 receptor, DNER, DPPX, GABA_A receptor, GABA_B receptor, glycine receptor, IgLON5, Lgi1, metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5, MOG, Neurexin-3a, Neurofascin, NMDAR, PRG5 and VGKC. Zusätzliche Suchbegriffe sind „neuronal surface antibody encephalitis“, „neuronal surface antibody“ und „autoimmune encephalitis“. Die Referenzen der so gewonnenen Studien wurden nach weiteren relevanten Publikationen durchsucht [52].

Für einen größeren Überblick und zur Vergleichbarkeit wurden auch gut charakterisierte Oberflächenantikörper eingeschlossen, die nicht mit autoimmunen Enzephalitiden assoziiert sind: Aquaporin 4 (AQP4)-Antikörper, deren Entdeckung im Jahr 2005 [54] zur Abgrenzung der Neuromyelitis optica von der Multiplen Sklerose führte, nikotinerge Acetylcholinrezeptor (nAChR)-Antikörper, die am längsten bekannten neuronalen Oberflächenantikörper, die zum pathophysiologischen Verständnis der Myasthenia gravis führten; außerdem auch solche, deren klinische Bedeutung umstritten ist: Antikörper gegen Neurofascin, gegen die NR2-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und die sogenannten VGKC-Antikörper, die durch die Entdeckung der spezifischen Antigene Caspr2 und Lgi1 ihre klinische Bedeutung nahezu gänzlich verloren haben [22][40].

Insgesamt wurden Daten für 22 Oberflächenantikörper analysiert (Tabelle 2). Eingeschlossen wurden alle Studien, die eine definierte Anzahl Serum- oder Liquorproben von Kontrollen auf mindestens einen der 22 Oberflächenantikörper testeten.

Alle eingeschlossenen Artikel wurden hinsichtlich Anzahl der getesteten Serum- oder Liquorproben analysiert. Wurde eine Kontrollkohorte ausdrücklich in mehreren Veröffentlichungen herangezogen, wurde diese nur einmal in die Analyse einbezogen [16][34][73]. Die Testmethode und Anzahl der positiven Proben wurden notiert. Da die meisten Studien nur auf Antikörper des IgG-Isotyps testeten und auch nur für IgG pathogene Eigenschaften beschrieben wurden, gingen Daten zur Häufigkeit von IgA- oder IgM-Antikörpern nicht mit in die Analyse ein. Um die verfügbaren Daten für die verschiedenen Antikörper vergleichen zu können, wurde die Anzahl der Antikörpertests gezählt und nicht die Anzahl der getesteten Personen. Wurde eine Probe auf zwei verschiedene Antikörper getestet, wurden diese

in der Gesamtanalyse als zwei individuelle Tests gezählt. Serum und Liquorproben wurden ebenfalls einzeln gezählt. Wurde eine Probe mit verschiedenen Assays auf einen Antikörper getestet, ging sie nur einfach in die Analyse ein.

Die Kohorten wurden zur Analyse anhand der klinischen Angaben durch die Studienautoren in die drei Übergruppen *Patienten*, *Gesunde Kontrollen*, *Kontrollen mit Erkrankung* eingeteilt. Die Einteilung der Kohorten lag nicht immer auf der Hand. Auf der einen Seite sind einige der Antikörper, z.B. gegen AMPAR3 und Neurofascin, nicht mit einem spezifischen Krankheitsbild assoziiert. Auf der anderen Seite ist zum Beispiel das klinische Bild bei AQP4-Antikörpern sehr gut definiert, erweiterte sich jedoch innerhalb eines Jahrzehntes von der sehr klar umrissenen Neuromyelitis optica (NMO) zu einem deutlich breiteren Spektrum (Tabelle 1)[60]. Um der Dynamik gerecht zu werden, wurde die Patientengruppe in zwei Untergruppen unterteilt, nämlich in Patienten mit einem für Oberflächenantikörper typischen klinischen Bild und Patienten mit einem breiteren klinischen Spektrum, welches im Zusammenhang mit den Antikörpern ebenfalls beobachtet wird (Tabelle 1). Bei nur vermuteter Assoziation zwischen Antikörper und klinischer Konstellation, wie zum Beispiel D2R-Antikörper bei Post-Herpes-Simplex-Enzephalitis [1] wurden die Probanden unter die Kontrollgruppe Erkrankter subsumiert. Die Kohorten wurden schließlich in drei Hauptgruppen und weitere Untergruppen eingeteilt:

1. Patienten mit a) typischem klinischem Bild assoziiert mit neuronalen Oberflächenantikörpern oder b) einem breiteren klinischen Spektrum (Tabelle 1).
2. Kontrollgruppe Gesunder (KG) ohne Krankheit, darunter Blutspender oder von den Autoren als „gesund“ oder „normal“ bezeichnet.
3. Kontrollgruppe Erkrankter (KE)
 - 3a) Psychiatrische Erkrankungen (Psych).
 - 3b) Andere inflammatorische neurologische Erkrankungen (infl ANE), wie demyelinisierende Erkrankungen oder zentrale Infektionen.
 - 3c) Andere nichtinflammatorische neurologische Erkrankungen (non-infl ANE), worunter degenerative neurologische Erkrankungen, neurologische Tumoren und Epilepsie subsumiert wurden.
 - 3d) Andere inflammatorische Erkrankungen (infl AE) nicht neurologischer Art, zum Beispiel aus dem rheumatologischen Formenkreis oder systemische Infektionen.
 - 3e) Andere nichtinflammatorische Erkrankungen (non-infl AE), wie maligne Erkrankungen.

Antigen	Typisches Krankheitsbild	Breiteres Spektrum
AMPA1+2	Anti-AMPA-Enzephalitis	Limbische, paraneoplastische Enzephalitis
AMPA3	—	Rasmussens Enzephalitis
AQP4	NMO, Optikusneuritis mit Myelitis	NMOSD
D2R	Basalganglienzephalitis	—
DNER	Paraneoplastische zerebelläre Degeneration	Anti-Tr-positives paraneoplastisches Syndrom
DPPX	Anti-DPPX-Enzephalitis	Idiopathische Enzephalitis
GABAaR	Anti-GABAaR-Enzephalitis	Idiopathische oder limbische Enzephalitis
GABAbR	Anti-GABAbR-Enzephalitis	Idiopathische oder paraneoplastische Enzephalitis
GlyR	Stiff-Person-Syndrom, PERM	Idiopathische Enzephalitis
IgLON5	Anti-IgLON5-positive Patienten	—
mGluR5	Ophelia syndrom	Limbische Enzephalitis
MOG	—	Demyelinisierende Erkrankungen: ADEM, CIS, MS, NMO, NMOSD, Myelitis
nAChR(m)	Myasthenia gravis, Thymom mit neurologischen Symptomen	—
nAChR(g)	—	Myasthenia gravis, idiopathische autonome Neuropathie, Thymom mit neurologischen Symptomen
Neurexin-3a	Neurexin-3a-Antikörper-positive Enzephalitis	—
Neurofascin	—	CCPD, CIDP, GBS, MMN
NMDAR/NR1	NMDAR-Enzephalitis, Enzephalitis mit Ovarialteratom	Limbische Enzephalitis, Enzephalitis lethargica Bickerstaff, Basalganglienzephalitis
NMDAR/NR2	Neuropsychiatrischer Lupus	Limbische Enzephalitis
PRG5	Paraneoplastische zerebelläre Degeneration	Limbische Enzephalitis
VGKC	Limbische Enzephalitis, Morvan Syndrom, Motorische Hyperexzitabilität, Neuromyotonie	Idiopathische Enzephalitis
Caspr2	Morvan Syndrom, Motorische Hyperexzitabilität, Neuromyotonie	Limbische, idiopathische Enzephalitis
Lgi1	Limbische, VGKC-Antikörper-positive Enzephalitis	Morvan Syndrom, Motorische Hyperexzitabilität, Neuromyotonie, idiopathische Enzephalitis

Tabelle 1: Assoziierte Krankheitsbilder bei Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene neuronale Oberflächenantigene

Für die meisten Antikörper wurde bereits ein typisch klinisches Bild charakterisiert. Zudem existieren weitere klinische Manifestationen, die hier als breiteres Spektrum in der rechten Spalte aufgeführt sind. Die Einteilung orientiert sich an den in der Literatur verwendeten Bezeichnungen. ADEM: Akute disseminierte Enzephalomyelitis. CCPD: combined central and peripheral demyelination. CIDP: Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie. CIS: clinically isolated syndrom. GBS: Guillan-Barré Syndrom. MMN: Multifokale Motorneuropathie. MS: Multiple Sklerose. NMO: Neuromyelitis optica. NMOSD: Neuromyelitis optica spectrum diseases, dazu gehören Longitudinale extensive transverse Myelitis, Optikusneuritis, Myelitis und optikospinale Multiple Sklerose. PERM: Progressive Enzephalitis mit Rigidität und Myoklonus.

4.2 Aufbau der Studiengruppe: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung

Zwischen 2015 und 2017 wurden in der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie des Vivantes Klinikum am Friedrichshain in Berlin insgesamt 123 Seren von Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung (MPE) akquiriert. Zum Vergleich wurden 131 Kontrollseren altersentsprechend gesunder Frauen ohne Kinder mit neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen herangezogen. Darunter befinden sich 110 Mütter gesunder Kinder (KM) und 21 kinderlose weibliche Kontrollen (KW), die sich zwischen 2016 und 2017 zur hausärztlichen Routinekontrolle ambulant vorstellten.

Eingeschlossen wurden alle im oben genannten Zeitraum angetroffenen Frauen, die nach ausführlicher Aufklärung und ausreichender Bedenkzeit über die Studienzwecke sowie -risiken ihr schriftliches Einverständnis gaben. Ausgeschlossen wurden in jeder Gruppe Probandinnen mit anamnestisch schwerwiegender Grunderkrankung, Tumorleiden, Autoimmunerkrankungen und Behandlung mit Immunsuppressiva sowie in der Kontrollgruppe zusätzlich Mütter, deren Kinder eine psychiatrische Erkrankung hatten.

Nach der Blutentnahme erfolgte die Zuweisung einer Pseudonymisierungsnummer, das Blut wurde zentrifugiert, das Serum aliquotiert und bis zur Testung bei -80 °C gelagert. Die Gewinnung und Verarbeitung der Seren erfolgte nach Zustimmung durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

4.3 Immunhistochemie

Zur Beurteilung des neuronalen Antikörperprofils der MPE sowie der Kontrollseren wurden in einem ersten Schritt Färbungen mittels Immunhistochemie auf Maushirnschnitten durchgeführt. Den Seren wurden dabei zufällige Färbenummern zugewiesen, sodass sie bezüglich Zugehörigkeit zur Studien- oder Kontrollgruppe verblindet wurden. Unter Immunhistochemie (IHC) wird in dieser Arbeit die gewebebasierte Antikörpertestung mittels indirekter Immunfluoreszenz verstanden. Das Prinzip beruht auf der Bindung von Serumantikörpern an ihre Zielstrukturen, die vom Maushirn ebenso exprimiert werden wie vom menschlichen Gehirn. In einem zweiten Schritt bindet ein Fluorchrom-markierter Zweitantikörper an alle gewebegebundenen Antikörper. Der Zweitantikörper kann dann unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden [39]. Grundsätzlich gibt dabei die Fluoreszenzstärke Auskunft über den Antikörpertiter und das Fluoreszenzmuster über den spezifischen Antikörpertyp, da das Bindemuster die Antigenlokalisation widerspiegelt.

Bei -80 °C gekühlte adulte Maushirne wurden bei -14 °C mit einem Cryostaten (Leica CM 1900) sagittal in $20\text{ }\mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten und auf mikroskopischen Deckglä-

sern der Größe 24x50 mm (R. Langenbrinck GmbH, Artikelnummer 01-2450) bei -80 °C bis zur Antikörpertestung gelagert. Während 15 Minuten wurden die Hirnschnitte aufgetaut, an Raumluft getrocknet und mit einem wasserabweisenden Stift (DakoPen von Dako Cytomatic, Artikelnummer: S200230) umrandet. Für die Färbung an fixiertem Gewebe wurden die Hirnschnitte zehn Minuten mit ca. 200 µl PFA (Paraformaldehyd reinst, Carl Roth, Artikelnummer: 0335) unter dem Abzug inkubiert. Für die Färbung an unfixierten Gewebeschnitten wurde direkt nach dem Auftauen mit dem Waschen begonnen: Die Hirnschnitte wurden 5 Minuten mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS - phosphate-buffered saline, bestehend aus: 137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 10 mmol/l Na₂HPO₄, 1,8 mmol/l KH₂PO₄, Carl Roth) gewaschen. Anschließend wurden sie für 1 Stunde in feuchter Kammer bei Raumtemperatur mit 200 µl einer aus 5 % normalem Ziegenserum (Normal goat serum, abgekürzt NGS, Abcam, Artikelnummer: 25300-054), 2 % Rinderserumalbumin (Bovine serum albumine, abgekürzt BSA, Carl Roth, Artikelnummer: T844) und 93 % PBS bestehenden Lösung geblockt, welche im Folgenden BS (blocking solution) genannt wird. Bei Färbung von fixiertem Gewebe wurde die Blocklösung um 0,1 % des Detergenz Triton (Triton X-100, Chemsolute, Händler Th. Geyer, Artikelnummer 8013) erweitert. Als Erstantikörperlösung wurde das Patientenserum im Verhältnis 1:200, die monoklonalen Antikörper 1:100 mit BS verdünnt. Die Inkubation erfolgte mit 200 µl dieser Lösung in feuchter Kammer bei 4 °C über Nacht.

Am Folgetag wurden die Hirnschnitte dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl der Zweitantikörperlösung 2 Stunden in dunkler, feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Zweitantikörperlösung wurde der grün fluoreszierende Zweitantikörper *Ziege anti-Human IgG Alexa Fluor 488* (Jackson ImmunoResearch, Händler Dianova, Artikelnummer: 109-545-003) 1:1.000 in BS verdünnt. Danach erfolgte im Dunkeln ein erneutes Waschen, dreimal für 5 Minuten in PBS. Abschliessend wurden die Hirnschnitte mit dem nicht-fluoreszierenden Eindeckmedium *ImmuMount* (Thermo Fisher Scientific, Artikelnummer: 9990402) eingedeckelt, einen Tag im Dunkeln bei 4 °C getrocknet und dann unter dem Mikroskop Olympus CKX4 mit Objektiven in 4-, 10-, 40- und 100-facher Vergrößerung beurteilt. Die Bilddokumentation erfolgte mit der Kamera Nikon DS-Fi2 mit einer Sekunde Belichtungszeit und einer Lichtempfindlichkeit von 100 dB (Gain).

Die Hirnschnitte wurden (i) nach der Fluoreszenzstärke ausgewertet, die in die vier Stufen *0=negativ*, *1=schwach*, *2=mäßig* und *3=stark* unterteilt wurde (Abbildung 1, eine entsprechende Einteilung ist 2019 von unserer Forschungsgruppe veröffentlicht worden [59]); (ii) nach dem Fluoreszenzmuster mit Fokus auf Zerebellum und Hippocampus. Zusätzlich wurden andere Hirnregionen wie Thalamus, Basalganglien und Kortex hinsichtlich auffälliger Bindemuster beurteilt.

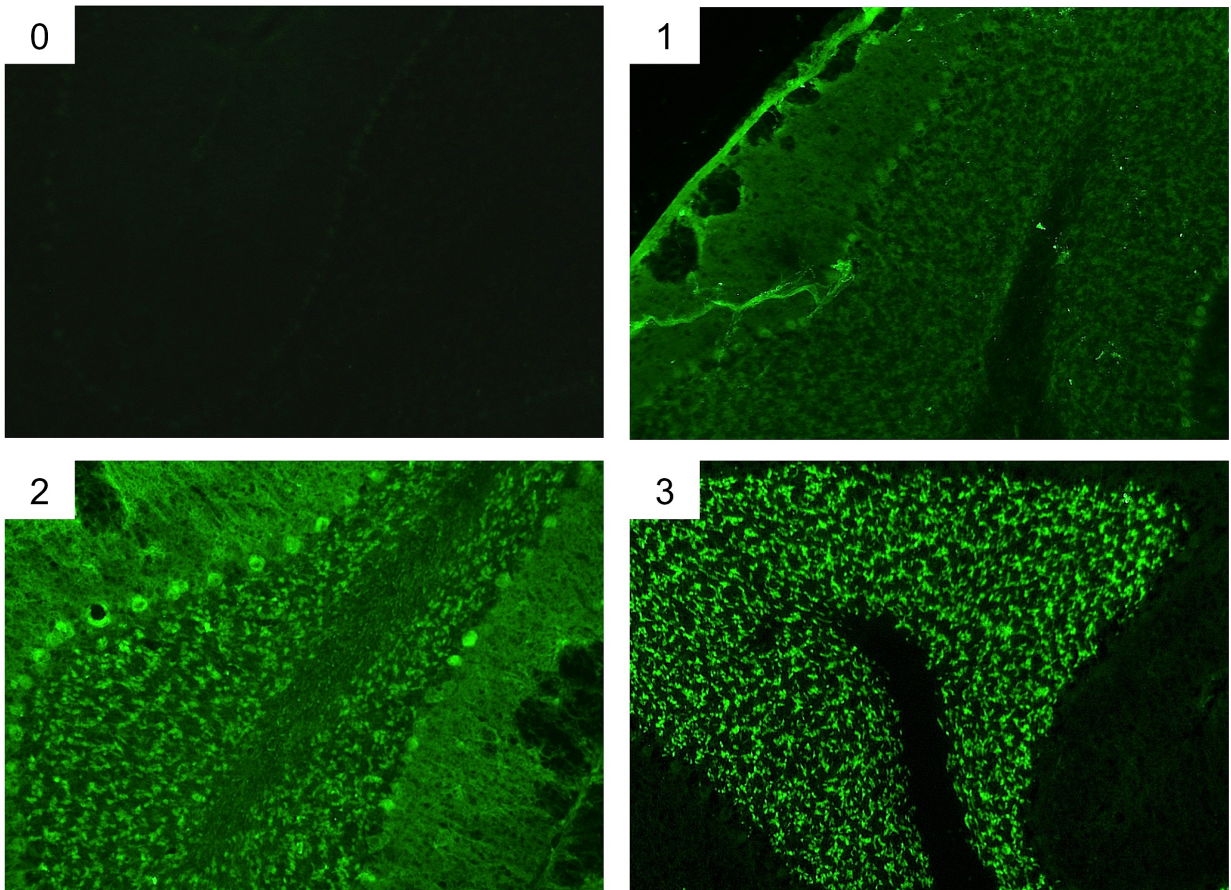


Abbildung 1: Semiquantitative Einteilung der Fluoreszenzintensitäten in vier Stufen 0 bis 3
Die Abbildungen zeigen Ausschnitte von Färbungen unfixierter Kleinhirnschnitte, vergrößert mit einem 10x-Objektiv. Als Referenzproben dienen hier für (0) monoklonale Negativantikörper ohne Bindung an neuronale Strukturen, (1) das Serum einer gesunden 25-Jährigen, (2) das Serum einer NMDAR-Enzephalitispatientin, (3) monoklonale Antikörper gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors.

4.4 Kommerzieller CBA und kommerzieller IHC-Assay

Alle Proben wurden pseudonymisiert und hinsichtlich Studien- und Kontrollserum verblindet. Im Routinelabor für klinisch-immunologische Diagnostik wurden die Proben unter Leitung von Prof. Dr. med. Winfried Stöcker in Kooperation mit der EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG mittels zellbasiertem Assay (CBA) sowie Immunhistochemie (IHC) auf Ratten-Hippocampus und Affen-Kleinhirn auf 32 neuronale Antikörper getestet. Zu den getesteten Antikörpern gehören 17 neuronale Oberflächenantikörper: AMPAR1+2, AQP4, Caspr2, D2R, DNER, DPPX, Flotillin, GABA_A receptor, GABA_BR, GlyR, IgLON5, Lgi1, metabotroper Glutamatrezeptor 1 (mGluR1), mGluR5, MOG, Neurexin-3a, NMDAR/NR1.

Sieben Antikörper, die Teil der Literaturrecherche sind, wurden in die Routinediagnostik nicht einbezogen. Die klinische Relevanz von VGKC-Antikörpern ist seit der Entdeckung der spezifischen Antigene Caspr2 und Lgi1 umstritten. Aktueller Literatur zufolge scheinen VGKC-Antikörper alleine keinen Hinweis auf eine zugrundeliegende autoimmune Neuroinflammation zu liefern [71]. Ebenso ist die klinische Bedeutung von AMPAR3, NMDAR/NR2 und Neurofascin-Antikörpern unklar, sodass diese ebenfalls nicht Teil des Routinepanels waren. Die seltenen und erst 2015 beschriebenen PRG5-Antikörper waren ebenfalls nicht im Routinediagnostikpanel verfügbar gewesen. Dagegen sind Acetylcholinrezeptor-Antikörper bereits seit Jahrzehnten für die Pathogenese der Myasthenia gravis gut charakterisiert. Aufgrund der rein peripheren Wirkung an der motorischen Endplatte, werden diese einem anderen Bereich der Neurologie zugeordnet und spielen für die Fragestellung der Beeinflussung der Hirnentwicklung der Ungeborenen, mit später resultierenden neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen der Nachkommen, keine Rolle und wurden deshalb für die Kohorte nicht untersucht.

Für eine vergleichende Erkenntnis und mögliche Interferenz bei gleichzeitigem Vorliegen mehrerer neuronaler Antikörper wurde zusätzlich auf 15 Antikörper gegen intrazelluläre Antigene getestet: Amphiphysin, CV2, ERC1, GAD65, GFAP, Homer-3, Hu, ITPR1, Ma2, Neurochondrin, Recoverin, RhoGTPase, Ri, Yo und ZIC4.

Die Antikörpertests erfolgten auf industriell hergestellten Biochips, die entweder unfixiertes Ratten- bzw. Affenhirngewebe oder aceton- oder formalinfixierte monospezifische Zellen enthalten. Die Inkubation sowohl mit dem Erst- als auch mit dem fluoreszierenden Zweitantikörper erfolgte bei Raumtemperatur über 30 Minuten. Als Schwellenwert einer positiven Probe wurde für die meisten Antikörper ein Titer von 1:10 festgelegt. Bei folgenden vier Antikörpern wurde ein höherer Schwellenwert von 1:100 angesetzt: ITPR1, Homer-3, Neurochondrin, Neurexin-3a. Der Antikörpertiter ergab sich dabei aus der Serumverdünnung und der resultierenden Fluoreszenzstärke. Da diese Testungen in einem externen Labor und

nicht selbst durchgeführt wurden, wird für weitere Details auf das Labor verwiesen: Prof. Dr. med. Winfried Stöcker, Klinisch-immunologisches Labor, Seekamp 31, D-23560 Lübeck, in Kooperation mit: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Seekamp 31, 23560 Lübeck.

4.5 FACS-Assay

123 MPE-Seren sowie 107 Seren von Kontrollmüttern wurden mittels Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Zellen (kurz FACS für fluorescence-activated cell sorting) auf Antikörper gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors analysiert.

Als interne Kontrollen dienten (i) in unserem Labor hergestellte monoklonale Antikörper gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NR1-AK), (ii) monoklonale Antikörper ohne Bindung an neuronale Strukturen (neg AK), (iii) der fluoreszierende Zweitantikörper alleine, (iv-v) Seren zweier Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis, sowie (vi) ein Serum der MPE.

Der Assay wurde in unserem Labor bereits für monoklonale Antikörper und Liquorproben etabliert [42][56] und anhand dieser Kohorte erstmals für humane Seren durchgeführt.

Mit einem NR1-EYFP (enhanced yellow fluorescent protein)-Plasmid transfizierte HEK293T-Zellen sowie Wildtyp HEK293T-Zellen [56] wurden nach dem Waschen in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, Carl Roth) mit 0,05 % Trypsin-EDTA phenol red (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Artikelnummer 25300-054) abgelöst, erneut in PBS gewaschen, für 4 Minuten bei 4 °C mit 1700 rpm in der Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 Mikrozentrifuge (Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert, vorsichtig abgesaugt und erneut in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zellzählung in der Neubauerzählkammer, sodass eine Suspension mit mindestens 1.000 Zellen pro μl erreicht wurde. Je 100 μl dieser Zellsuspension wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Thermo Fisher Scientific, Artikelnummer 15041) pipettiert und diese mit 1700 rpm bei 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert. Zur Herstellung der Erstantikörperlösung wurden die Seren 1:200 in einem FACS-Puffer (2 % sterilisiertes fetales Kälberserum (FBS superior, Biochrom, Artikelnummer S0615) in PBS) verdünnt und davon je 100 μl in die Wells pipettiert und für 45 Minuten inkubiert. Für die monoklonalen Erstantikörper als interne Kontrollen wurden 100 μl einer 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lösung in die Wells pipettiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (mit 1700 rpm bei 4 °C für 4 Minuten), mit 150 μl FACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Zweitantikörper *Ziege anti-Human IgG Alexa Fluor 647* (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Artikelnummer: A-21445) 1:400 in FACS-Puffer verdünnt, zu den Wells hinzugefügt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wurden die Färbungen in 200 μl FACS-Puffer in FACS-Röhrchen transferiert und innerhalb von zwei Stunden gemessen. Die Seren der Stu-

diengruppen wurden einmalig gemessen. Die angegebenen Werte für die internen Kontrollen stellen den Mittelwert aus drei Messungen dar.

4.6 Statistik und Software

Zur Beurteilung der statistischen Aussagekraft wurden der Zweistichproben t-Test für unverbundene Stichproben mit dem Levene-Test zur Beurteilung der Varianzgleichheit sowie bivariate Korrelationsanalysen nach Pearson durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software *IBM SPSS Statistics Version 26*.

Des weiteren wurde folgende Software verwendet: *Microsoft Office 2008 für Mac Version 12.3.1* für die Datenauswertung, die Erstellung von Schaubildern sowie des Manuskripts, *Texmaker Version 4.4.1* für die Erstellung des Manuskripts, *Origin 2019b Version 9.6.5.169* für die Erstellung der Graphen, *FlowJo Version 10.7.1* für die Auswertung der Primärdaten des FACS-Assays.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche zur Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper in Kontrollgruppen

5.1.1 Anzahl der verfügbaren Studien und Antikörpertests

Methodik und Ergebnisse der systematischen Literaturrecherche zur Prävalenz neuronaler Antikörper bei Kontrollen sind bereits Gegenstand einer eigenen Veröffentlichung [52].

Gemäss den oben genannten Einschlusskriterien wurden 309 Artikel zwischen den Jahren 1974 und 2016 berücksichtigt. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die insgesamt 743.299 durchgeführten Antikörpertests.

Allerdings standen nur für 133.446 Probanden Informationen für die Einteilung in die klinischen Kohorten bereit, sodass der überwiegende Anteil der Tests aus der Analyse ausgeschlossen wurde. Demnach wurden 115.005 Tests auf einen der 22 Oberflächenantikörper aus Serum oder Liquorproben von Kontrollen durchgeführt, 30.485 davon von Gesunden und 84.520 von Kontrollprobanden mit definierter anderer Erkrankung. Für die Gruppe der Patienten waren es 18.441 Antikörpertests (Abbildung 2). Die Tests umfassten sowohl Serum als auch Liquorproben und einige wurden nicht genauer spezifiziert. Da Liquorproben aufwändiger zu gewinnen und eher rar sind, kann im Allgemeinen bei fehlender Spezifizierung von Serummaterial ausgegangen werden, dennoch wurden diese separat in der Analyse berücksichtigt.

Zieht man weiter diejenigen Tests ab, (i) denen Assays zugrundeliegen, die sich nicht als Standard für den jeweiligen Antikörper etabliert haben und (ii) jene, für die kein Schwellenwert für positive versus negative Proben festgelegt wurde, welches überwiegend bei ELISA-Messungen der Fall war, so blieben insgesamt 96.280 Antikörpertests bei Kontrollen und 8.895 bei Patienten. Weniger als ein Drittel der Kontrollproben stammen von Gesunden. 99.9 % (n=26.423) der Proben gesunder Kontrollen waren Serumproben. Auch für die Kontrollgruppe Erkrankter gab es überwiegend Daten zur Antikörperprävalenz in Seren. Von 69.850 Proben waren 96 % (n=67.069) Serumproben und nur 4% eindeutig als Liquor (n=2.781) ausgeschrieben. Betrachtet man die Proben von psychiatrisch Erkrankten, lagen hier, ähnlich wie bei gesunden Kontrollen, fast ausschließlich Serumproben vor (98%). Auch für Patienten waren nur weniger als 10 % Liquor-Proben (n=878, 9,9 %) (Abbildung 2).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Zahlen der Tests, inklusive Nichtstandardmethoden. Über ein Drittel der eingeschlossenen Artikel (43 %) und 24 % (n=31.779) aller Proben fielen auf die zwei Antikörper Anti-AQP4 und Anti-MOG, die beide zu dem großen Forschungsfeld der Multiplen Sklerose gehören (Tabelle 2). Für MOG-Antikörper fanden sich entsprechend auch die meisten Antikörpertests bei Gesunden, nämlich n=3.630 aus Seren

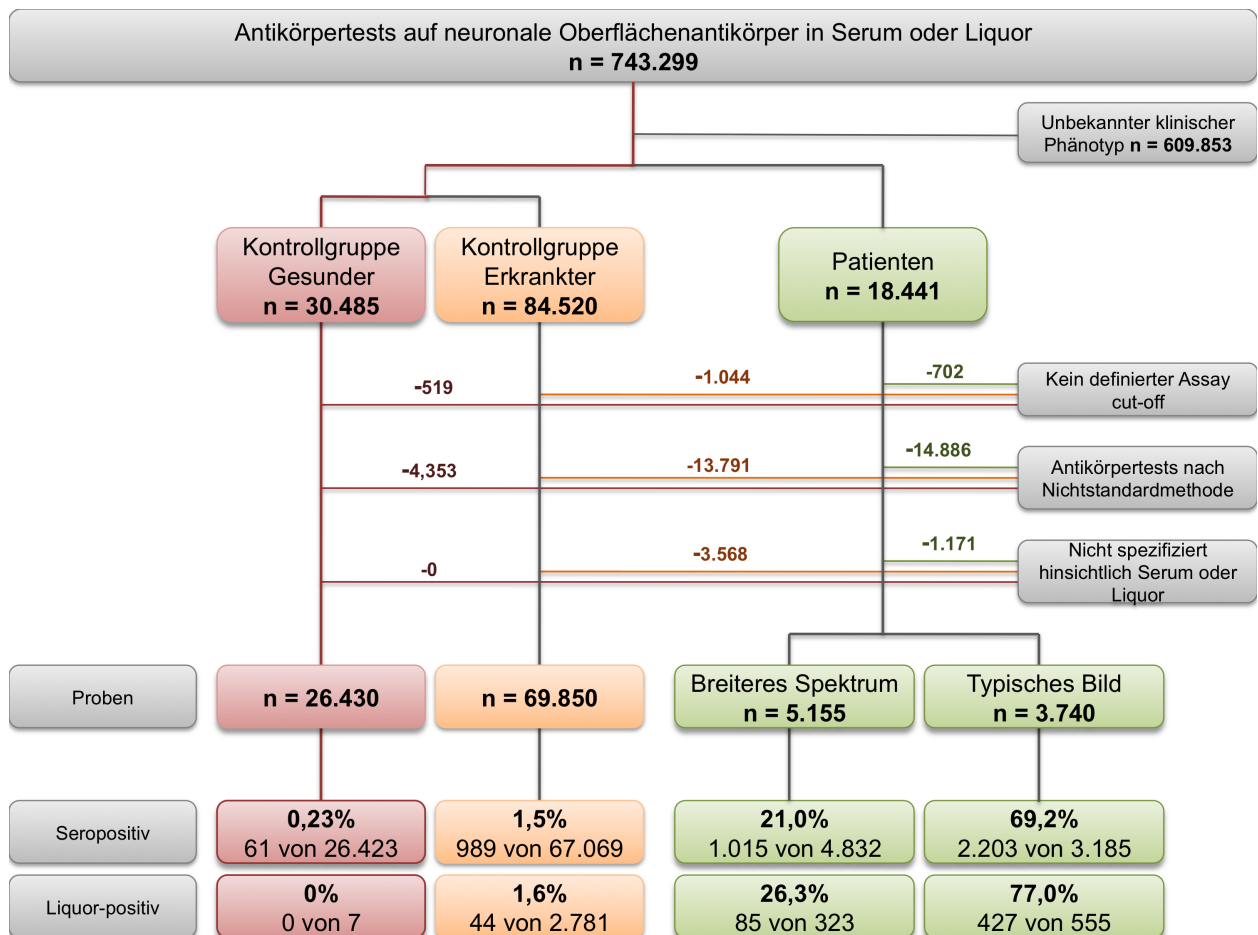


Abbildung 2: Anzahl der in der Literatur verfügbaren Antikörpertests für neuronale Oberflächenantikörper bei verschiedenen Kohorten

Proben von Probanden unbekanntes Phänotyps stammen meist aus Studien von Laboren, die Daten über alle in einem bestimmten Zeitraum zur Testung eingesendeten Proben veröffentlichten. „Patienten“ werden analog Tabelle 1 definiert. Die unten stehenden Zahlen beziehen sich auf Tests von explizit in Serum oder Liquor klassifizierten Proben nach Standardmethode, welches meist CBAs sind. Bei 2.265 Tests wurde von den Autoren nicht festgelegt, welche Proben als positiv gelten (Tests ohne Assay cut-off). CBA: Zellbasierter Assay. Mit freundlicher Genehmigung von *Wolters Kluwer* darf diese Übersetzung des bereits auf Englisch veröffentlichten [52] Schaubildes gezeigt werden.

und n=28 aus Liquores. Den kleinsten Datensatz zu gesunden Kontrollen gab es für Neurexin-3a-Antikörper (n=21) aus nur einer Studie. Für IgLON5 lagen keine Testungen von Gesunden vor. Die meisten Proben aus der Kontrollgruppe Erkrankter gab es für NMDAR/NR1 (n=10.352) und für AQP4-Antikörper (n=9.401), am wenigsten für Neurexin-3a mit nur 179 Proben. Die Spanne der Patientenproben reichte von n=3 für mGluR5 bis n=5.184 für AQP4-Antikörper (Tabelle 2).

Antigen	Studien	Gesunde Kontrollen			Kontrollen mit Erkrankung			Patienten		
		Serum	Liquor	n.s.	Serum	Liquor	n.s.	Serum	Liquor	n.s.
AMPA1+2	28	2.172	—	—	5.245	113	252	22	22	129
AMPA3	9	399	—	—	1.149	-	- 123	-	-	-
AQP4	82	3.065	—	—	8.864	489	48	4.988	135	61
Caspr2	37	2.238	—	—	6.640	28	14	405	—	147
D2R	13	232	—	—	868	13	14	81	—	—
DNER	6	1.776	—	—	3.550	—	—	55 2	—	—
DPPX	12	1.753	—	—	3.465	12	464	118	3	—
GABAaR	12	285	—	—	1.660	203	589	276	160	57
GABAbR	23	1.836	—	—	4.768	153	141	91	15	—
GlyR	23	1.960	—	—	5.688	135	368	359	86	45
IgLON5	3	—	—	—	—	—	298	10	10	—
Lgi1	36	2.206	—	—	6.271	28	14	344	—	153
mGluR5	10	1,703	—	—	3.460	1	128	2	1	—
MOG	52	3.630	28	—	4.934	328	50	4.407	643	109
nAChR(m)	25	877	—	—	3,687	10	—	819	—	—
nAChR(g)	15	1.073	—	—	2.227	10	—	306	—	—
Neurexin-3a	1	21	—	—	—	—	179	5	5	—
Neurofascin	12	433	—	—	905	—	—	2.114	2	—
NMDAR/NR1	64	3.204	7	—	8.249	1.564	539	518	336	334
NMDAR/NR2	11	124	—	—	905	86	133	259	53	—
PRG5	1	97	—	—	206	—	—	49	1	—
VGKC	44	1.366	—	—	5.034	226	115	372	29	180
Gesamt	309	30.450	35	—	77.775	3.399	3.346	15.723	1.503	1.215

Tabelle 2: Anzahl der Studien und Testungen pro Antikörper

Die Anzahl der Antikörpertests umfassen hier sowohl Standard- als auch Nichtstandardmethoden. n.s.: nicht spezifiziert hinsichtlich Serum oder Liquor. Mit freundlicher Genehmigung von *Wolters Kluwer* darf diese Übersetzung der bereits auf Englisch veröffentlichten [52] Tabelle gezeigt werden.

5.1.2 Verschiedene Testmethoden

Insbesondere für die länger bekannten Antikörper wurden anfangs viele unterschiedliche Assays angewendet, was verdeutlicht, dass es zunächst noch keinen etablierten Standard gab. So wurden die vor 2008 erstbeschriebenen Antikörper gegen NMDAR/NR1, AQP4 and MOG mit jeweils über fünf verschiedenen Methoden getestet, die im klinischen Alltag heute keine Rolle mehr spielen: *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA), Westernblots (WB), Radioimmunoassays (RIA) und Fluoreszenzimmunoprecipitation Assays (FIPA) (Tabelle 3). Demgegenüber stehen die Verfahren IHC, FACS und CBA, bei denen die Struktur der Antigenepitope erhalten bleibt und damit die Antikörperbindung in vivo besser abgebildet werden kann. Zum Beispiel konnte für MOG-Antikörper gezeigt werden, dass die

Bindung an MOG ohne erhaltene Konformation, wie bei Westernblot oder ELISA-Verfahren, für demyelinisierende Erkrankungen nicht spezifisch ist und mit den Ergebnissen aus CBA oder FACS mit erhaltener MOG-Konformation nicht korreliert [47].

CBA sind aufgrund der besseren Sensitivität und der Spezifität für ein bestimmtes Antigen sowie der inzwischen kommerziellen Herstellung dieser Testsysteme zum Standard geworden [13][50][74]. So sind die Assays für kürzlich entdeckte Antikörper, zum Beispiel IgLON5, PRG5 und Neurexin-3a in der Regel auf CBAs beschränkt (Tabelle 3). Für AQP4-Antikörper sind Testungen mittels FACS zwar weiterhin gängig, jedoch ist einem Review zufolge die Sensitivität mit 62,3 % vergleichbar mit derjenigen von ELISAs und liegt hinter CBAs zurück (Sensitivität 76,5 %) [64]. Die Spezifität des FACS Assays ist dem gleichen Artikel zufolge mit 99,1 % ähnlich hoch, wie die der CBAs mit 99,8 %. In dieser Analyse lag sie zwischen CBAs und anderen Methoden (Tabelle 3). Obwohl die IHC als Screeningmethode weiterhin praktische Bedeutung hat und insbesondere für die Entdeckung noch unbekannter Antikörper wichtig ist, ist sie aufgrund der geringen Spezifität als alleiniges diagnostisches Kriterium zu ungenau und wurde hier zu den Nichtstandardmethoden gezählt.

Eine Ausnahme des CBA-Standards findet sich in der Diagnostik von Antikörpern gegen VGKC und nAChR, deren Standardnachweismethode RIAs sind.

Für den Vergleich der Testmethoden wurden nur Serumproben berücksichtigt, da die Anzahl der Liquordaten für die einzelnen Antikörper sehr unterschiedlich ist und diese aufgrund der insgesamt höheren Spezifität von Liquor den direkten Vergleich verzerren würde. Insgesamt waren 1,1 % der Kontrollseren mit der Standardmethode positiv, was einer richtig-negativen Rate, beziehungsweise Spezifität, von 98,9 % entspricht. Im FACS-Assay lag die Rate bei 2,3 % falsch-positiven Ergebnissen geringfügig höher. Bei allen anderen Nichtstandardmethoden zusammen lag diese mit 5,8 % deutlich darüber (Tabelle 3).

Einzeln betrachtet, waren für Caspr2-, DNER- und DPPX-Antikörper im CBA etwas mehr Kontrollen seropositiv als mit Nichtstandardmethoden. Das ist auch auf die deutlich geringere Probenanzahl zurückzuführen, die mit Nichtstandardmethoden getestet wurden. So waren zum Beispiel für Caspr2-Antikörper 122 von 8.757 (1,4 %) Kontrollseren im CBA positiv, im Gegensatz zu 17 von 212 (0,9 %), wenn mit anderen Methoden getestet wurde (Tabelle 3).

5.1.3 Seroprävalenz der Antikörper in verschiedenen Kohorten

Die folgenden detaillierten Darstellungen der Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper beziehen sich auf Tests mit der Standardmethode CBA, mit Ausnahme des RIAs für VGKC- und nAChR-Antikörper.

Insgesamt waren nur wenige Kontrollen positiv für neuronale Oberflächenantikörper. Ins-

Antigen	Standardmethode		Andere Methoden						
	Kontrollseren (n)	Positiv (%)	Kontrollseren (n)	Positiv (%)	Kontrollseren (n)	Positiv (%)			
AMPAR1+2	CBA	7.094	6 (0,1)	FACS	—	—	IHC, WB	112	15 (13,4)
AMPAR3		239	0		—	—	ELISA, IHC, WB	964	118 (12,2)
AQP4		7.176	85 (1,2)		2.189	50 (2,3)	ELISA, FIPA, IHC, RIA, WB	7.267	150 (2,1)
Caspr2		8.757	122 (1,4)		—	—	ELISA, FIPA, IHC	217	2 (0,9)
D2R		117	0		260	9 (3,5)	IHC, RIA	220	16 (7,3)
DNER		5.326	2 (0,0)		—	—	IHC	207	0
DPPX		5.238	2 (0,0)		—	—	IHC, WB	139	0
GABAaR		1.895	24 (1,3)		—	—	IHC, WB	63	21 (33,3)
GABAbR		6.404	12 (0,2)		—	—	ELISA, IHC	249	18 (7,2)
GlyR		7.648	81 (1,1)		—	—	—	—	—
IgLON5		—	—		—	—	—	—	—
Lgi1		8.434	100 (1,2)		—	—	ELISA, IHC	61	1 (1,6)
mGluR5		5.163	2 (0,0)		—	—	—	—	—
MOG		5.159	17 (0,3)		785	18 (2,3)	ELISLA, WB, RIA	2.579	297 (11,5)
Neurexin-3a		21	0		—	—	—	—	—
Neurofascin		398	4 (1,0)		216	4 (1,9)	ELISA	1.079	12 (1,1)
NMDAR/NR1		11.058	123 (1,1)		—	—	ELISA, FIPA, IHC, WB	937	45 (4,8)
NMDAR/NR2		104	0		—	—	ELISA, IHC, WB	1.029	148 (14,4)
PRG5		303	0		—	—	—	—	—
nAChR(m)	RIA	4.278	73 (1,7)		—	—	CBA, ELISA, Other	259	31 (12,0)
nAChR(g)		3.114	123 (4,0)		—	—	LIPS	186	9 (4,8)
VGKC		5566	274 (4,9)		—	—	CBA, IHC	460	48 (10,4)
Gesamt		93.492	1.050 (1,1)		3.450	81 (2,4)		16.028	931 (5,8)

Tabelle 3: Vergleich verschiedener Methoden der Antikörpertestung

Die Standardassays CBA und RIA weisen dabei eine geringere Anzahl positiver Kontrollseren auf als FACS-Assays oder andere Methoden. CBA: zellbasierter Assay. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay. FACS: fluorescence-activated cell sorting. FIPA: fluorescence immunoprecipitation assay. IHC: Immunhistochemie. LIPS: luciferase immunoprecipitation system assay. RIA: Radioimmunassay. WB: Westernblot. Eine ähnliche Version dieser Tabelle wurde bereits auf Englisch veröffentlicht [52]. Mit freundlicher Genehmigung von *Wolters Kluwer* darf diese übersetzte Version hier gezeigt werden.

besondere bei gesunden Kontrollen wurden in nur 0,23 % (n=61) der 26.423 serologischen Tests einer der 22 Oberflächenantikörper gefunden. Für neun der Antikörper (AMPAR3, AQP4, DNER, GABAaR, GABAbR, mGluR5, nAChR(m), Neurexin-3a und PRG5) wurden in 8.822 Tests überhaupt keine Antikörper in den Seren Gesunder gefunden. Für die anderen Antikörper wurden jeweils nur vereinzelt positive Seren beschrieben; am häufigsten bei Neurofascin-Antikörpern mit einer positiven Probe von insgesamt 73 Proben aus der gesunden Kontrollgruppe. Die Häufigkeit bei den übrigen Antikörpern lag unter 1 %. Im Durchschnitt wurden 1.201 Seren Gesunder pro Antikörper getestet; die meisten, nämlich 2.238 Seren, für Caspr2-Antikörper, dagegen keine für D2R, IgLON5 und NMDAR/NR2-Antikörper (Tabelle 4).

Seren von psychiatrischen Kontrollen wiesen eine ähnlich niedrige Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper auf, wie Seren von Gesunden: 0,25 % von 28.491 Tests waren hier positiv. Die positiven Ergebnisse waren jedoch vor allem auf die mit RIA getesteten Antikörper

gegen VGKC und die beiden nikotinergen Acetylcholinrezeptoren zurückzuführen, je mit einer Rate über 2 %. Für zehn weitere Antikörper gab es nur vereinzelt positive Ergebnisse mit je unter 1 % der Gesamtuntersuchungen. Ausschließlich negative Ergebnisse erzielten Tests auf AQP4, D2R und NMDAR/NR2-Antikörper. Keine Daten lagen für AMPAR3, GABA_AR, IgLON5, Neurexin-3a, Neurofascin, PRG5 und Synapsin-Antikörper vor (Tabelle 4).

Alle nicht-psychiatrischen Untergruppen der Kontrollgruppe Erkrankter zeigten eine deutlich höhere Antikörperrate mit zusammengenommen 2,38 % (917 positive Ergebnisse von 38.578 Tests). In aufsteigender Reihenfolge fanden sich Oberflächenantikörper bei inflammatorischen AE (0,34 % von 888 Tests), nicht-inflammatorischen ANE (1,76 % von 17.718), nicht-inflammatorischen AE (2,18 % von 6,889) und inflammatorischen ANE (3,46 % von 13.083). Zu erwarten war die höchste Prävalenz bei inflammatorischen neurologischen Erkrankungen, deren Untergruppen sich teilweise mit der Gruppe des breiteren Symptompektrums überschneiden oder zumindest von diesen schwer abzugrenzen sind.

Auffällig dagegen war die relativ hohe Rate positiver Ergebnisse in der Gruppe der nicht-inflammatorischen AE. Diese lag mit 2,18 % über derjenigen der inflammatorischen AE sowie der nicht-inflammatorischen ANE. Die hohe Rate war im Wesentlichen auf maligne Erkrankungen zurückzuführen, die unter nicht-inflammatorischen AE subsumiert sind: 76,7 % der positiven Testergebnisse gingen auf maligne Tumore zurück, obwohl sie nur 41 % der Gesamtgruppe ausmachen. Von 2.308 Tests mit Seren von maligne Erkrankten waren 4,98 % Antikörper-positiv. Aufgrund der allgemeinen inflammatorischen Reaktion, die oftmals auf der Grundlage einer Tumorerkrankung zu finden ist, ließen sich maligne Erkrankungen auch der Gruppe der inflammatorischen AE zuordnen. Jedoch wurden auch in dieser Gruppe deutlich seltener Oberflächenantikörper gefunden als bei malignen Erkrankungen. Der Kern der Aussage bliebe derselbe: Maligne Erkrankungen gingen innerhalb der Kontrollgruppen mit dem höchsten Anteil an zirkulierenden Oberflächenantikörpern einher.

Serum	KG		Psych		AE non-infl		AE infl		ANE non-infl		ANE infl		Typ. Bild		Patienten		Breit. Spektrum	
	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)
AMPAR1+2	2.122	4 (0,2)	3.115	2 (0,1)	—	—	1.473	0	213	0	171	0	10	8 (80,0)	—	—	—	—
AMPA3	116	0	—	—	110	0	—	—	8	0	5	0	—	—	56	9 (16,1)	—	—
AQP4	2.212	0	8	0	250	1 (0,4)	243	1 (0,4)	420	6 (1,4)	4.043	77 (1,9)	1.223	939 (76,8)	1.679	602 (35,9)	—	—
Caspr2	2.238	5 (0,2)	2.941	14 (0,5)	312	2 (0,6)	—	—	1.867	39 (2,1)	1.399	62 (4,4)	96	28 (29,2)	198	12 (6,1)	—	—
D2R	—	—	104	0	—	—	—	—	13	0	—	—	—	—	—	—	—	—
DNER	—	—	2.389	1 (0,0)	128	1 (0,8)	70	0	732	0	231	0	50	50 (100)	5	5 (100)	—	—
DPPX	1.753	1 (0,1)	2.389	1 (0,0)	—	—	—	—	0	253	0	4	4 (100)	114	0	0	—	—
GABAaR	1.816	0	—	—	—	—	—	—	628	14 (2,2)	987	10 (1,0)	1	1 (100)	275	8 (2,9)	—	—
GABAβR	1.816	0	2.841	1 (0,0)	393	7 (1,8)	28	0	1.006	0	320	4 (1,3)	15	12 (80,0)	70	10 (14,3)	—	—
GlyR	1.960	1 (0,1)	2.389	3 (0,1)	65	13 (20,0)	89	0	1.741	22 (1,3)	1.404	42 (3,0)	260	42 (16,2)	99	7 (7,1)	—	—
IgLON5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	10 (100)	—	—	—	—
Lgl1	2.206	1 (0,1)	2.941	1 (0,0)	312	0	—	—	1.600	1 (0,1)	1.375	97 (7,1)	130	81 (62,3)	92	6 (6,5)	—	—
mGluR5	1.703	0	2.493	2 (0,1)	—	—	—	—	927	0	40	0	2	2 (100)	—	—	—	—
MOG	1.818	3 (0,2)	2.392	1 (0,0)	148	3 (2,0)	3	0	779	10 (1,3)	19	0	—	—	1.476	211 (14,3)	—	—
nAChR(m)	801	0	213	5 (2,4)	2.570	34 (1,3)	241	2 (0,8)	115	7 (6,1)	338	25 (7,4)	620	446 (71,9)	—	—	—	—
nAChR(g)	1.000	5 (0,5)	213	6 (2,8)	749	50 (6,7)	60	0	727	37 (5,1)	365	25 (6,9)	—	—	306	43 (14,1)	—	—
Neurexin-3a	21	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5 (100)	—	—	—	—
Neurofascin	73	1 (1,4)	—	—	—	—	—	—	245	0	80	3 (3,8)	—	—	292	69 (23,6)	—	—
NMDAR/NR1	3.065	25 (0,8)	3.630	28 (0,8)	503	2 (0,4)	67	0	2.651	46 (1,7)	1.142	22 (1,9)	413	348 (84,3)	95	28 (29,5)	—	—
NMDAR/NR2	—	—	104	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PRG5	97	0	—	—	—	—	40	0	68	0	98	0	1	1 (100)	48	0	—	—
VGKC	1.366	15 (1,1)	329	7 (2,1)	1.178	37 (3,1)	47	0	1.895	129 (6,8)	771	86 (11,2)	345	226 (65,5)	27	5 (18,5)	—	—
Gesamt	26.423	61 (0,23)	28.419	72 (0,3)	6.889	150 (2,2)	888	3 (0,3)	17.718	311 (1,8)	13.083	453 (3,5)	3.185	2.203 (69,2)	4.823	1.015 (21,0)	—	—

Tabelle 4: Anzahl positiver Serumproben für neuronale Oberflächenantikörper nach Standardmethode

Standardmethode ist CBA, außer RIA für nAChR- und VGKC-Antikörper. AE infl: inflammatorische andere Erkrankungen. AE non-infl: nicht-inflammatorische andere Erkrankungen. ANE infl: inflammatorische andere neurologische Erkrankungen. ANE non-infl: nicht-inflammatorische andere neurologische Erkrankungen. Breit. Spektrum: Breiteres Spektrum. CBA: Zellbasierter Assay. KG: Kontrollgruppe Gesunder. Pos: Positiv. Psych: Psychiatrische Kontrollen. Typ. Bild: Typisches Bild. Zur Definition der Patientengruppen siehe Tabelle 1. Mit freundlicher Genehmigung von *Walters Kluwer* darf diese Übersetzung der bereits auf Englisch veröffentlichten [52] Tabelle gezeigt werden.

Betrachtet man die Ergebnisse für die einzelnen Antikörper, so waren VGKC- und nAChR(g)-Antikörper am häufigsten in der Gruppe der KE (6,48 % respektive 5,89 %). Keine positiven Ergebnisse gab es für sechs von 23 Antikörper: AMPAR1+2, AMPAR3, D2R, DPPX, mGluR5 und PRG5. Keine Daten lagen für die vier Antikörper gegen IgLON5, Neurexin-3a, NMDAR/NR2 und Synapsin vor (Tabelle 4).

Größere Kontrollgruppen wurden für IgLON5 und Neurexin-3a getestet, jedoch ohne Spezifizierung hinsichtlich Serum oder Liquor, weshalb diese nicht in Tabelle 4 aufgeführt sind. Da der überwiegende Anteil der unspezifizierten Proben vermutlich Serumproben waren, seien diese im Folgenden erwähnt: Einer von 298 nichtinflammatorischen ANE war positiv für IgLON5, in 179 Proben aus einer Kontrollgruppe Erkrankter wurde keine positive für Neurexin-3a gefunden.

Im Gegensatz zur geringen Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper in den Kontrollgruppen waren diese im Patientenkollektiv deutlich häufiger: Positiv waren 21 % der 4.832 Tests bei Patienten des breiteren klinischen Spektrums und 69 % der 3.185 Tests bei typisch klinischem Bild (Tabelle 4).

5.1.4 Verfügbare Liquordaten

Die Zielstrukturen der hier diskutierten Oberflächenantikörper und damit der Ort der Pathogenese lagen überwiegend im zentralen Nervensystem. Ausgenommen hiervon sind lediglich Neurofascin und die Nikotinrezeptoren vom muskulären sowie ganglionären Typ. Die Annahme scheint somit plausibel, dass die Antikörperdiagnostik aus Liquor mit höherer Spezifität und Sensitivität einhergeht.

Die Literaturanalyse in dieser Arbeit zeigt insbesondere, dass, bedingt durch die weitaus invasivere Punktion zur Gewinnung von Liquor, kaum Daten zu Kontrollen vorlagen. Zur Gruppe Gesunder berichtete lediglich eine Studie von nur sieben Liquorproben. Im Rahmen der diagnostischen Aufarbeitung von Kopfschmerzen wurden diese auf NMDAR/NR1-Antikörper negativ getestet (Tabelle 5) [21]. Von weiteren 28 Liquorproben aus der gesunden Kontrollgruppe, die ebenfalls aufgrund einer Kopfschmerzanamnese untersucht wurden, war eine positiv für MOG-Antikörper [43]. Diese sind in Tabelle 5 nicht aufgeführt, da die Testung mit ELISA, also einer Nichtstandardmethode, erfolgte.

Etwas mehr Liquordaten - für insgesamt sechs der 23 Antikörper - lagen für Kontrollen mit psychiatrischer Erkrankung vor. Eine von 384 Liquorproben war Antikörper-positiv (für NMDAR/NR1-Antikörper), was einer Häufigkeit von 0,26 % und damit in etwa der Seroprävalenz entspricht. Auch für die übrigen Untergruppen der KE lag der Anteil der positiven Liquores nicht wesentlich unter der bereits geringen Seropositivität. Insgesamt waren 43 der 2.397 (1,79 %) Liquorproben der AE und ANE positiv für AQP4, GlyR, NMDAR/NR1 oder

VGKC-Antikörper. Von diesen 43 positiven Proben stammte der Großteil (n=35) aus der Kontrollgruppe der inflammatorischen neurologischen Erkrankungen. Betrachtet man die Antikörper einzeln, so waren 8,15 % (von 135 Liquores) positiv für GlyR-, 7,69% (von 91 Liquores) für VGKC-, 2,14 % (von 468 Liquores) für AQP4 und 1,08 % (von 1.389 Liquores) für NMDAR/NR1-Antikörper.

Wenn alle Kontrollen zusammen betrachtet werden, lagen der hier durchgeführten Literaturanalyse zufolge Liquordaten für nur 14 der 23 Antikörper vor. Für AMPAR3, DNER, IgLON5, MOG, Neurexin-3a, Neurofascin, NMDAR/NR2, PRG5 und Synapsin waren keine Liquordaten zu Kontrollprobanden verfügbar (Tabelle 5).

Die Rate der positiven Patientenliquores waren vor allem von der Selektion und Größe der Kohorte abhängig. Eine 100 %-ige Sensitivität wurde für die kleinsten Kohorten mit im Mittel nur 4,7 Liquorproben erreicht. Dies galt für DNER, DPPX, GABAbR, Neurexin-3a, Neurofascin und PRG5-Antikörper. Zusammengenommen waren 76,9 % (von 555 Liquores) der Patienten mit typischem klinischen Bild Antikörper-positiv, wohingegen nur 26,3 % (von 323) des breiteren Symptomspektrums positiv waren (Tabelle 5).

Liquor	KG		P psych		AE non-infl		AE infl		ANE non-infl		ANE infl		Typisches Bild		Patienten		Breiteres Spektrum
	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	Proben	Pos (%)	
AMPAR1+2	—	—	96	0	—	—	—	—	12	0	5	0	10	9 (90,0)	—	—	—
AMPAR3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AQP4	—	—	—	—	—	—	—	—	16	0 (2,2)	452	10 (2,2)	65	45 (69,2)	69	33 (47,8)	—
Caspr2	—	—	—	—	—	—	—	—	25	0	3	0	—	—	—	—	—
D2R	—	—	—	—	—	—	—	—	13	0	—	—	—	—	—	—	—
DNER	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2 (100)	—	—	—
DPPX	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12	0	3	3 (100)	—	—	—
GABAaR	—	—	—	—	—	—	—	—	191	0	12	0	1	1 (100)	159	6 (3,8)	—
GABA β R	—	—	96	0	—	—	—	—	12	0	—	—	15	15 (100)	—	—	—
GlyR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	135	11 (8,1)	86	25 (29,1)	—	—	—
IgLON5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	9 (90,0)	—	—	—
Lgt1	—	—	—	—	—	—	—	—	25	0	3	0	—	—	—	—	—
mGluR5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	0	1	0	84	35 (41,7)	—
MOG	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
nAChR(m)	—	—	10	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
nAChR(g)	—	—	10	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Neurexin-3a	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5	5 (100)	—	—	—
Neurofascin	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
NMDAR/NR1	7	0	162	1 (0,6)	157	1 (0,6)	—	—	443	1 (0,2)	789	13 (1,7)	327	297 (90,8)	2	2 (100)	—
NMDAR/NR2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9	9 (100)	—
PRG5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1 (100)	—	—	—
VGKC	—	—	10	0	—	—	—	—	72	6 (8,3)	19	1 (5,3)	29	15 (51,7)	—	—	—
Gesamt	7	0	384	1 (0,3)	157	1 (0,6)	—	—	809	7 (0,8)	1.431	35 (2,5)	555	427 (76,9)	323	85 (26,3)	—

Tabelle 5: Anzahl positiver Liquorproben für neuronale Oberflächenantikörper nach Standardmethode

Standardmethode ist CBA; außer RIA für nAChR- und VGKC-Antikörper. AE infl: inflammatorische andere Erkrankungen. AE non-infl: nicht-inflammatorische andere Erkrankungen. ANE infl: inflammatorische andere neurologische Erkrankungen. ANE non-infl: nicht-inflammatorische andere neurologische Erkrankungen. Breit. Spektrum: Breiteres Spektrum. CBA: Zellbasierter Assay. KG: Kontrollgruppe Gesunder. Pos: Positiv. Psych: Psychiatrische Kontrollen. RIA: Radioimmunoassay. Typ. Bild: Typisches Bild. Zur Definition der Patientengruppen siehe Tabelle 1. Mit freundlicher Genehmigung von *Wolters Kluwer* darf diese Übersetzung der bereits auf Englisch veröffentlichten [52] Tabelle gezeigt werden.

5.1.5 Größe der Kontrollgruppen

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigten eine in relativ kurzem Zeitraum beachtliche Menge an durchgeführten Antikörpertestungen bei Kontrollen. Die Literaturrecherche verdeutlichte jedoch auch, dass in den zahlreichen Veröffentlichungen überwiegend kleine, nicht-systematisch ausgewählte Kontrollgruppen getestet wurden (Abbildung 3).

So gab es nur eine einzige Studie, die eine große Gruppe gesunder Kontrollen einschloss und auf elf der hier berücksichtigten Antikörper testete [16]. Die Ergebnisse dieser Studie bestimmen demnach wesentlich die Gesamtanalyse zur Antikörperprävalenz. Die Zahlen für mGluR5-Antikörper bei Gesunden entstammen ausschließlich dieser Studie von Dahm et al. [16]. Die Kontrollgruppe Gesunder bestand dabei aus 1.703 Blutspenderseren, die auf Antikörper gegen AMPAR1+2, AQP4, DNER, DPPX, GABA_BR, GlyR, mGluR5, MOG, NMDAR/NR1, Caspr2 und Lgi1 getestet wurden. Am häufigsten wurden NMDAR/NR1-Antikörper gefunden, die mit 1,2 % (20 von 1.703 Seren) etwas häufiger als in der Gesamtanalyse waren, aber möglicherweise repräsentativer sind, da die meisten anderen Studien von nur kleinen Gruppen mit ausschließlich negativen Resultaten berichteten. Die zweitgrößte Kohorte umfasste 274 Seren Gesunder, die alle negativ für NMDAR/NR1-Antikörper getestet wurden [10]. Kontrollgruppen mit über 100 Probanden wurden nur für acht der 23 Antikörper beschrieben (Abbildung 3).

Neben Gesunden wurden bei Dahm et al. auch Kontrollen mit psychiatrischen (n=1.804) und anderen nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (n=729) auf die oben genannten elf Antikörper getestet, darunter befanden sich je nach Antikörper 0 - 1,34 % positive Ergebnisse [16]. Bei psychiatrisch erkrankten Kontrollprobanden waren ebenfalls NMDAR-/NR1-Antikörper mit 0,9 % am häufigsten. 70 der insgesamt 72 positiven Testergebnisse innerhalb der psychiatrischen Kontrollgruppe entstammen diesem Artikel, obwohl dieser nur 70 % der in dieser Kohorte durchgeführten Antikörpertests beschrieb.

Für die Kontrollgruppe Erkrankter gab es nur zwei weitere Studien, die von mehr als 1.000 Kontrollproben berichteten; wobei beide auf nur einen Antikörper beschränkt waren. Dabei waren 0,5 % von 2.000 über 60-jährigen mit nicht näher definierter Erkrankung positiv für nAChR(m)-Antikörper [78]. Von 1.040 Kontrollen mit Multipler Sklerose (MS) hatten 0,3 % AQP4-Antikörper (wobei die MS-Diagnose bei zwei der drei positiven Patienten zu NMOSD korrigiert wurde) [63]. Eine Kohorte mit knapp unter 1.000 Proben sei hier zudem erwähnt: 1,4 % von 925 Kontrollen mit akuten psychiatrischen Symptomen waren seropositiv: n=7 für Caspr2, n=5 für NMDAR/NR1 und n=1 für AMPAR1+2-Antikörper [68]. Alle weiteren Studien mit den größten Kohorten pro Antikörper umfassten deutlich weniger Probanden mit durchschnittlich 401 eingeschlossenen Proben, von n=98 für PRG5- [12] bis n=741 für GlyR-Antikörper [11] reichend. Die Positivrate mit im Mittel 0,9 % unterschied sich nicht

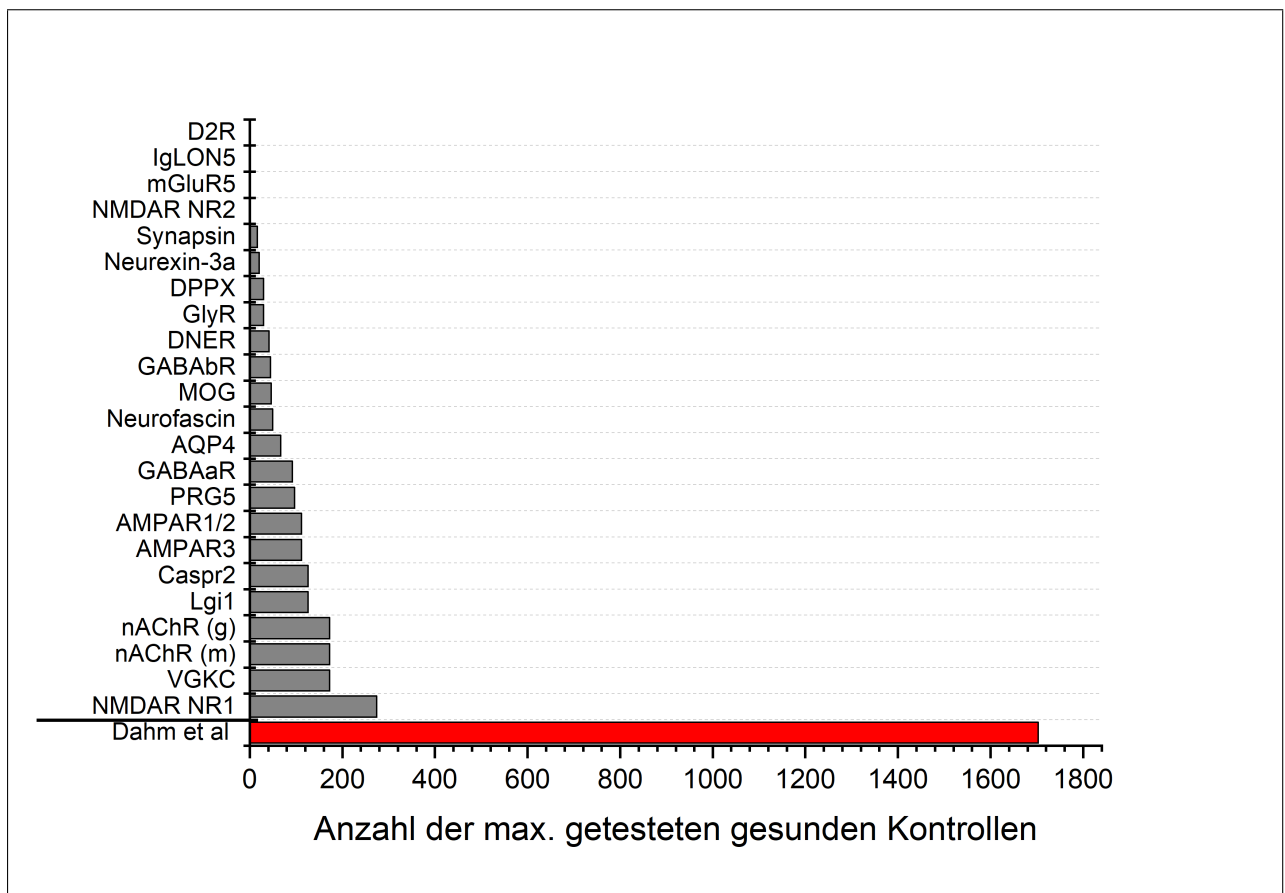


Abbildung 3: Größte Kohorte Gesunder Kontrollen pro Antikörper

Verglichen mit Dahm et al. [16] wurden in den anderen Studien viel kleinere Kohorten Gesunder getestet: die zweitgrößte Kohorte Gesunder existiert für NMDAR/NR1-Antikörpertests mit 274 Probanden [10]. Alle anderen umfassten unter 200 Gesunde. Diese Abbildung wurde bereits in eigener Publikation veröffentlicht [52] und darf mit freundlicher Genehmigung von *Wolters Kluwer* gezeigt werden.

wesentlich von der Gesamtanalyse (Abbildung 4).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper bei Kontrollen sowohl in dem dominierenden Artikel von Dahm et al. [16] als auch in der Gesamtanalyse unter 5 % bewegt.

5.2 Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper bei Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung

5.2.1 Klinische Daten

Die klinischen Daten dieser Kohorte sind bereits Gegenstand einer Veröffentlichung [42].

Eingeschlossen wurden 123 Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungs-

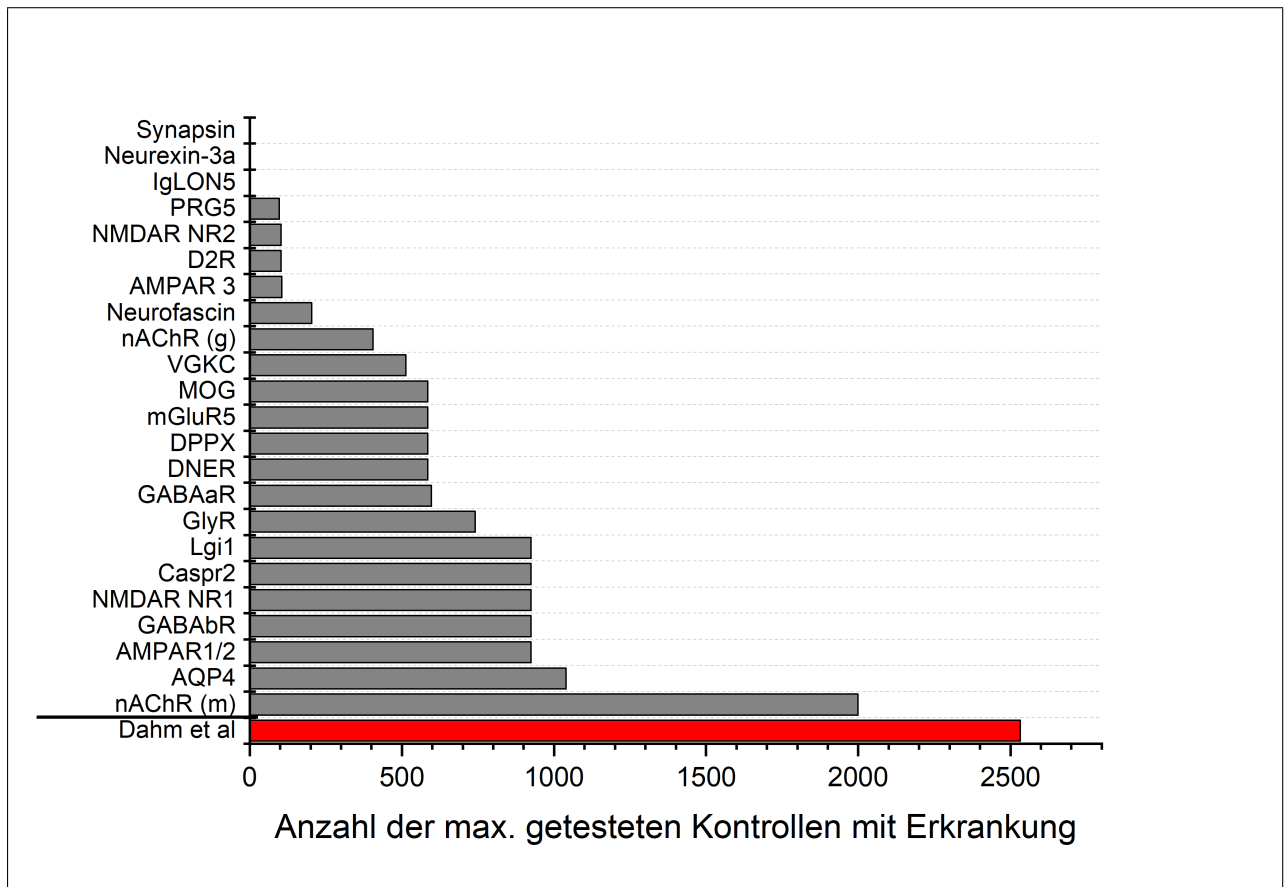


Abbildung 4: Größte Kohorte der Kontrollgruppe Erkrankter pro Antikörper

Für Kontrollen mit Erkrankung (KE) fällt die Studie von Dahm et al. [16] etwas weniger ins Gewicht, als für Gesunde, jedoch stellen sie auch für die KE mit über 2.500 Probanden die größte Kohorte dar.

störung, 110 Kontrollmütter von Kindern ohne psychiatrische Diagnose sowie 21 weibliche Kontrollen ohne Kinder. Das mediane Alter der Studienmütter lag zum Zeitpunkt der Blutentnahme bei 41 Jahren, das aller Kontrollen bei 42 Jahren; wobei der Altersmedian der Kontrollmütter zwei Jahre darüber und derjenige der Kontrollen ohne Kinder mit 25 Jahren deutlich darunter lag. 16 (13 %) der MPE machten keine Angabe zu ihrem eigenen Geburtsdatum und 30 (27 %) der Kontrollmütter gaben das Geburtsdatum ihres Kindes nicht an. Die Schwangerschaft der MPE lag drei bis 17 Jahre zurück. Entsprechend lag das mediane Alter der Kinder der KJP Friedrichshain bei 14 Jahren, das mediane Alter der Kontrollkinder lag vergleichbar bei 15 Jahren, jedoch mit einer größeren Spannweite von ein bis 36 Jahren (Tabelle 6).

	MPE (n=123)	KM (n=110)	KW (n=21)
Medianes Alter Mutter (Jahr, Spannweite)	41 (22-57)	44 (21-60)	25 (22-34)
Mittleres Alter Kind/ 1. Kind der KM (Jahr, Spannweite)	14 (3-19)	15 (1-36)	—
Geschlecht Kind	48f, 76m	—	—

Tabelle 6: Klinische Daten

F: Weiblich. KM: Kontrollmutter. KW: Weibliche Kontrolle ohne Kind. M: Männlich. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung

Die Diagnosen der Kinder wurden nach Abschluss der Probensammlung dem Krankenhausinformationssystem des Vivantes Klinikum am Friedrichshain (Berlin) entnommen und entsprechen der deutschen Bearbeitung der 10. Revision der *Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme* (ICD-10-GM). Berücksichtigt wurde jeweils die Hauptdiagnose der Achse 1 des multiaxialen Klassifikationsschemas kinder- und jugendpsychiatrischer Diagnosen.

Eine der MPE hatte zwei Kinder in der psychiatrischen Klinik, deren Diagnosen beide in die Analyse gingen. Unter den Kindern der Studienteilnehmerinnen waren 56 (45,2 %) Mädchen und 68 Jungen. Am häufigsten war die Diagnose der hyperkinetischen Störung, worunter auch das ADHS fällt, die bei 25,8 % der Kinder vorlag. Darunter waren mit 87,5 % überwiegend Jungen. Bei knapp einem Fünftel (19,4 %) der Kinder wurde eine depressive Störung diagnostiziert. An dritter Stelle standen Störungen des Sozialverhaltens mit der Diagnoseziffer F91-92 bei 17 % der Kinder (Tabelle 7).

Die Verteilung der kinder- und jugendpsychiatrischen Diagnosen spiegelt in erster Linie den Versorgungsschwerpunkt des Klinikums, das Einzugsgebiet der angrenzenden Berliner Stadtteile sowie eine Mutter-Kind-Beziehung, die mit mütterlicher Präsenz in der Klinik einherging, wider. Die Verteilung deckt sich dabei weitgehend mit aktuellen Daten zur Prävalenz kinder- und jugendpsychiatrischer Erkrankungen in Deutschland. Der fragebogenbasierten KiGGS-Studie zufolge machen Hyperaktivitätsstörungen, die weitaus häufigste Diagnose un-

seres Kollektivs, auch den Großteil der psychischen Probleme bei Kindern in ganz Deutschland aus. Hyperaktivitätsstörungen treffen überwiegend Jungen, wenn auch mit weniger deutlicher Mehrheit wie im eigenen Kollektiv: 6,5 % aller Jungen und 2,3 % aller Mädchen in Deutschland [27]. Alle zwischen 2009 und 2017 kassenärztlich gestellten kinder- und jugendpsychiatrischen Diagnosen wurden ausgewertet, wobei die hyperkinetische Störungen nach F90 mit 11 % deutschlandweit die häufigste unter der Achse 1 subsumierten Diagnosen und die zweithäufigste aller F-Diagnosen ist [72]. Am häufigsten wurde eine Entwicklungsstörung nach F8 diagnostiziert, die jedoch nicht der Achse 1 (klinisch-psychiatrisches Syndrom) zuzuordnen ist. F80, eine *Entwicklungsstörung des Sprechens oder der Sprache*, ist dabei mit 25 % die häufigste Diagnose überhaupt und F82, eine *Entwicklungsstörung der motorischen Funktion* mit 7,9 % die dritthäufigste [72]. In unserem Kollektiv erhielten 21 % aller Kinder unter der zweiten Achse, worunter *umschriebene Entwicklungsrückstände* kodiert werden, eine Diagnose nach F8 (Tabelle 7).

Kinder- und jugendpsychiatrische Diagnose (ICD-10-GM)	Gesamt	weiblich	männlich
F12 Psychische und Verhaltensstörungen durch Cannabinoide	2	1	1
F20 Schizophrenie	1	0	1
F23 Akute vorübergehende psychotische Störungen	1	1	0
F32-33 Depressive Episode und rezidivierende depressive Störung	24	18	6
F40 Phobische Störungen	5	3	2
F41 Andere Angststörungen	2	1	1
F42 Zwangsstörung	4	1	3
F43 Reaktionen auf schwere Belastungen und Anpassungsstörungen	7	3	4
F45 Somatoforme Störungen	1	0	1
F50 Essstörungen	1	1	0
F60 Spezifische Persönlichkeitsstörungen	1	1	0
F64 Störungen der Geschlechtsidentität	1	1	0
F71 Mittelgradige Intelligenzminderung	1	0	1
F84 Tief greifende Entwicklungsstörungen	8	0	8
F90 Hyperkinetische Störungen	32	4	28
F91 Störungen des Sozialverhaltens	8	3	5
F92 Kombinierte Störung des Sozialverhaltens und der Emotionen	13	7	6
F93 Emotionale Störungen des Kindesalters	7	3	4
F94 Störungen sozialer Funktionen mit Beginn in der Kindheit und Jugend	3	0	3
F98 Andere Verhaltens- und emotionale Störungen mit Beginn in der Kindheit und Jugend	2	0	2

Tabelle 7: Psychiatrische Diagnosen der Kinder der MPE

Die Diagnosen entsprechen dem ICD-10-GM (die deutsche Bearbeitung der 10. Revision der *Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme*). Unter dem Buchstaben „F“ sind psychische und Verhaltensstörungen für Erwachsene und Kinder subsumiert. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung. Diese Tabelle wurde bereits auf Englisch veröffentlicht [42]. Sie darf mit freundlicher Genehmigung von *John Wiley and Sons* gezeigt werden.

5.2.2 Immunhistochemie

80 MPE- und KM-Seren wurden immunhistochemisch auf unfixierten Maushirnschnitten untersucht. Unfixiertes Gewebe hat gegenüber fixiertem Gewebe den Vorteil, dass die Strukturen der Oberflächenepitope als Bindestelle der gesuchten Antikörper weitestgehend intakt

bleiben [79]. Das in vivo Bindeverhalten kann somit besser dargestellt werden, als mit fixiertem Gewebe, bei welchem die lipidhaltige Zellmembran zerstört ist.

Das typische Bindemuster von NMDAR/NR1-Antikörpern konnte mit dem unfixierten Assay gut dargestellt werden. Abbildung 5 zeigt das Muster des monoklonalen Antikörpers gegen die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (NR1-AK). Im Kleinhirn zeigte sich eine starke Bindung an die dicht gelagerten, glutamatergen Körnerzellen des Stratum granulosum. Die GABAergen Purkinjezellen sowie die zellarme Molekularschicht blieben ausgespart (Abbildung 5a-b). Das stärkste Fluoreszenzsignal fand sich im Hippocampus. Hier wurden insbesondere die faserreichen Anteile des Stratum moleculare des Gyrus dentatus sowie des Stratum oriens und radiatum des Ammonshorns betont. Dagegen bestand weder eine Bindung an die Körnerzellen des Gyrus dentatus, noch an die Pyramidenzellen des Ammonshorns (Abbildung 5c-d). Auch im Thalamus zeigte sich, wenn auch weniger intensiv, die charakteristische Bindung an Strukturen der Zelloberfläche der Kerngruppen unter Ausparung der weißen Substanz (Abbildung 5e-f). Das Fluoreszenzmuster der meisten anderen bindenden Oberflächenantikörper stellte sich ähnlich dar (sogenannte Neuropilfärbung), allerdings reagierten AMPAR-, GABA_BR-, Lgi1- und Caspr2-Antikörper auch stark mit der Molekularschicht des Kleinhirns [79].

Alle Seren zeigten eine relativ starke Gewebereaktivität der Fluoreszenzstärken 1 und 2 (Abbildung 1). Ein Unterschied zwischen der Studien- und Kontrollgruppe konnte dabei nicht festgestellt werden. Als Gewebereaktivität oder Hintergrundfluoreszenz wurden Bindemuster gewertet, die keinen anatomischen Strukturen folgten oder diese nur schwach voneinander abheben ließen. Die Abbildungen 6a-d zeigen das Fluoreszenzmuster eines MPE-Serums, das hier beispielhaft für die häufig beobachtete unspezifische Gewebereaktivität dargestellt ist. Im Kleinhirn ließ sich eine relativ homogene Färbung der drei Schichten der Kleinhirnrinde (Stratum granulosum, Stratum ganglionare, Stratum moleculare) mit nur schwacher Betonung des Purkinjezellzytoplasmas beobachten (Abbildung 6a-b). Im Hippocampus wurde das Pyramidenzellzytoplasma schwach betont (Fluoreszenzstärke 1-2). Zudem hob sich der Gyrus dentatus ab, ohne eine bestimmte Zellstruktur herauszustellen (Abbildung 6c-d).

Die Identifikation spezifischer Antikörpermuster war durch die Gewebereaktivität erheblich erschwert. Trotzdem unterschieden sich die Fluoreszenzmuster der einzelnen Seren reproduzierbar voneinander.

Im Kleinhirn, Thalamus und Kortex fanden sich in einem KM-Serum (KM-077) an die Oberfläche bindende Antikörper im Sinne eines Neuropilmusters (Abbildung 6c-h). Die Körnerzellen des zerebellären Stratum granulosums hoben sich von der homogenen Hintergrundfluoreszenz leicht ab (Abbildung 6f). Im Thalamus zeigten sich ähnlich wie beim NR1-AK an die Zelloberfläche bindende Antikörper (Abbildung 6g-h). Die Fluoreszenzstärke war in dieser Probe jedoch insgesamt schwach und entsprach den Stärken 1-2 (Abbildung 1), sodass

diese nicht als positiv gewertet wurde.

Keines der Seren zeigte deutlich ein typisches Fluoreszenzmuster eines Oberflächenantikörpers. Insbesondere im Hippocampus zeigte sich für alle Seren eine Bindung an Gyrus dentatus und Pyramidenzellen. Eine darüber hinausgehende Färbung der Molekularschicht im Sinne einer Neuropilfärbung wurde nicht beobachtet.

Mit stärkerer Fluoreszenz der Stärken 2 bis 3 fielen dagegen Muster intrazellulär bindender Antikörper auf. Wie bei antineuronalen nukleären Antikörpern (ANNA), zum Beispiel Anti-Hu oder Anti-Ri, wurden in einem MPE- und einem KM-Serum die Nuclei aller Zellgruppen der Kleinhirn- sowie Großhirnareale gefärbt. Im Serum MPE-005 waren dabei stärker die Nuclei der Purkinjezellen und der Sternzellen in der Molekularschicht gefärbt, KM-081 fiel mit besonders hoher Fluoreszenzintensität der Körnerzellnuclei auf. Auch die Nuclei der Kortexneurone sowie die Nuclei der hippocampalen Pyramiden- und Körnerzellen zeigten eine starke Fluoreszenz in diesen beiden Proben (Abbildung 6i-p).

Antikörper gegen intrazelluläre Antigene lassen sich in einem Assay mit fixiertem Gewebe in der Regel besser darstellen, da dabei die Lipidmembranen der Zelloberfläche durch das zugegebene Triton X-100 permeabel wird. Zum Vergleich wurden deshalb auch Färbungen an fixiertem Maushirngewebe durchgeführt.

Die unspezifische Gewebereaktion wurde auf fixierten Maushirnschnitten ähnlich wie auf unfixierten Hirnschnitten beobachtet: mit Fluoreszenz der Stärke 1 unter Betonung der hippocampalen Pyramidenzellen, des Gyrus dentatus sowie im Kleinhirn mit einer leichten Abhebung der Purkinjezellen von der unspezifischen Bindung an Molekular- und Körnerzellschicht (Abbildung 7a-b). Probe KM-081 zeigte auf fixiertem Gewebe noch deutlicher eine starke nukleäre Bindung im Kleinhirn und Hippocampus (Abbildung 7c-d, vergleiche auch Abbildung 6m-p). Auch die Probe einer MPE (MPE-017) zeigte eine starke Expression (Fluoreszenzstärke 3) antinukleärer Antikörper. Zudem zeigte sich eine Anfärbung der Purkinjezellendriten der Fluoreszenzstärke 2, was sich in keiner anderen der 30 auf fixierten Maushirnschnitten gefärbten Seren darstellen ließ (Abbildung 7e-h). Das Serum MPE-089 zeigte auf fixierten Maushirnschnitten im Vergleich zu den anderen Seren eine stärkere Fluoreszenz der Molekularschicht des Hippocampus, aber auch hier blieb die Fluoreszenzstärke der Molekularschicht schwächer als die der Pyramidenzellen, sodass hier kein typisches Neuropilmuster vorlag (Abbildung 7i-j). Auf unfixiertem Gewebe zeigte die Probe MPE-089 keine Auffälligkeiten.

Zusammenfassend zeigten die Färbungen eine starke Gewebereaktivität, wovon sich in einzelnen Präparaten mögliche intrazellulär bindende Antikörper abheben ließen. Eine deutliche Bindung an Oberflächenantigene konnte nicht beobachtet werden.

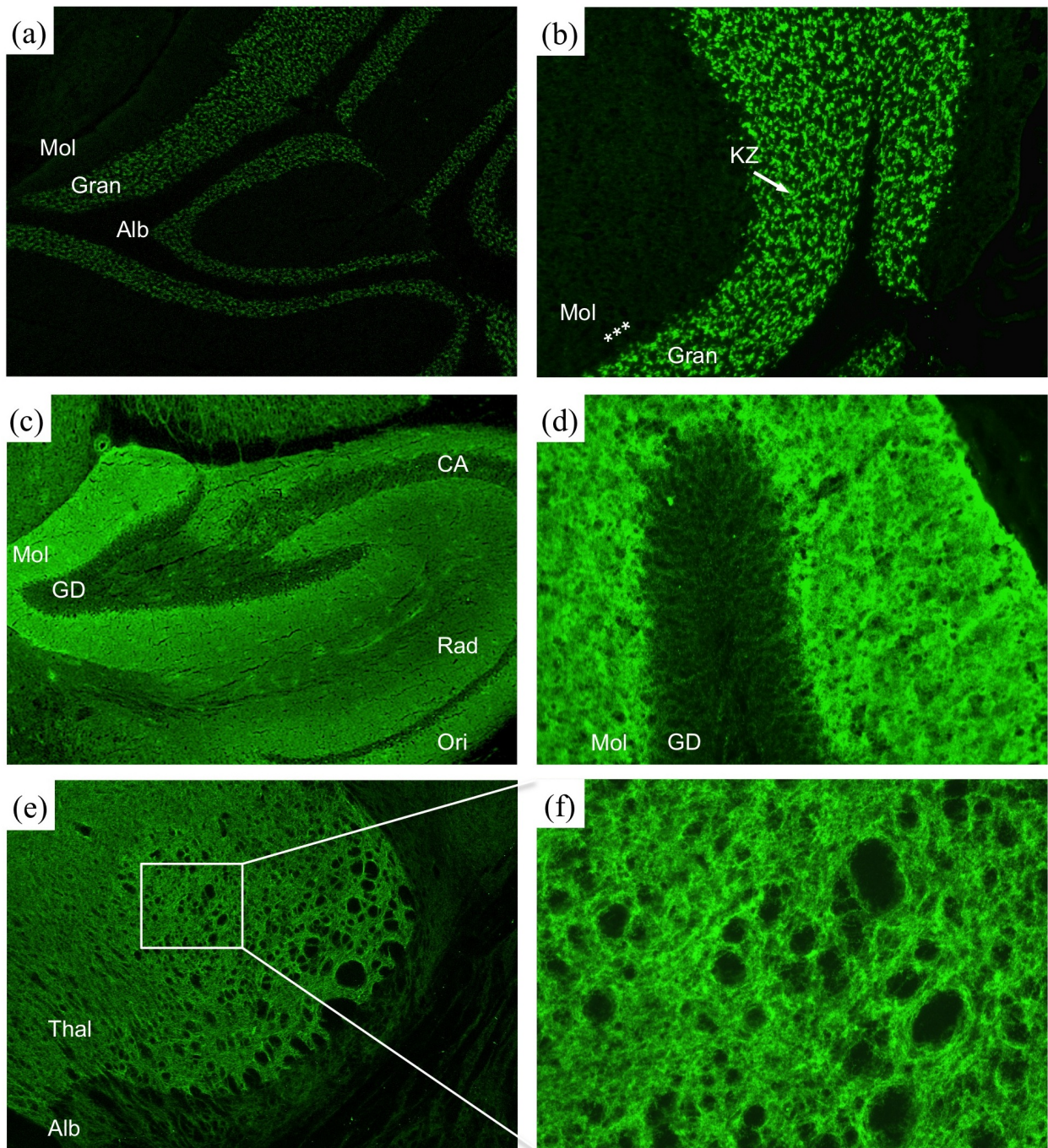


Abbildung 5: Immunhistochemisches Fluoreszenzmuster der NMDAR/NR1-Antikörper

Die Abbildungen zeigen die charakteristischen Fluoreszenzmuster auf unfixiertem Maushirn nach Inkubation mit dem monoklonalen NMDAR/NR1-Antikörper (NR1-AK) und dem grün fluoreszierenden (Alexa Fluor 488) anti-human-IgG Zweitantikörper. (a-b) Im Kleinhirn bindet der NR1-AK an die KZ des Stratum granulosum. *** Die Purkinjezellen des Stratum ganglionare bleiben ausgespart, ebenso die Molekularschicht. (c-d) Im Hippocampus wird die Molekularschicht des GD betont. Die KZ, ebenso wie die Pyramidenzellen des Ammonshorns bleiben ausgespart. (e-f) Das typische Oberflächenantikörperbindemuster zeigt sich auch im Thalamus mit Färbung der Kerngruppen unter Aussparung der weißen Substanz. Alb: Substantia alba, CA: Cornu ammonis, GD: Gyrus dentatus, Gran: Stratum granulosum, KZ: Körnerzelle, Mol: Stratum moleculare, Ori: Stratum oriens, Rad: Stratum radiatum.

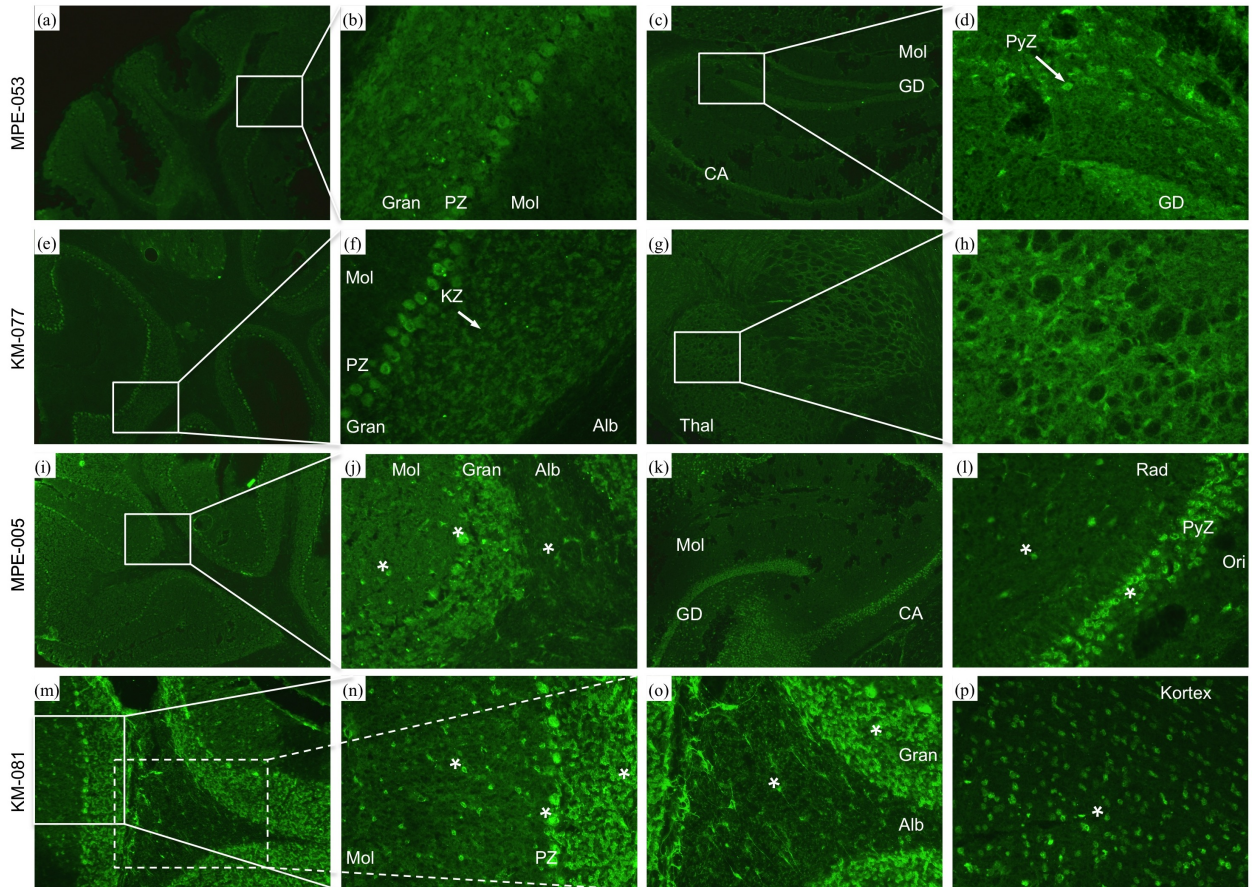


Abbildung 6: Gewebereaktivität und bindende Antikörper in MPE- und KM-Seren auf unfixiertem Maushirngewebe

Das Serum MPE-053 zeigt ein unspezifisches Hintergrundsignal mit (a-b) homogener Färbung der Kleinhirnrinde, von der sich die Purkinjezellen leicht abheben, sowie (c-d) Betonung des Stratum granulosum des GD sowie der PyZ im Hippocampus. Spezifische Muster in definierten anatomischen Regionen oder des Neuropils zeigen sich nicht. (e-h) zeigen eine Antikörperbindung gegen Oberflächenstrukturen in der Probe KM-077, die bei Fluoreszenzstärke 1-2 jedoch als negativ gewertet wurde. MPE-005 und KM-081 zeigen Muster intrazellulär bindender Antikörper der Fluoreszenzstärken 2-3. Neuronale Nuclei der Zellgruppen im Kleinhirn (i-j,m-o) und Großhirn (k-l,p) werden deutlich gefärbt. * zeigen beispielhaft die fluoreszierenden Nuclei neuronaler Zellen. (k-l) zeigen Ausschnitte des Hippocampus, (p) des Kortex. Alb: Substantia alba, CA: Cornu ammonis, GD: Gyrus dentatus, Gran: Stratum granulosum, KZ: Körnerzelle, Mol: Stratum moleculare, Ori: Stratum oriens, PZ: Purkinjezelle, PyZ: Pyramidenzelle, Rad: Stratum radiatum.

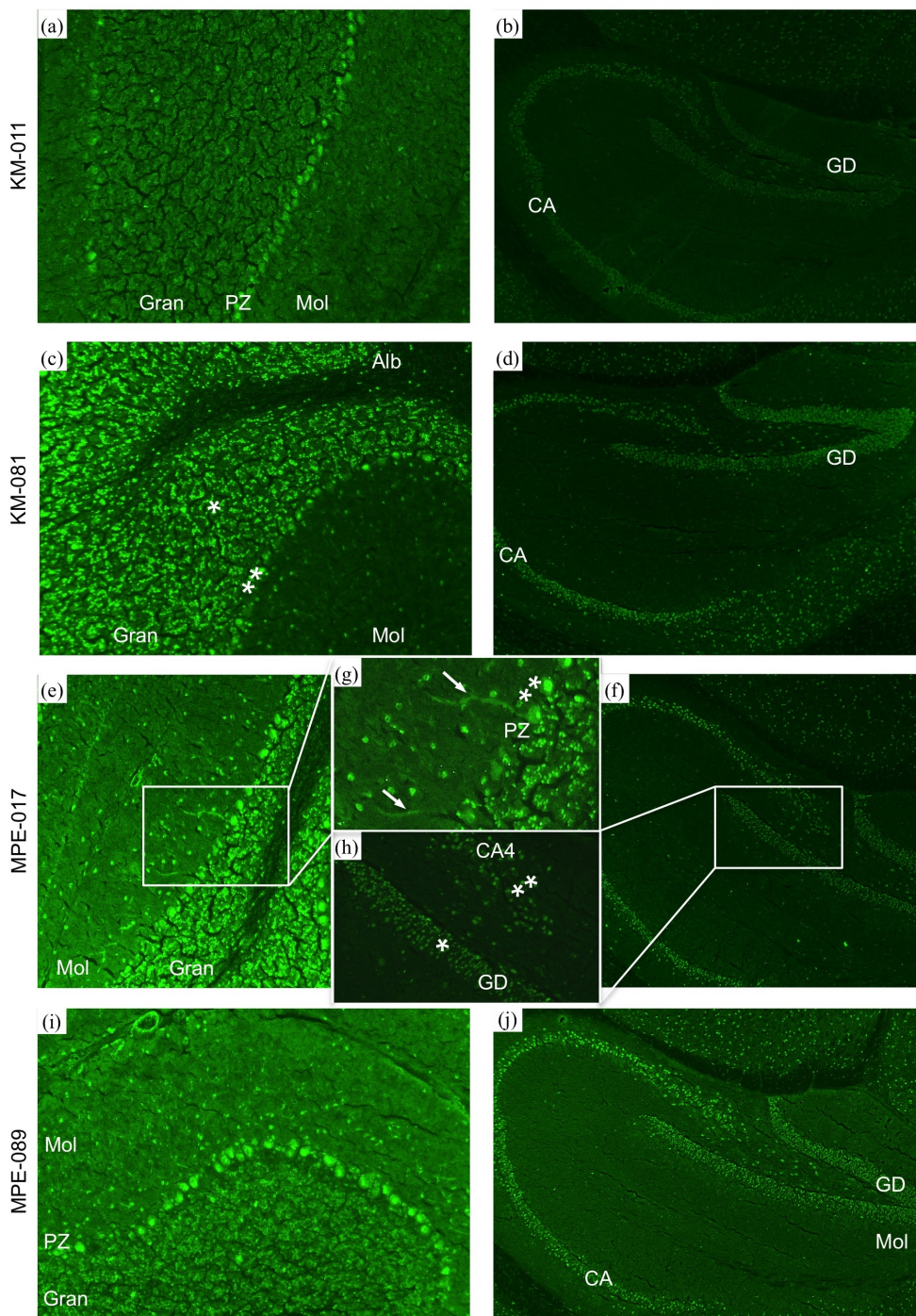


Abbildung 7: Intrazellulär bindende Antikörper in MPE- und KM-Seren auf fixiertem Maus-hirngewebe

(a-b) KM-011 zeigt ein repräsentatives Signal der Gewebereaktivität der Seren mit Betonung des GD, der hippocampalen PyZ und der zerebellären PZ. KM-081 und MPE-017 zeigen Muster antinukleärer Antikörper im Kleinhirn (c,e,g) und Hippocampus (d,f,h). * zeigt den fluoreszierenden Zellkern einer KZ im Kleinhirn und GD, ** zeigt den fluoreszierenden Zellkern einer PZ im Kleinhirn oder einer hippocampalen PyZ. ↗ In der Probe der MPE-017 werden zusätzlich die Dendriten der PZ deutlich gefärbt (e,g). Im Serum MPE-089 wird die Molekularschicht im Vergleich zu den anderen Seren stärker betont, bleibt jedoch schwächer als das Signal der PyZ (i-j). Alb: Substantia alba, CA: Cornu ammonis, GD: Gyrus dentatus, Gran: Stratum granulosum, KZ: Körnerzelle, Mol: Stratum moleculare, PZ: Purkinjezelle, PyZ: Pyramidenzelle.

5.2.3 Neuronale Antikörper in kommerziellem CBA

Insgesamt wurden zehn der 253 Proben (4,0 %) im CBA von EUROIMMUN positiv für neuronale Oberflächenantikörper getestet. Die Probe einer Mutter eines Kindes mit hyperkinetischer Störung (F90) wurde mit den kommerziellen Assays nicht ausgewertet.

Eine der 122 MPE-Seren (0,8 %) war positiv auf Antikörper gegen den GABA_B-Rezeptor (Tabelle 8). Die Mutter war zum Zeitpunkt der Blutentnahme mit 27 Jahren deutlich unter dem Altersdurchschnitt der Kohorte und hatte einen Sohn mit der Diagnose Autismus (F84.0). Der Antikörpertiter im CBA war mit 1:10 niedrig und die immunhistochemische Testung ergab kein spezifisches Muster für GABA_BR-Antikörper (Tabelle 9). Ein Titer von 1:10 bedeutet gemäß kommerziellem CBA ein schwaches Fluoreszenzsignal bei einer 1:10-Serumverdünnung [23].

Unter den Kontrollseren zeigten sich insgesamt neun positive Testergebnisse (6,9 %). Mit 2,6 % waren Antikörper gegen GlyR am häufigsten. Die positiven Seren entstammten alle der Gruppe der KM. Mit einem medianen Alter von 48 Jahren lagen sie etwas über dem Altersdurchschnitt der Kohorte (44 Jahre). Der Antikörpertiter war überwiegend niedrig, in sechs Proben lag er bei 1:10, bei einer Probe jedoch bei 1:320, was einer mittleren Fluoreszenzstärke bei einer 1:100 Serumverdünnung entspricht (Tabellen 8, 9) [23].

Zudem war ein KM-Serum mit einem Titer von 1:32 positiv für NMDAR/NR1-Antikörper und ein KW-Serum positiv für Antikörper gegen AQP4 mit einem Titer von 1:100 (Tabelle 8). Ein Titer von 1:100 entspricht im kommerziellen CBA einer schwachen Fluoreszenzintensität bei einer 1:100 Serumverdünnung, ein Titer von 1:32 einer mittleren Fluoreszenzintensität bei einer 1:10 Serumverdünnung [23].

Nur die Anti-AQP4-positive Probe zeigte das typische Muster für Oberflächenantikörper auch auf Hirnschnitten. Alle anderen CBA-positiven Proben waren in der IHC negativ für neuronale Antikörper (Tabelle 11).

Intrazellulär bindende Antikörper wurden mit sieben von 253 Proben (2,8 %) in unserem Kollektiv ähnlich häufig wie Oberflächenantikörper gefunden (Tabelle 10). Keine der Proben war gleichzeitig positiv für Antikörper gegen Oberflächen- und intrazelluläre Antigene. Unter den MPE war je eine Probe positiv für ITPR1-, Neurochondrin und RhoGTPase-Antikörper, unter den KM ebenfalls eine für ITPR1-Antikörper und zudem je eine für Antikörper gegen GFAP und Recoverin. Eine Probe der KW war positiv für Neurochondrin-Antikörper. Die Antikörpertiter waren mit einem Mittelwert von 1:200 deutlich höher als die der Oberflächenantikörper (im Mittel 1:50). Der Altersmedian lag mit 37 Jahren 10 Jahre unter dem für Oberflächenantikörper-positive Proben. Auch in diesem Fall waren die meisten der CBA-positiven Proben immunhistochemisch negativ. Nur zwei Seren zeigten ein für den je-

Antigen (n=17)	Anzahl positiver Ergebnisse (%)			
	MPE (n=122)	KM (n=110)	KW (n=21)	Gesamt (n=253)
AQP4	0	0	1 (4.8)	1 (0.4)
GABA _B R	1 (0.8)	0	0	1 (0.4)
GlyR	0	7 (6.4)	0	7 (2.6)
NMDAR	0	1 (0.9)	0	1 (0.4)
AMPA _{R1+2} , Caspr2, D2R, DNER, DPPX, Flotillin, GABA _A R, IgLON5, Lgi1, mGluR1, mGluR5, MOG, Neurexin-3a	0	0	0	0
Gesamt	1 (0.8)	8 (7.3)	1 (4.8)	10 (4.0)
Positiv (n=)/Antikörpertests (n=)	1/2.074 (0,05%)	8/1.870 (0,43%)	1/357 (0,28%)	10/4.301 (0,23%)

Tabelle 8: Neuronale Oberflächenantikörper im kommerziellen CBA

CBA: Zellbasierter Assay. KM: Kontrollmutter. KW: Weibliche Kontrolle ohne Kind. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung.

weiligen Antikörper typisches immunhistochemisches Bindemuster, gerichtet gegen ITPR1 beziehungsweise GFAP (Tabelle 10).

5.2.4 Neuronale Antikörper in kommerzieller Immunhistochemie

Idealerweise zeigt sich das CBA-positive Ergebnis auch immunhistochemisch mit Antikörper-typischem Fluoreszenzmuster. In den eigenen Kohorten konnten von insgesamt 17 CBA-positiven Proben nur drei immunhistochemisch bestätigt werden; darunter eine mit Oberflächenantikörpern (AQP4) und zwei mit intrazellulär bindenden Antikörpern (ITPR1 und GFAP) (Tabellen 9, 10, 11).

Darüber hinaus zeigte der IHC in fünf verschiedenen Proben ein antineuronales Muster bei negativem CBA-Ergebnis. Zwei MPE-Seren reagierten auf Purkinjezellen im Kleinhirn, typisch für sogenannte "medusa head antibodies", von denen in den letzten Jahren immer wieder neue Vertreter beschrieben worden sind (z.B. Antikörper gegen DNER, GRM1 und Homer-3). Der Sohn der Probandin MPE-062 wurde wegen ADHS behandelt und die Tochter der Probandin MPE-075 aufgrund einer Angststörung.

Im Serum der MPE-041, Mutter einer Tochter mit Depression, konnten Antikörper gegen Myelin im Hippocampus und Kleinhirn beobachtet werden (Tabelle 11). Ein bekanntes Myelin-Antigen ist zum Beispiel *MOG* (Myelin oligodendrocyte glycoprotein). MOG-Antikörper sind wie AQP4-Antikörper mit demyelinisierenden Erkrankungen der NMOSD-Gruppe und außerdem mit der akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM) bei Kindern assoziiert [58].

In der Kontrollgruppe fiel die Probe KM-049 mit Fluoreszenzmuster entlang der weißen Substanz auf, jedoch ohne das für Myelin typische Muster. Ein weiteres Serum, KM-040,

Serum	Oberflächenantigen (AK-Titer)	Alter Mutter (J)	Kind - Diagnose	- Geschlecht	- Alter (J)
MPE-096	GABA _b R (1:10)	27	Autismus F84.0	m	7
KM-007	NMDAR (1:32), GlyR (1:10)	47	—	—	7
KM-001	GlyR (1:10)	53	—	—	30
KM-072	GlyR (1:10)	52	—	—	27
KM-076	GlyR (1:10)	51	—	—	31
KM-087	GlyR (1:10)	36	—	—	7
KM-089	GlyR (1:10)	48	—	—	32
KM-104	GlyR (1:320)	48	—	—	21
KW-012	AQP4 (1:100)	23	—	—	—
Gesamt	Mittlerer Titer 1:50	Median 47 (23-52)			17 (7-32)

Serum	Intrazelluläre Antigene (AK-Titer)	Alter Mutter (J)	Kind - Diagnose	- Geschlecht	- Alter (J)
MPE-008	Neurochondrin (1:100)	38	ADHS F90.1	m	10
MPE-057	ITPR 1 (1:320)	40	Depressive Störung F32.1	w	16
MPE-072	RhoGTPase (1:320)	—	Depressive Störung F32.1	w	14
KM-105	GFAP (1:320)	45	—	—	20
KM-027	Recoverin (1:32)	30	—	—	—
KM-029	ITPR1 (1:100)	36	—	—	16
KW-015	Neurochondrin (1:320)	24	—	—	—
Gesamt	Mittlerer Titer 1:200	Median 37 (24-45)			16 (10-20)

Tabelle 9: Charakteristika der CBA-positiven Proben

AK: Antikörper. ADHS: Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitätssyndrom. KM: Kontrollmutter. KW: Weibliche Kontrolle ohne Kind. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung.

zeigte Antikörperbindungen in der Molekularschicht im Kleinhirn und Hippocampus sowie in der Körnerzellschicht des Kleinhirns, wie es bei vielen Oberflächenantikörpern zu sehen ist, unter anderem bei Caspr2-, Lgi1-, AMPAR- und GABA_bR-Antikörpern (Tabelle 11). Zusammenfassend wurde in 2 % der 253 Proben ein antineuronales Bindemuster eines unbekannten Antikörpers festgestellt: in 2,4 % der MPE (3 von 122) und in 1,5 % der Kontrollen (2 von 131) (Tabelle 11). Nur zwei der Mütter zeigten ein ähnliches Muster, wobei die klinischen Angaben der Kinder keine Parallelen aufwiesen.

5.2.5 NMDAR/NR1-Antikörper im FACS-Assay

In unserem Labor konnte in einem Mausmodell die mögliche Bedeutung mütterlicher NMDAR /NR1-Antikörper für die Pathogenese neuropsychiatrischer Entwicklungsstörungen der Mäusenachkommen gezeigt werden [42]. In der hier untersuchten klinischen Kohorte konnten allerdings weder im CBA noch immunhistochemisch NMDAR/NR1-Antikörper bei Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Erkrankung festgestellt werden.

Es stellte sich die Frage, ob möglicherweise zu geringe Antikörperkonzentrationen im Serum gesunder Mütter von den für Enzephalitispatienten entwickelten Routine-Assays unentdeckt blieben. Durch fetale Anreicherung könnten diese dennoch in relevanter Konzentration beim Kind vorliegen und somit die Hirnentwicklung beeinflussen.

Antigen (n=15)	Anzahl positiver Ergebnisse (%)			
	MPE (n=122)	KM (n=110)	KW (n=21)	Gesamt (n=253)
GFAP	0	1 (0.9)	0	1 (0.4)
ITPR1	1 (0.8)	1 (0.9)	0	2 (0.8)
Neurochondrin	1 (0.8)	0	1 (4.8)	2 (0.8)
Recoverin	0	1 (0.9)	0	1 (0.4)
RhoGTPase	1 (0.8)	0	0	1 (0.4)
Amphiphysin, CV2, ERC1, GAD65, Homer-3, Hu, Ma2, Ri, Yo, ZIC4	0	0	0	0
Gesamt	3 (2.5)	3 (2.7)	1 (4.8)	7 (2.8)
Positiv (n=) / Antikörpertests (n=)	3/1.830 (0,16%)	3/1.650 (0,18%)	1/315 (0,32%)	

Tabelle 10: Antikörper gegen intrazelluläre Antigene im kommerziellen CBA

CBA: Zellbasierter Assay. KM: Kontrollmutter. KW: Weibliche Kontrolle ohne Kind. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung.

Positive Reaktion im IHC	Hippocampus (Titer)	Zerebellum (Titer)	CBA (Titer)
MPE (3/122, 2.5%)			
MPE-041	Myelin 1:100	Myelin 1:320	negativ
MPE-067	negativ	Purkinjezellen 1:32	negativ
MPE-075	negativ	Purkinjezellen 1:320	negativ
KM (4/110, 3.6%)			
KM-029	negativ	Purkinjezellen 1:32	ITPR1 (1:100)
KM-105	GFAP 1:100	GFAP 1:100	GFAP (1:320)
KM-040	Molekularschicht 1:100	Molekularschicht 1:100, Körnerzellschicht 1:320	negativ
KM-049	weiße Substanz 1:320	weiße Substanz 1:320	negativ
KW (1/21, 4.8%)	Molekularschicht 1:320	Molekularschicht 1:320, weiße Substanz	AQP4 (1:100)

Tabelle 11: Neuronale Antikörper in kommerzieller Immunhistochemie

CBA: Zellbasierter Assay. IHC: Immunhistochemie. KM: Kontrollmutter. KW: Weibliche Kontrolle ohne Kind. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung.

Der in unserem Labor entwickelte FACS-Assay bietet den Vorteil, mit hoher Sensitivität NMDAR/NR1-Antikörper auch im niedrigen Konzentrationsbereich erkennen zu können. Auch im Bereich sehr geringer Antikörperkonzentrationen bis 0,01 ng/ml kann mit dem FACS-Assay zwischen monoklonalen NMDAR/NR1- und Kontrollantikörpern unterschieden werden [42][56].

Für die Datenauswertung wurde zunächst der für die Analyse relevante Bereich der physiologisch konfigurierten HEK-Zellen anhand der Intensität des Vorwärts- und Seitwärtstreulichts so bestimmt, dass in dem elliptischen Fenster mindestens 50 % und maximal 85 % der FACS-Signale der internen Kontrollproben erfasst wurden (Abbildung 8a).

Die HEK-Zellen wurden dann anhand des Signals des mit NR1 kovalent gebundenen, fluoreszierenden EYFPs in NR1-transfizierte und nicht-transfizierte HEK-Zellen unterschieden (Abbildung 8b). Die Stärke des EYFP-Signals entsprach dabei dem Expressionslevel der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Als nicht-transfiziert, im Folgenden NR1_{neg}, wurden alle Zellen mit einer medianen Fluoreszenzintensität (MFI) für EYFP <100 definiert. Die NR1-transfizierte Population (NR1_{pos}) wurde nach dem Expressionslevel von NR1 in vier

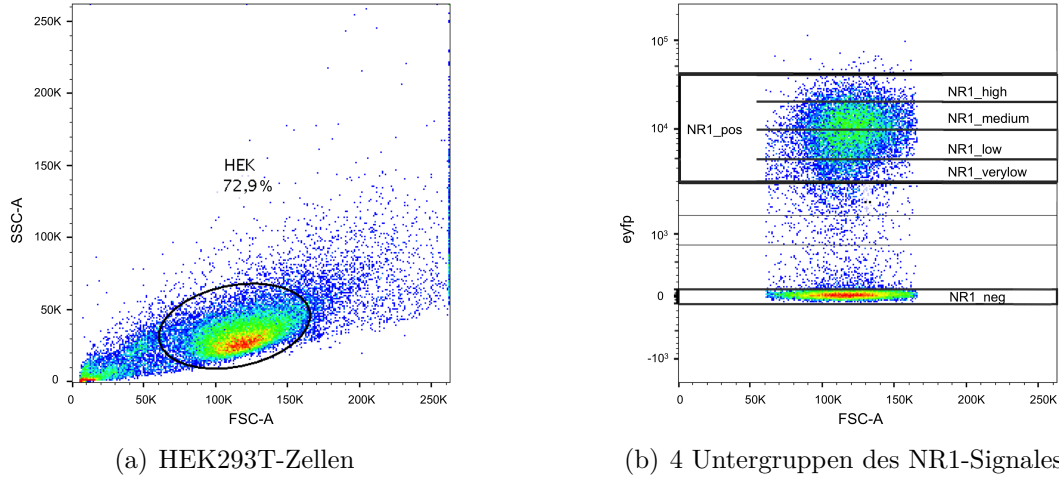


Abbildung 8: Definition der verschiedenen Populationen NMDAR/NR1-exprimierender HEK-Zellen

Durchflusszytometrische Messung (FACS) von NR1-transfizierten sowie nicht-transfizierten HEK-Zellen. Die Abbildungen zeigen beispielhaft die Messergebnisse für den monoklonalen NR1-Antikörper. (a) Das elliptische Gate für die physiologisch konfigurierten einzelnen HEK-Zellen umfasst hier 72,9 % der Signale. (b) Anhand der Fluoreszenzintensität des mit NR1 kovalent gebundenen EYFPs werden die HEK-Zellen in eine nicht-transfizierte ($NR1_{neg}$) und transfizierte Population ($NR1_{pos}$) unterschieden. Die $NR1_{pos}$ -Population wird nach dem Expressionslevel von NR1 in vier weitere Kategorien unterteilt: $NR1_{verylow}$, $NR1_{low}$, $NR1_{medium}$, $NR1_{high}$. FSC: forward scatter (Vorwärtsstreulicht), SSC: side scatter (Seitwärtsstreulicht), Angabe als Gesamtheit des erfassten Streulichts einer Zelle (engl. -A für „area“).

weitere Gruppen unterteilt: $NR1_{verylow}$ mit $MFI \geq 3.000$, $NR1_{low}$ mit $MFI \geq 5.000$, $NR1_{medium}$ mit $MFI \geq 10.000$, und $NR1_{high}$ mit $MFI 20.000-40.000$ (Abbildung 8b).

Für $NR1_{neg}$ sowie für jede der vier $NR1_{pos}$ -Kategorien wurde die mediane Fluoreszenzintensität des Zweitantikörpers (anti-human IgG, gekoppelt mit Alexa Fluor 647) bestimmt, im Folgenden MFI 647 genannt. Diese entsprach der Antikörperbindung an die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Die Anregungs- und Emissionsspektren der beiden verwendeten Fluorochrome EYFP und Alexa Fluor 647 überschneiden sich dabei nicht [24], sodass die gemessenen Fluoreszenzintensitäten voneinander unabhängig waren.

Die $NR1_{neg}$ -Gruppe zeigte für die internen Kontrollen erwartungsgemäß eine niedrige Fluoreszenzintensität des Zweitantikörpers (Mittelwert der $MFI 647 = 449 \pm 159$ SD). Die MFI 647 für $NR1_{neg}$ wurde als für jede Probe individuelles Hintergrundsignal gewertet.

Für die $NR1_{pos}$ -Zellen wurde bei den Positivkontrollen (monoklonaler NR1-AK und zwei Seren von NMDAR-Enzephalitispatienten) eine deutlich höhere MFI 647 gemessen, wohingegen sich die MFI 647 für die $NR1_{neg}$ - und $NR1_{pos}$ -Zellen bei der Negativkontrolle (monoklonaler neg AK) nur minimal unterschied. Verglichen mit den $NR1_{pos}$ -Populationen mit

niedrigerem NR1-Expressionslevel wurde für die NR1_{high}-Population sowohl der Unterschied zum Hintergrundsignal innerhalb einer Probe deutlicher, als auch der Unterschied zwischen Negativ- und Positivkontrolle. Von NR1_{verylow} zu NR1_{high} stieg die MFI 647 des NR1-AKs um das 18-fache und die MFI 647 des Serums eines NMDAR-Enzephalitispatienten um das 7-fache. Der neg AK zeigte dagegen nur einen minimalen Anstieg um das 1,5-fache (Tabelle 12).

Die NR1_{high}-Population kann als Gruppe mit den besten Transfektionsbedingungen betrachtet werden, sodass für die Beurteilung des Vorliegens von NMDAR/NR1-Antikörpern nur die NR1_{high}-Zellen berücksichtigt wurden. Das Anti-NR1-Signal einer Probe wurde als Differenz der MFI 647 der NR1_{high}-Population und dem Hintergrundsignal der NR1_{neg}-Population definiert (Δ MFI 647). Es wurde angenommen, dass die Größe von Δ MFI 647 Ausdruck des Anti-NMDAR/NR1-Titers einer Probe ist.

Probe	MFI 647						Δ MFI 647	Δ MFI 647*
	NR1 _{neg}	NR1 _{pos}	NR1 _{verylow}	NR1 _{low}	NR1 _{medium}	NR1 _{high}		
Neg AK	360	447	405	410	457	614	254	=
NR1-AK	356	4.102	1.484	2.751	6.456	26.477	26.121	=
NMDARE	476	1.232	688	910	1.577	4.996	4.519	=
MPE (n=120)	972	1.022	928	967	1.057	1.236	265	351
KM (n=105)	1.068	976	898	930	999	1.148	81	244

Tabelle 12: Mediane Fluoreszenzintensität (MFI 647) für die verschiedenen NR1_{pos} - Populationen

Gezeigt wird jeweils der Mittelwert der Kohorten MPE und KM. Δ MFI 647 bezeichnet die Differenz der MFI 647 der NR1_{high}-Population und dem Hintergrundsignal der NR1_{neg}-Population. Unter Δ MFI 647* wurden die negativen Differenzen auf Null gesetzt. = : entspricht dem Wert der vorangehenden Spalte. KM: Kontrollmutter. MFI 647: Mediane Fluoreszenzintensität des mit dem Zweitantikörper gekoppelten Fluorchroms Alexa Fluor 647. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung. Neg AK: monoklonaler Negativantikörper. NMDARE: Patient mit NMDAR-Enzephalitis. NR1-AK: monoklonaler Anti-NR1 Antikörper.

Die Testung der Seren der klinischen Kohorte ergab bei drei MPE- und zwei KM-Seren nicht auswertbare Signale (es wurden negative mediane Fluoreszenzintensitäten für den mit Alexa Fluor 647 gekoppelten Zweitantikörper ermittelt), sodass diese aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Insgesamt gingen folglich 120 MPE-Seren und 105 Kontrollseren in die Auswertung ein.

Bei der Messung der einzelnen Serumproben wurden in dem für die HEK-Zellen definierten Bereich (Abbildung 8) im Durchschnitt 72,6 % (SD \pm 6), mindestens 43,6 % und höchstens 82,1 % der Signale erfasst. Weiter wurden durchschnittlich 52,8 % (SD \pm 3,5) nicht-transfizierte und 41,6 % (SD \pm 2,9) NR1-transfizierte Zellen gezählt. In die Kategorie der NR1_{high}-Population fielen 2,7-4,8 % aller Signale einer Probe (Mittelwert 3,6 %).

Auffällig in der Messung der Seren war ein überwiegend starkes Hintergrundsignal (Tabelle 12). In 57 % der insgesamt 225 MPE- und KM-Seren lag die MFI 647 für NR1_{neg} über zwei

SD über dem Mittelwert des Hintergrundsignals der internen Kontrollen. Darunter waren MPE- (68 von 120) und KM- (60 von 105) Seren mit je 57 % gleichermaßen vertreten.

Betrachtet man die einzelnen Seren, so variierte das Hintergrundsignal erheblich zwischen einer Fluoreszenzintensität von 219 und 6.539 (MFI 647). Eine hohe MFI 647 für die NR1_{neg}-Zellen ging dabei in der Regel mit einer hohen MFI 647 für die NR1_{high}-Population einher und umgekehrt (Abbildung 9). Das Verhältnis war jedoch nicht rein linear. Drei Serumproben fielen mit besonders starker Hintergrundreaktivität auf, ohne ein starkes Signal für die NR1_{high}-Population zu erzeugen. Eine Probe wies eine hohe MFI für NR1_{high} bei relativ niedrigem Hintergrund auf. Die meisten Seren gruppierten sich jedoch um die Mittellinie, die einer positiven Korrelation entspricht. Die bivariate Korrelationsanalyse nach Pearson ergab einen Korrelationskoeffizienten von $r=0,47$, was einer moderaten bis starken Korrelation entspricht und auf einem Niveau von $p=0,01$ statistisch signifikant ist (Abbildung 9).

Das weist darauf hin, dass eine hohe MFI 647 für NR1_{pos}- oder NR1_{high}-Zellen alleine nicht notwendig auf das Vorliegen von NMDAR/NR1-Antikörpern hinweist, sondern auch durch eine hohe Hintergrundreaktivität dieser Probe bedingt sein könnte. In diesem Versuchsaufbau hatte somit die gleichzeitige Analyse der MFI 647 von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen eine wesentliche Bedeutung, um ein mögliches starkes Hintergrundsignal einer Probe nicht fälschlicherweise als Anti-NR1-Signal zu werten. Durch die Bildung der Differenz Δ MFI 647, wurde das Hintergrundsignal jeder einzelnen Serumprobe in der Auswertung hinsichtlich des Vorliegens von Anti-NR1 Antikörpern herausgerechnet.

Entsprechend dieser Datenanalyse wurden nun die Gruppen der MPE und der KM verglichen. Abbildung 10 zeigt die Verteilung des Anti-NR1-Signals für die Gruppe der MPE im Vergleich zu den KM. Sowohl Mittelwert (Δ MFI 647: 265 versus 81) als auch Median (Δ MFI 647: 262 versus 192) waren höher für MPE als für KM. In 22 % (26 von 120) der MPE und 23 % (24 von 105) der KM zeigten sich negative Differenzen für Δ MFI 647. In diesen Fällen war das Hintergrundsignal höher als das für NR1_{high}. Per conventionem wurden negative Werte für Δ MFI 647 auf Null gesetzt.

Die statistische Berechnung mittels ungepaartem t-Test ergab einen signifikanten Unterschied im Anti-NR1-Signal zwischen den MPE und der KM, zugunsten der MPE ($p=0,03$, vergleiche $p=0,04$ nach der Auswertung mit negativen Differenzen). Die Nullhypothese, die Anti-NR1-Reaktivität unterscheide sich zwischen MPE und KM nicht, konnte somit abgelehnt und die Alternativhypothese angenommen werden. Die Gruppe der MPE hatte eine höhere Anti-NR1-Reaktivität, sprich höhere NMDAR/NR1-Antikörpertiter, als die KM (Abbildung 11).

Außer dem relativen Unterschied zwischen den beiden Gruppen der MPE und KM sind diejenigen Serumproben interessant, die einen besonders hohen NMDAR/NR1-Titer aufwie-

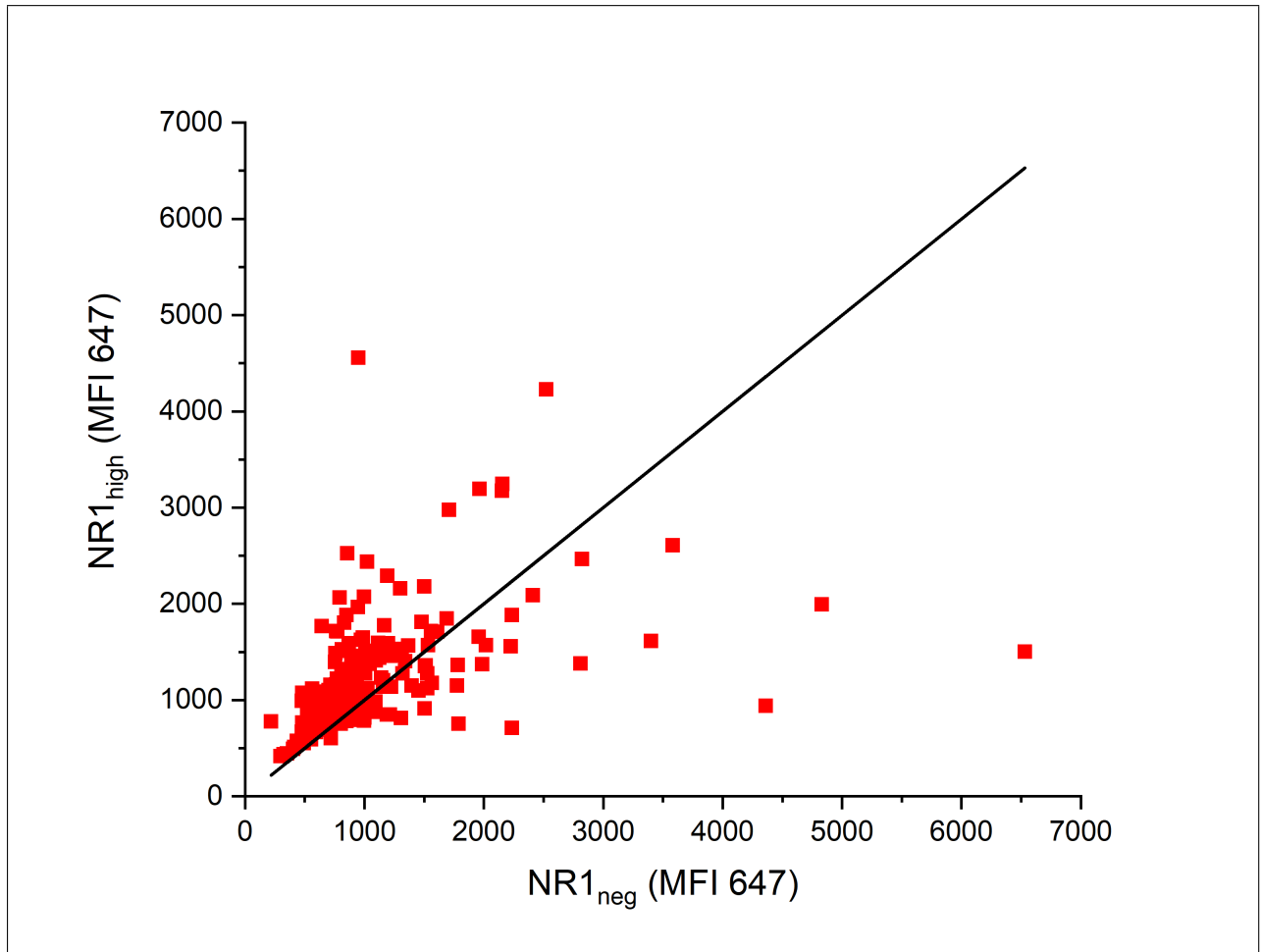


Abbildung 9: Positive Korrelation zwischen $NR1_{neg}$ - und $NR1_{high}$ -Reaktivität der MPE- und KM-Seren

Stellt man die $NR1_{neg}$ - und $NR1_{high}$ -Reaktivität jeder einzelnen Probe gegenüber, so lässt sich an der Trichterform in der graphischen Darstellung eine positive Korrelation zwischen den beiden Reaktivitäten erkennen. Korrelationskoeffizient nach Pearson $r=0,47$ ($p=0,01$). Eine hohe MFI 647 der $NR1_{high}$ -Population weist somit nicht notwendig auf das Vorliegen von NMDAR/NR1-Antikörpern hin, sondern könnte auch durch eine hohe Hintergrundreaktivität dieser Probe bedingt sein. Durch die Bildung der Differenz $\Delta MFI 647$ zwischen $NR1_{high}$ und $NR1_{neg}$ wird das Hintergrundsignal herausgerechnet. Jedes rote Quadrat entspricht einem mütterlichen Serum der KM oder MPE. Die Werte der x- und y-Achse entsprechen jeweils der medianen Fluoreszenzintensität des mit dem Zweitantikörper gekoppelten Fluorchroms Alexa Fluor 647 (MFI 647) für $NR1_{neg}$ - respektive $NR1_{high}$ -Zellen. KM: Kontrollmutter. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung.

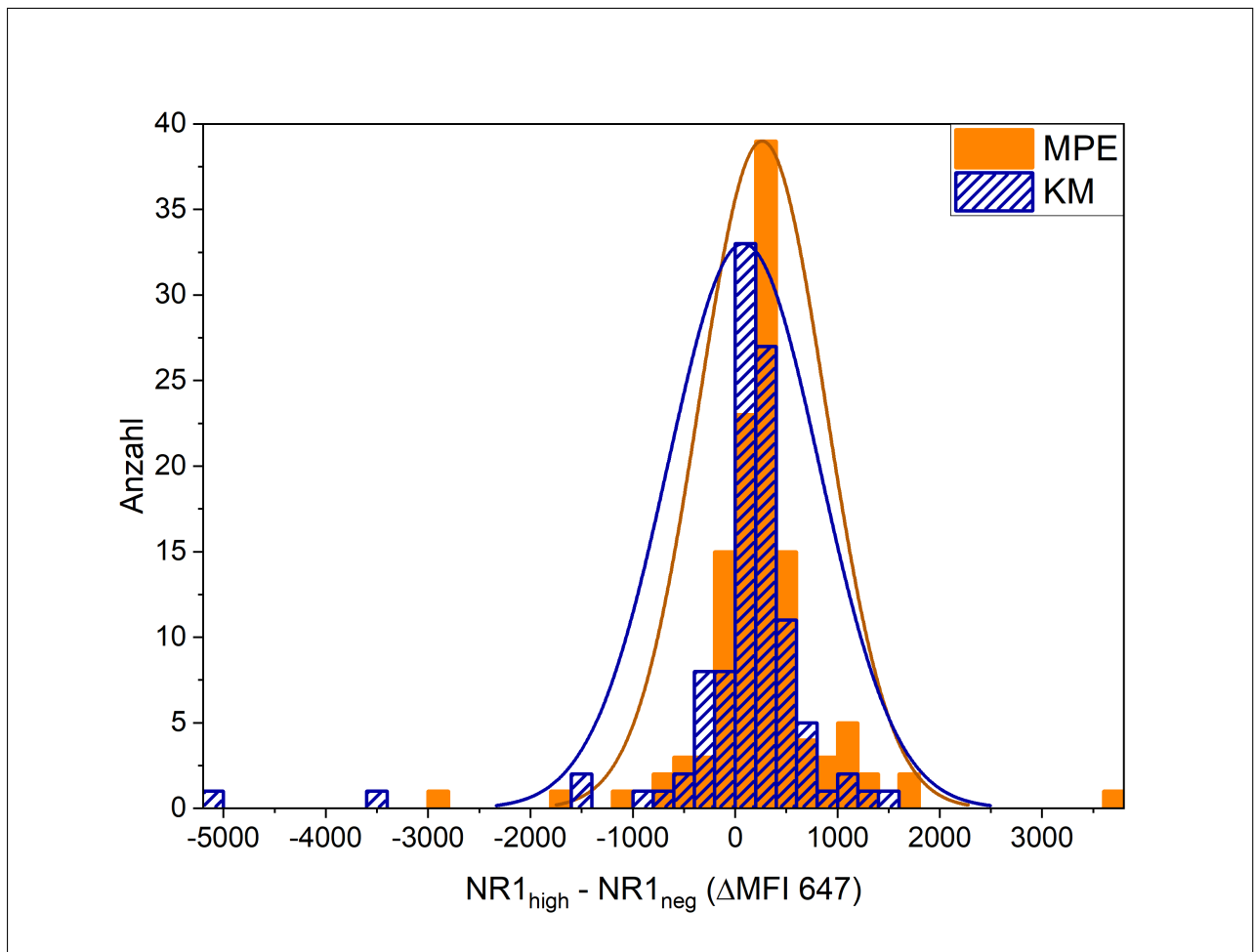


Abbildung 10: Verteilung der Anti-NR1-Reaktivität der MPE- und KM-Seren

Die Histogramme zeigen die Verteilung der $\Delta\text{MFI } 647$ in den beiden Kohorten MPE und KM. Der Unterschied der beiden Gruppen ist statistisch signifikant zugunsten der MPE (ungepaarter t-Test: $p=0,04$). $\Delta\text{MFI } 647$ bezeichnet die Differenz aus der MFI 647 der NR1_{high}- und der MFI 647 der NR1_{neg}-Population. KM: Kontrollmutter. MPE: Mütter von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung.

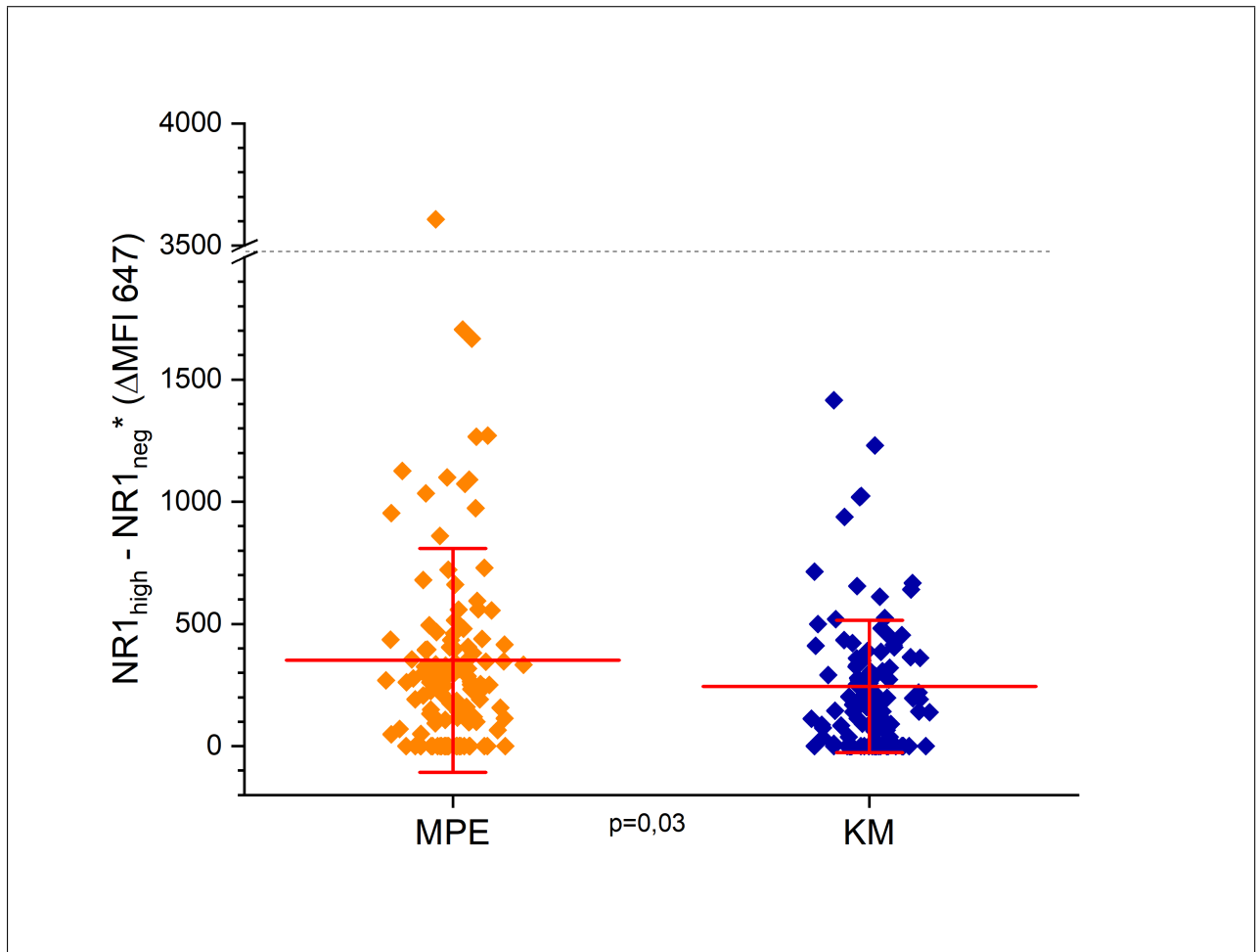


Abbildung 11: Anti-NR1-Reaktivität der MPE- und KM-Seren

MPE zeigen eine signifikant stärkere Anti-NR1-Reaktivität als KM ($p=0,03$). In den MPE kann folglich von höheren NMDAR/NR1-Antikörpertitern ausgegangen werden. Bei einem Schwellenwert von 2 SD über dem Mittelwert, sind neun MPE- (7,5 % von 120) und zwei KM-Seren (1,9 % von 105) positiv für NMDAR/NR1-Antikörper. $\Delta MFI 647^*$: Negative Werte für $\Delta MFI 647$ wurden auf Null gesetzt. Jede Raute zeigt den Wert einer Serumprobe an. Die roten horizontalen Linien zeigen den Mittelwert mit einer SD. Diese Abbildung ist eine Variante einer bereits veröffentlichten Abbildung [42]. Sie darf mit freundlicher Genehmigung von *John Wiley and Sons* gezeigt werden.

Probe	$\Delta\text{MFI } 647^*$	Alter der Mutter	Alter,	Geschlecht,	Diagnose des Kindes (ICD-10)
MPE-N019	3.608	34	11	m	F90.0
MPE-019	1.704	33	12	m	F90.1
MPE-021	1.667	36	11	m	F98.8
KM-077	1.416	39	15	—	—
MPE-063	1.270	—	14	w	F32.1
MPE-005	1.266	43	19	m	F90.1
KM-098	1.231	47	27	—	—
MPE-033	1.126	40	16	w	F90.1
MPE-014	1.099	41	16	w	F92.8
MPE-053	1.090	43	15	w	F32.1
MPE-027	1.074	38	15	w	F32.1

Tabelle 13: Klinische Daten zu den Seren mit einer Anti-NR1-Reaktivität $\Delta\text{MFI } 647^* > 2$ SD über dem Mittelwert

Die Seren sind nach absteigender Fluoreszenzintensität für Anti-NR1 gelistet. $\Delta\text{MFI } 647^*$: Differenz aus MFI 647 der NR1_{high} - und MFI 647 der NR1_{neg} -Population, wobei negative Differenzen auf Null gesetzt wurden. Die dem ICD-10 Code entsprechenden Diagnosen finden sich in Tabelle 7.

sen. Wird für eine positive Anti-NR1-Reaktivität ein Schwellenwert bei zwei SD über dem Mittelwert angenommen, so lag dieser bei $\Delta\text{MFI } 647^* = 1.070$ und somit deutlich über dem Wert der Negativkontrolle ($\Delta\text{MFI } 647^* = 254$) und gleichzeitig unter dem Wert eines NMDAR-Enzephalitispatienten ($\Delta\text{MFI } 647^* = 4.519$).

Neun MPE-Seren (7,5 % von 120), jedoch nur zwei KM-Seren (1,9 % von 105) waren demnach positiv für NMDAR/NR1-Antikörper (Abbildung 11, Tabelle 13). Es zeigte sich allerdings keine eindeutige Verteilung zugunsten einer kindlichen Diagnose, eines Geschlechts oder des Alters. Unter den NMDAR/NR1-Antikörper-positiven Probandinnen waren die Mütter von fünf Mädchen und vier Jungen, vier Kinder mit ADHS, drei mit Depression und zwei aus dem Spektrum der Verhaltens- und emotionalen Störungen. Das mittlere Alter der Mütter entsprach etwa dem der Gesamtkohorte, mit einem Median von 39 Jahren (versus 41) für die MPE und 43 (versus 44) für die KM. Eine besonders starke Reaktion zeigte das Serum einer zum Zeitpunkt der Blutentnahme 34-jährigen Mutter eines 11-jährigen Sohnes mit der Diagnose ADHS (Tabelle 13).

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die systematische Literaturrecherche zur Prävalenz der 22 neuronalen Oberflächenantikörper konnten aus 309 Studien zwischen 1974 und 2016 insgesamt 115.005 Antikörpertests bei verschiedenen Kontrollgruppen identifiziert werden [52]. Die meisten Informationen stammten aus kleinen Studien ohne systematischen Einschluss von Kontrollprobanden. Eine große systematische Studie von Dahm et al. [16] dominierte insbesondere die Daten zur Antikörperprävalenz bei Gesunden (Abbildung 3). Überwiegend wurden Seren mit der etablierten Standardmethode getestet (93.492, 81 %). Als Standard gelten CBAs, ausgenommen RIAs für VGKC- und nAChR-Antikörper. Mit insgesamt 1,1 % positiven Ergebnissen wurde nach Standardmethode eine niedrigere Antikörperprävalenz bei Kontrollen festgestellt als in Testungen mit anderen Methoden, wobei 2,35 % der Kontrollen im FACS-Assay und 5,81 % der Kontrollen in anderen Assays positiv waren. Erwartungsgemäß hatten gesunde Kontrollen mit 0,23 % die niedrigste Prävalenz. In diesem Kollektiv fanden sich am häufigsten Neurofascin-Antikörper, nämlich in 1,37 % der Gesunden. Neun Antikörper (AMPA3, AQP4, DNER, GABAaR, GABAbR, mGluR5, nAChR(m), Neurexin-3a und PRG5) wurden in keinem der gesunden Probanden gefunden. Bei Kontrollen mit psychiatrischer Erkrankung lag die Gesamtprävalenz nur wenig darüber (0,25%), was überwiegend auf die im RIA getesteten VGKC- und nAChR-Antikörper zurückzuführen ist. Es gab nur wenige Daten zur Antikörperprävalenz im Liquor von Kontrollgruppen. Antikörper-positive Liquores fanden sich in 2,5 % der Kontrollen mit inflammatorischen anderen neurologischen Erkrankungen und in 0,8 % der übrigen Kontrollen.

In den Kohorten der MPE, KM und KW konnten in der eigenen Immunhistochemie intrazellulär bindende Antikörper, jedoch keine Oberflächenantikörper gefunden werden. Im kommerziellen CBA waren, bezogen auf die einzelnen Antikörper, 0,4-2,6 % der Probandinnen positiv für Antikörper gegen GlyR (n=7), AQP4, GABAbR und NMDAR/NR1 (je n=1). Bezogen auf die Anzahl der mittels CBA durchgeführten Antikörpertests, lag die Gesamtprävalenz der Oberflächenantikörper in der eigenen Kohorte bei 0,23 %. Dies entspricht der Prävalenz bei Gesunden gemäß Literaturrecherche, in welcher die berücksichtigten Oberflächenantikörper weitestgehend mit den im Routinelabor getesteten übereinstimmten.

Entgegen der anfangs aufgestellten Hypothese waren mit dem kommerziellen CBA neuronale Oberflächenantikörper in der Kontrollgruppe geringfügig - wenn auch nicht statistisch signifikant - häufiger als in der Studiengruppe. Die positiven Ergebnisse waren überwiegend auf die hohe Prävalenz der GlyR-Antikörper in der Kontrollgruppe (6,4 % der KM) zurückzuführen. In der Studiengruppe der MPE war nur eine Probe (0,8 %) positiv für

GABA_BR-Antikörper, jedoch mit niedrigem, mutmaßlich nicht pathogenetisch relevantem, Titer (1:10) und ohne typisches Bindemuster in der IHC. Fokussierend auf NMDAR/NR1-Antikörper, zeigten sich in dem FACS-Assay, der für monoklonale NR1-Antikörper auch im Bereich extrem niedriger Antikörpertiter sensitiv ist, in der Gruppe der MPE signifikant höhere NMDAR/NR1-Antikörpertiter als bei den KM ($p=0,03$). Bei einem angenommenen Schwellenwert von zwei SD über dem Mittelwert waren 7,5 % der MPE und 1,9 % der KM positiv für NMDAR-Antikörper, allerdings ohne Korrelation zu einer psychiatrischen Diagnose der Kinder.

6.2 Limitationen der Literatur: Wenige Liquordaten und wenige systematische Studien zur Antikörperprävalenz in Kontrollgruppen

Bei der Beurteilung der Häufigkeit neuronaler Oberflächenantikörper anhand der Literaturanalyse müssen zwei wesentliche Limitationen der bestehenden Literatur berücksichtigt werden [52]:

Erstens gab es kaum Daten zur Antikörperprävalenz im Liquor bei Kontrollprobanden. Allerdings ist das Ziel der meisten neuronalen Oberflächenantikörper das ZNS, sodass ein positiver Antikörpernachweis im Serum für die Frage nach einer autoimmunen Enzephalitis pathophysiologisch nicht zwingend relevant sein muss. Fast 95 % des Kontrollmaterials waren Serumproben. An Liquores von Kontrollprobanden wurden 2.788 Antikörpertests durchgeführt, wobei es für acht Antikörper keine einzige Kontrollliquorprobe gab. Kontrolldaten zu Liquores sind jedoch für viele der vorrangig im ZNS wirkenden Antikörper wichtig. Für NMDAR/NR1-Antikörper scheint insbesondere die intrathekale Synthese der Antikörper pathogenetisch relevant zu sein. Die Sensitivität des Antikörpernachweises liegt im Liquor einer großen Patientenstudie zufolge bei 100 %, das heißt bei jedem Patienten mit NMDAR-Enzephalitis finden sich NMDAR/NR1-Antikörper im Liquor. Jedoch sind bis zu 14 % der Patienten mit Anti-NMDAR-Enzephalitis seronegativ [31]. Ebenso korrelieren die Liquortiter besser mit dem Krankheitsverlauf [32]. Für andere, zum Beispiel MOG- und AQP4-Antikörper gilt dagegen der Nachweis im Serum als ausreichend, wobei die Serumantikörpertiter nicht mit der Schwere des Krankheitsverlaufs korrelieren [64]. Um die biologischen Grundlagen für diese Beobachtungen zu verstehen, sind weitere Daten zum Pathomechanismus, sowie zur Antikörperprävalenz im Liquor versus Serum erforderlich. Selbstverständlich sind Liquorproben nicht so leicht zugänglich wie Blutentnahmen. Jedoch wäre eine Kooperation mit Fachrichtungen, die elektive Eingriffe in Spinalanästhesie vornehmen, denkbar, um zum Beispiel im Rahmen einer Kreuzbandplastik oder Sectio caesarea eine Liquorprobe zu entnehmen.

Die zweite Limitation besteht darin, dass systematische Studien mit großen Kontrollko-

horten zur Antikörperprävalenz kaum verfügbar waren. Trotz über 300 verfügbarer Studien mit Antikörpertests bei Kontrollen wurde nur selten von systematischen Einschlusskriterien berichtet und die meisten Studien testeten nur kleine Kontrollpopulationen. Nachteil kleiner Kohorten ist, dass positive Ergebnisse bei insgesamt niedriger Prävalenz in der Bevölkerung übersehen werden könnten. Außerdem sind kleine Kohorten anfälliger für Selektionsfehler, insbesondere, wenn die Gruppen nicht verblindet getestet werden. Allerdings zeugten auch die Ergebnisse von vier Studien mit großen Kontrollkohorten von einer geringen Prävalenz für die einzelnen neuronalen Oberflächenantikörper. Wobei nur zwei dieser vier Studien mehrere Antikörper berücksichtigten [16][68]. Dahm et al. testeten 1.703 Gesunde sowie 2.533 neurologisch oder psychiatrisch Erkrankte auf 11 der hier besprochenen Oberflächenantikörper. Schou et al. testeten 925 psychiatrische Patienten auf fünf der Antikörper. In diesen beiden Studien waren 1,94 % der Gesunden sowie 2,17 % [16] respektive 1,41 % [68] der neuropsychiatrisch Erkrankten positiv auf einen der Oberflächenantikörper. Bezieht man sich auf die Anzahl der durchgeführten Antikörpertests so war die Prävalenz deutlich geringer und zwar 0,18 % bei Gesunden sowie 0,20 % respektive 0,28 % bei Erkrankten [16][68]. Die Prävalenz der einzelnen Antikörper lag zwischen 0 und 1,34 %, den höchsten Wert erzielte der NMDAR/NR1-Antikörper in der Kohorte der neuropsychiatrisch Erkrankten [16]. Die anderen beiden großen Studien zu nur einem Antikörper ergaben 0,5 % nAChR-Antikörper-positive Seren bei über 60-jährigen Kontrollen [78] sowie 0,3 % AQP4-Antikörper-positive Seren von 1.040 MS-Patienten [63]. Nach Diagnosekorrektur konnten allerdings nur 0,1 % als positive *Kontrollen* gewertet werden, da zwei der MS-Diagnosen nachträglich zu NMO revidiert wurden [63].

Es zeigte sich, dass die Datenlage zur Seroprävalenz bei Kontrollen trotz der Masse an Studien für viele der beschriebenen Oberflächenantikörper qualitativ unzureichend war. Nur eine einzige Studie berichtete von einer großen Kohorte *gesunder* Kontrollen, die überwiegend aus Blutspendern bestand [16]. Unter den Mehrfachspendern überwiegt der Männeranteil jedoch deutlich [66]. Daher sind diese als Kontrollkollektiv nicht für alle Fragestellungen gleichermaßen geeignet. Zum Beispiel sind Blutspender bei der Frage nach der Antikörperprävalenz von Müttern keine ideale Kontrollgruppe.

6.3 Die Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper in Kontrollgruppen im Vergleich zu der Prävalenz anderer Antikörper

Sowohl in der Literatur als auch in den eigenen Kohorten wurden neuronale Oberflächenantikörper auch bei gesunden Probanden gefunden. Als diagnostischer Marker für eine Antikörperbezogene neurologische Erkrankung sind diese folglich nicht hundertprozentig spezifisch. In der medizinischen Diagnostik ist dies jedoch der Regelfall und nicht die Ausnahme. Für eine

klinische Einordnung der Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper in Kontrollgruppen soll in den nächsten Abschnitten eine vergleichende Betrachtung zu anderen Antikörpern erfolgen.

Neuronale Oberflächenantikörper und neuronale intrazellulär bindende Antikörper sind ähnlich häufig.

Im eigenen Studienkollektiv waren neuronale intrazellulär bindende Antikörper mit 2,8 % positiven Proben (0,18 % aller Antikörpertests) im CBA etwas seltener als Oberflächenantikörper mit 4 % (0,23 % positive Tests).

Die Ergebnisse stimmten überwiegend mit denen der Literatur überein. Ein ähnliches Verhältnis zwischen intrazellulär bindenden Antikörpern und Oberflächenantikörpern wurde von EUROIMMUN berichtet. Von 2.716 Proben, die bei Verdacht auf autoimmune Enzephalitis zur Antikörpertestung eingesendet wurden, waren 2,7 % positiv für Oberflächenantikörper und 1,4 % für paraneoplastische Antikörper [79].

In der Studie von Dahm et al. waren in einer großen Kohorte von 1.703 gesunden Kontrollen dagegen intrazellulär bindende Antikörper etwas häufiger mit insgesamt 4,1 % positiven Proben, jedoch pro Antikörper nie 2 % übersteigend [16]. Am häufigsten wurden Amphiphysin-Antikörper in 1,64 % der Serumproben gefunden, RhoGTPase-Antikörper in 1,06 % und alle weiteren in <1 %. Oberflächenantikörper wurden in dieser Studie in 1,8 % der Seren Gesunder gefunden, mit hauptsächlich NMDAR/NR1-Antikörpern in 1,2 % [16].

Weniger gut charakterisierte Oberflächenantikörper sind häufiger als gut charakterisierte.

Nicht alle neuronalen Oberflächenantikörper sind gleich gut hinsichtlich Pathogenität und klinischem Bild charakterisiert. In die Literaturanalyse wurden auch Antikörper einbezogen, deren klinische Relevanz umstritten ist oder inzwischen sogar widerlegt wurde. Beispielsweise werden VGKC-Antikörper seit der Entdeckung der spezifischen Antigene Caspr2 und Lgi1 nicht mehr als pathogen und somit als klinisch irrelevant angesehen [40]. Bei gesunden Kontrollen wurden VGKC-Antikörper in 1,1 % gefunden, am zweithäufigsten nach den ebenfalls in ihrer klinischen Relevanz umstrittenen Neurofascin-Antikörpern mit 1,37 %. In der Gruppe der Kontrollen mit Erkrankung erreichten VGKC-Antikörper sogar die höchste Prävalenz mit 6,5 %. Als gut charakterisiert gelten zum Beispiel Antikörper gegen NMDAR/NR1, AMPAR1+2, GlyR, Lgi1 und AQ4. Für diese ist ein direkter pathogener Effekt und ein zugehöriges, typisches klinisches Bild beschrieben worden ([15][37][46][61][80]). Die Prävalenz für die einzelnen, gut charakterisierten Antikörper lag in gesunden Kontrollen bei maximal 0,8 % (für NMDAR/NR1-Antikörper). Gut charakterisierte Oberflächenantikörper scheinen folglich seltener in Kontrollgruppen zu sein als weniger gut charakterisierte.

Die Prävalenz von neuronalen Oberflächenantikörpern im Kontext der assoziierten Erkrankung.

Nur 0,23 % positive Antikörpertests und maximal 0,8 % positive Ergebnisse pro Antikörper deuten auf eine geringe Prävalenz der Oberflächenantikörper bei Gesunden hin. Daraus ließe sich direkt schlussfolgern, sie seien ein guter diagnostischer Marker für Antikörperbezogene neurologische Erkrankungen. Denn ein diagnostischer Marker für eine Erkrankung tritt idealerweise nur bei Erkrankten auf und wird bei Gesunden nicht gefunden. Eine geringes Vorkommen bei Gesunden ist allerdings nur ein Aspekt und nicht alleine ausschlaggebend für die Bewertung als gutes diagnostisches Instrument. Um das zu erläutern, soll ein Vergleich zu Schilddrüsenantikörpern gezogen werden.

Laut einer großen US-Studie fanden sich Schilddrüsenantikörper gegen die Thyreoperoxidase (Anti-TPO) in 11,3 % von 16.533 Kontrollen [36]. Trotz dieses hohen prozentualen Vorkommens werden TPO-Antikörper bei oftmals diffuser Klinik oder langem subklinischem Verlauf für die Bestätigung oder den Ausschluss einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung herangezogen.

Es gibt jedoch hinsichtlich der Rolle der Antikörper zwei wesentliche Unterschiede zwischen Schilddrüsenerkrankungen und Enzephalitis: Zum einen sind Schilddrüsenerkrankungen häufig. Die Prävalenz der Hashimoto-Thyreoiditis wird mit bis zu 6 % angegeben [76], sodass die Prävalenz der Antikörper bei Gesunden etwa doppelt so hoch ist, wie die Prävalenz der Erkrankung selbst. Die Vortestwahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses ist bei häufigen Erkrankungen stets höher, als bei seltenen Erkrankungen, wie zum Beispiel den autoimmunen Enzephalitiden. Eine kürzlich erschienene epidemiologische Studie aus den USA schätzt die Prävalenz aller autoimmunen Enzephalitiden im Jahr 2014 zusammengenommen auf 0,014 % (13,7/100.000), ähnlich derjenigen der infektiösen mit 0,012 % (11,6/100.000) [22].

Zum anderen weist der TSH-Wert als vorangehender Laborparameter bereits auf eine Schilddrüsenerkrankung hin, sodass hier bereits eine Vorauswahl der als *krank* in Frage kommenden Probanden getroffen wird. Bei einem Verdacht auf eine Antikörper-vermittelte neurologische Erkrankung gibt es keinen klaren vorangehenden laborchemischen Marker. Die Liquoranalyse etwa *kann*, aber *muss nicht* auffällig sein [31][75]. Graus et al. [31] schlagen drei initiale Kriterien vor, die auf eine *mögliche* Autoimmunenzephalitis hinweisen:

1. Ein passendes klinisches Syndrom mit subakuter Wesensveränderung, Gedächtnisverlust oder psychiatrischen Symptomen.
2. Mindestens eines der folgenden Kriterien: i) zentrale, fokal neurologische Symptome, ii) neu aufgetretene epileptische Anfälle, iii) Liquorpleozytose, iv) typische Veränderungen im MRT (z.B. mesiotemporale T2-Hyperintensität bei limbischer Enzephalitis).
3. Ausschluss wichtiger Differentialdiagnosen - wegen der the-

therapeutischen Konsequenzen insbesondere infektiöser Ätiologien [31]. Hier schließt sich eine Differenzierung in ein gegebenenfalls typisches klinisches Bild sowie die Antikörperdiagnostik an. Ohne diese vorangehenden Kriterien sollte ein positiver Antikörpernachweis keine klinisch-therapeutische Konsequenz haben, ähnlich wie bei positiven TPO-Antikörpern mit normwertigem TSH.

Obwohl Schilddrüsenantikörper absolut gesehen häufig bei gesunden Probanden zu finden sind, können sie unter den Aspekten der relativ höheren Prävalenz der assoziierten Erkrankung und der Verfügbarkeit eines geeigneten vorangehenden Laborparameters als bessere diagnostische Marker als neuronale Oberflächenantikörper angesehen werden.

Wie TPO-Antikörper sind auch nAChR-Antikörper in der klinischen Diagnostik der Myasthenia gravis fest etabliert und bereits seit den 1960er Jahren bekannt. Bei der Myasthenia gravis, die mit einer Prävalenz von 7,8/100.000 sehr selten auftritt [5], findet sich jedoch eine verhältnismäßig höhere Antikörperprävalenz in Kontrollgruppen. NACHR(m) respektive nAChR(g)-Antikörper wurden in 0 respektive 0,5 % der Gesunden und in 2,1 respektive 5,58 % der Kontrollgruppe Erkrankter gefunden. Damit liegt die Häufigkeit von nAChR-Antikörpern bei Kontrollprobanden im Bereich der neuen neuronalen Oberflächenantikörper. Letztere wurden pro Antikörper in maximal 0,8 % der Gesunden (NMDAR/NR1-Antikörper) und maximal 1,59 % der Kontrollgruppe Erkrankter (Lgi1-Antikörper) gefunden.

Neuronale Antikörper scheinen in Relation zur Prävalenz der assoziierten Erkrankung insgesamt häufiger bei Kontrollen zu sein, als zum Beispiel die nicht-neuronalen Schilddrüsenantikörper. Es könnte sein, dass neuronale Antikörper allgemein häufiger in asymptomatischen Personen zu finden sind, als nicht-neuronale Antikörper. Eine Erklärung dafür könnte die Blut-Hirn-Schranke liefern, die verhindert, dass unreife B-Zellen in Kontakt mit neuronalen Antigenen treten und somit keine Toleranz gegenüber neuronalen Antigenen entwickeln [55]. Die Blut-Hirn-Schranke könnte ferner erklären, weshalb neuronale Antikörper auch in asymptomatischen Personen gefunden werden: Antikörper aus dem Serum gelangen bei intakter Blut-Hirn-Schranke nur begrenzt an ihren zentralen Wirkort. Darüber hinaus ist es denkbar, dass es für komplexe neurologische Prozesse auch verschiedene Kompensationsmechanismen gibt, sodass der Antikörpereffekt subklinisch bleibt.

6.4 Verschiedene Methoden, verschiedene Ergebnisse?

Die eigenen Assays IHC und FACS identifizierten eindeutig monoklonale NMDAR/NR1-Antikörper sowie die Antikörper in Seren von Enzephalitispatienten und scheinen damit primär geeignet für die Identifizierung von NMDAR/NR1-Antikörpern. In der Testung der gesunden MPE und KM erzielten sie jedoch unerwartet unterschiedliche Ergebnisse, ebenso im Vergleich zum validierten kommerziellen CBA. In der kommerziellen Testung waren

nur zwei Proben übereinstimmend im CBA und IHC-Assay positiv; eine KM für Antikörper gegen das intrazelluläre GFAP und eine KW für AQP4-Antikörper. Die im CBA für NMDAR/NR1-Antikörper positive KM war weder in der kommerziellen IHC, noch in der eigenen IHC, noch im eigenen FACS-Assay positiv für NMDAR/NR1-Antikörper. Umgekehrt waren die Proben mit hoher FACS-Reaktivität im CBA und in der IHC negativ für NMDAR/NR1-Antikörper.

Allgemeiner Nachteil der IHC ist, dass eine Differenzierung zwischen spezifischen Antikörpern oft nicht eindeutig möglich ist, da sich die Fluoreszenzmuster für verschiedene Oberflächenantikörper stark ähneln [79]. Zweitens kann ein charakteristisches Muster durch Interferenz parallel vorliegender neuronaler Antikörper kaschiert werden. Im eigenen IHC-Assay hoben sich intrazellulär bindende Antikörper deutlich besser von der Hintergrundreaktivität ab als Antikörper gegen Zelloberflächenstrukturen. Etwaige niedrig-titrige Oberflächenantikörper konnten möglicherweise von der Gewebereaktivität der Seren nicht abgegrenzt werden. Für die Entdeckung niedrig-titriger Antikörper in Seren scheinen daher monospezifische Assays wie CBA oder FACS besser geeignet zu sein.

Der FACS-Assay schien aufgrund der hohen Sensitivität im Bereich niedriger Antikörpertiter für monoklonale Antikörper [42][56] und der quantitativen Auswertung der Fluoreszenzsignale vielversprechend für die Testung der MPE. Jedoch zeigten viele Seren im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern und auch im Vergleich zu Seren von NMDAR-Enzephalitispatienten eine starke Reaktion mit den nicht-transfizierten HEK-Zellen. Die Fluoreszenzintensität der NR1-transfizierten Zellen unterschied sich bei den Seren im Mittel kaum vom Hintergrundsignal und lag in 22 % der Proben sogar darunter. Möglicherweise entspricht die Hintergrundfluoreszenz dem vielfältigen Antikörpervorrat in Seren gesunder Probanden, wie es auch in der IHC zu beobachten ist. Bei Patienten mit NMDAR-Enzephalitis dagegen kann angenommen werden, dass der pathogene NMDAR/NR1-Antikörper vorrangig produziert wird, mengenmäßig gegenüber anderen monospezifischen Antikörpern überwiegt und sich damit vom Hintergrund abhebt.

Außer der Hintergrundfluoreszenz der Seren im FACS-Assay, sind die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen FACS und kommerziellem CBA sicherlich auch durch zahlreiche methodische Unterschiede zwischen den Assays bedingt. Beide Assays wurden mit transfizierten HEK-Zellen durchgeführt. Jedoch wurden im CBA ausschließlich transfizierte Zellen auf einem Chip verwendet, wohingegen im FACS-Assay transfizierte und nicht-transfizierte Zellen in einem Ansatz vermischt waren. Die Interferenz mit nicht-transfizierten Zellen stellte demnach im CBA keine Herausforderung dar. Die Zellen wurden im kommerziellen Assay fixiert, die Zellen des FACS-Assays blieben in unfixierter Lösung. Des Weiteren bestanden Unterschiede hinsichtlich Verdünnung und Inkubationszeit. Im kommerziellen Assay wurden die Seren 1:10 verdünnt, im FACS-Assay 1:200. Im CBA wurden Erst- und Zweitantikörper

für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, im FACS-Assay betrug die Zeit 45 Minuten für den Erstantikörper und 20 Minuten auf Eis für den Zweitantikörper.

Mit dem Zweitantikörper wurde im CBA ein grün fluoreszierendes Fluorchrom und im FACS ein rot fluoreszierendes Fluorchrom verwendet. Auch die Auswertung nach der Fluoreszenzintensität war unterschiedlich: im CBA zählt die Fluoreszenz weniger Zellen, die semiquantitativ und untersucherabhängig beurteilt wurde. Im FACS wurde der Median der Fluoreszenzintensität jeder einzelnen Zelle eines Probenansatzes gemessen. Die Auswahl der Zellen wurde durch vorangehendes Gating bestimmt, sodass die stärkste Fluoreszenzintensität nicht automatisch in die Beurteilung mit einging oder sogar von der Fluoreszenzintensität der transfizierten Zellen abgezogen wurde, wenn es von einer nicht-transfizierten Zelle ausgeht. Diese zahlreichen Unterschiede können, müssen aber nicht, relevant für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Um diese Frage zu beantworten, müssen beide Assays systematisch gegeneinander validiert werden.

Die divergierenden Ergebnisse könnten auch im Studienkollektiv begründet sein. Hier wurde ein Kollektiv ohne klinische Symptome getestet. Es kann also davon ausgegangen werden, dass, falls Antikörper vorliegen, diese eher niedrige Titer aufweisen oder mit niedriger Affinität an das Antigen binden. Die verfügbaren Tests, auch der CBA, sind nicht für die Entdeckung niedrig-titriger oder niedrig-affiner Antikörper in einem gesunden Kollektiv etabliert worden. CBAs wiesen in der Literatur die niedrigste Positivrate bei Kontrollprobanden auf. NMDAR/NR1-Antikörper wurden mittels CBA gemäß Literaturrecherche in 1,1 % der Kontrollen gefunden. Mit IHC, ELISA, FIPA oder Westernblot waren in der Literatur 4,8 % der Kontrollen positiv und im eigenen FACS-Assay 4,9 % der gesunden Mütter (MPE und KM). Dies kann einerseits auf eine erhöhte Rate falsch-positiver Ereignisse im FACS oder anderen Nichtstandardassays hindeuten, oder aber auf eine höhere Sensitivität bei niedrigen Antikörpertitern. Die Messreihen mit monoklonalen Antikörpern sprechen bei den eigenen FACS-Assays für Letzteres.

Obwohl sich CBAs mit der Entwicklung kommerzieller Testsysteme mit Biochips in der Diagnostik der neuronalen Antikörper als Standard etabliert haben, weisen IHC und FACS-Assays auch Vorteile auf, sodass ihre Anwendung auch weiterhin von Bedeutung ist. Die IHC ist für das Screening auf noch unbekannte Antigene geeignet [59]. Der FACS-Assay hat den Vorteil der Quantifizierung der Signale, ohne wie im CBA semiquantitativ mit Verdünnungsreihen arbeiten zu müssen, ist weniger untersucherabhängig und verspricht eine gute Sensitivität im Bereich niedriger Titer. Da sowohl die IHC als auch der FACS-Assay gut für monoklonale Antikörper funktionierten, wäre es interessant, diese Assays für Seren zu optimieren und insbesondere für Seren Gesunder und niedrige Titer zu evaluieren.

6.5 Interpretation der seropositiven Ergebnisse in der eigenen Kohorte

Hohe Prävalenz von GlyR-Antikörpern.

In der eigenen Kohorte waren GlyR-Antikörper mit 6,4 % der 110 KM auffällig häufig. In der Literatur waren dagegen nur 0,1 % der 1.960 gesunden und 0,13 % der psychiatrisch erkrankten Probanden positiv für Anti-GlyR. Darunter war eine große Kohorte Gesunder mit einer Prävalenz von 0,06 % (eine positive Probe von 1.703) [16], sodass in der Analyse der gesamten verfügbaren Literatur auch keine Verzerrung durch viele kleine negative Kohorten vorlag. Eine Studie fand jedoch eine hohe Prävalenz von GlyR-Antikörpern, nämlich in 20 % von 65 Probanden mit Lungenkarzinom ohne neurologische Symptome, sodass die Autoren dieser Studie von einer geringen Spezifität der GlyR-Antikörper für eine autoimmune Enzephalitis ausgingen [2]. Außerdem wurden GlyR-Antikörper in Kontrollen mit Epilepsie, demyelinisierenden Erkrankungen, Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom, in Zusammenhang mit anderen Oberflächenantikörpern und selten auch bei psychotischen Patienten gefunden [51].

Trotz dieser Häufung bei Kontrollen gehören GlyR-Antikörper zu den gut charakterisierten Oberflächenantikörpern. Sie wurden erstmalig 2008 bei einem 54-jährigen Mann mit progressiver Enzephalomyelitis mit Rigidität und Myoklonus (PERM) ohne Tumornachweis beschrieben. PERM gilt nach wie vor als Hauptmanifestation der Anti-GlyR-vermittelten Erkrankung mit etwa 50 % Antikörper-positiven Patienten. Außerdem treten auch das Stiff-Person-Syndrom und Enzephalopathien Anti-GlyR-assoziiert auf [11][15]. Eine klinische Charakterisierung von 45 Anti-GlyR-positiven Patienten ergab ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis, ein Auftreten in allen Altersgruppen und eine Tumorassoziation in 20 %, v.a. mit Brustkrebs und Thymom [11]. Eine pathogenetische Funktion dieses Antikörpers galt von Anfang an als wahrscheinlich, da die PERM dem klinischen Bild der hereditären Hyperekplexien ähneln und letzteren eine Mutation im Glyzinrezeptor zugrunde liegt [15] [38]. 2019 konnten Crisp et al. hierfür einen Pathomechanismus nachweisen. Die Antikörper unterbrechen unmittelbar die glyzinerge Neurotransmission, sodass die Autoren von einem direkten Antagonismus ausgehen (anders als bei NMDAR/NR1-Antikörpern, deren Effekt nach Internalisierung und Rezeptorabbau erst verzögert nachzuweisen ist [15][37]). Glyzinrezeptoren sind im Hirnstamm und Myelon lokalisiert und vermitteln das maßgebliche inhibitorische System. Die Symptome der PERM können als Dysfunktion des inhibitorischen Systems gedeutet werden [15]. Dabei scheint der Schweregrad des klinischen Verlaufs mit Titerhöhe und Effektivität der Antikörper direkt zu korrelieren. Ein Patient mit mildereren Symptomen wies niedrigere Titer auf und dessen Antikörper bewirkten die geringste Reduktion der glyzineren Ströme [15].

Die sieben GlyR-Antikörper-positiven KM waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme 36 bis 53 Jahre alt. In einer der Proben lag der Antikörpertiter bei 1:320, in allen anderen

bei 1:10. Verglichen dazu variierten die Titer bei Anti-GlyR-positiven Patienten von 1:50 bis 1:60.000 [11]. Alle Kinder der sieben Probandinnen blieben auch bis 2020 neuropsychiatrisch gesund. Interessanterweise entwickelte die Probandin mit dem höheren Titer 1,5 Jahre nach der Blutentnahme ein Mammakarzinom (die Vorgeschichte war bis auf eine Magenbandoperation, welches anschließend wieder entfernt wurde, und die regelmässige Einnahme eines Eisenpräparates unauffällig). Vor dem Hintergrund der hohen Prävalenz von GlyR-Antikörpern bei Tumorpatienten in der Literatur, ist auch hier ein solcher Zusammenhang denkbar. Allerdings wurde bei keiner weiteren Anti-GlyR-positiven Probandin bis 2020 ein Malignom diagnostiziert. Eine der KM entwickelte einige Monate nach der Blutentnahme eine Gürtelrose und die Erstdiagnose einer Hashimoto-Thyreoiditis wurde gestellt. Eine weitere KM ist gleichzeitig positiv für NMDAR/NR1-Antikörper, jeweils mit niedrigem Titer und ohne Besonderheiten in der Anamnese bis auf die Einnahme von Ramipril bei Bluthochdruck. Bei den drei übrigen GlyR-Antikörper-positiven Probandinnen konnten außer einem Vitamin-D-Mangel und einem Abort ebenfalls keine Besonderheiten eruiert werden, sodass hier am ehesten von klinisch nicht relevanten Antikörpern ausgegangen werden kann oder hier ein falsch-positives Testergebnis vorliegt.

Ein längeres klinisches Follow-up und eine serielle Bestimmung der Antikörper wäre bei den GlyR-Antikörper-positiven Probandinnen interessant, um die klinische Bedeutung niedrigtitriger GlyR-Antikörper als paraneoplastische Marker zu ergründen.

Neuronale Antikörper bei Kontrollen als Risikofaktor oder Prädiktor einer Erkrankung?

Im Gegensatz zu GlyR-Antikörpern steht für paraneoplastische Antikörper fest, dass diese bereits vor dem Tumor nachweisbar sein können. Beim Nachweis eines gut charakterisierten paraneoplastischen Antikörpers mit >95 % Tumorassoziation und gesichertem paraneoplastischen Syndrom werden deshalb halbjährige Kontrollen mit Tumorsuche über vier Jahre empfohlen [20]. Unter den hier nachgewiesenen Antikörpern gelten nur Recoverin-Antikörper als gut charakterisiert. Sie sind mit einer Retinopathie vor allem im Rahmen eines kleinzelligen Lungenkarzinoms assoziiert [20]. Die Anti-Recoverin-positive KM-Probe wies einen niedrigen Titer von 1:32 auf. Die Probandin, eine gesunde Nichtraucherin, hatte bis Ende 2020 kein Lungenkarzinom oder sonstige maligne Erkrankung entwickelt.

Die weiteren hier nachgewiesenen Antikörper gegen die intrazellulären Antigene Neurochondrin, ITPR1, GFAP und RhoGTPase traten mit deutlich höherem Titer auf, 1:320 (n=4) und 1:100 (n=2). Die Anti-GFAP-positive sowie eine der beiden Anti-ITPR-1-positiven Seren wurden auch immunhistochemisch bestätigt. Beide richteten sich gegen relativ neue Antigene, ITPR1-Antikörper wurden 2014 und GFAP-Antikörper 2016 erstbeschrieben [41][69]. Die ITPR1-Antikörper-vermittelte Erkrankung präsentiert sich mit zerebellärer Ataxie, bis-

her ohne Tumorassoziation [41]. Das klinische Bild zu GFAP-Antikörpern heißt *autoimmune GFAP-Astrozytopathie* und geht mit Enzephalopathie, Myelitis, Sehstörungen und in einem Drittel der Fälle mit verschiedenen Tumoren einher, überwiegend Ovarialteratomen [69]. Zu beiden gibt es allerdings erst wenige klinische Fälle. Keine der hier untersuchten Probandinnen hatte zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein bekanntes Tumorgeschehen, jedoch wurde bei der 45-jährigen KM mit GFAP-Antikörpern (sowohl im CBA als auch in der IHC) noch im selben Jahr ein tubuläres Adenom im Zökum festgestellt.

Abgesehen von der GlyR-Antikörper-positiven Probe mit Mammakarzinom, konnte bei keiner der Antikörper-positiven Proben nachträglich eine entsprechende Klinik oder Tumorentwicklung festgestellt werden.

Wie lassen sich die positiven Antikörperbefunde interpretieren? Ein möglicher Ansatz wäre, bei atypischer Klinik eine Bestätigung durch ein zweites Testverfahren zu verlangen [52][70] und ansonsten von einem falsch-positiven Ergebnis auszugehen. Unter dieser Annahme wäre neben der erwähnten Probe mit GFAP-Antikörpern nur die AQP4-Antikörper-positiv Probe richtig-positiv. Die Probandin mit AQP4-Antikörpern war zwei Jahre nach der Blutentnahme eine 23-jährige vollständig gesunde junge Frau ohne Medikamenteneinnahme.

Weiter ist es denkbar, dass die pathogenen Antikörper in asymptomatischen Probanden subklinische Veränderungen verursachen. Für andere Antikörper-vermittelte Erkrankungen ist dies bereits bekannt. Die meisten Hypothyreosen vom Typ Hashimoto werden heutzutage über Antikörper, den TSH-Wert und Schilddrüsenultraschall diagnostiziert, noch bevor die Patienten symptomatisch werden. Ebenfalls wurden bei Patienten mit Transglutaminase-Antikörpern ohne klinische Zeichen einer Zöliakie bereits schwere duodenale Läsionen festgestellt [52][77]. Um subklinische Situationen bereits mit einer Diagnose zu belegen, sollte sich zumindest eine präventive oder therapeutische Konsequenz ergeben. Dies ist sowohl bei der Hashimoto-Thyreoiditis, als auch im Falle der Veränderungen der Dünndarmmukosa gegeben. Im Falle der autoimmunen Enzephalitiden sind für symptomfreie Probanden keine pathologischen Muster bekannt, die über MRT oder EEG-Untersuchungen darstellbar wären. Therapeutische Konsequenzen im präsymptomatischen Stadium sind, solange es keine spezifische nebenwirkungsarme Therapie gibt, sondern nur breit ansetzende Immuntherapien, vorerst nicht denkbar. Dennoch sind subklinische Veränderungen eine plausible Theorie für die Effekte der Antikörper bei Gesunden. Der Nachweis pathogener Antikörper wäre dann ein Risikofaktor für die Entwicklung der assoziierten Erkrankung.

Ferner ist es möglich, dass die Antikörper zwar vorhanden sind, jedoch nicht das Zielantigen erreichen. Ein sogenannter *second hit* ist für den Eintritt der pathologischen Wirkung erforderlich. Bei Erkrankungen des ZNS wird hier zuvorderst die Integrität der Bluthirnschranke angeführt. Antikörper im Serum wären dieser Annahme zufolge Risikofaktoren,

die im Falle einer Inflammation oder eines Traumas in ausreichender Zahl ins ZNS übertreten oder Antikörper-produzierende B-Zellen des ZNS stimulieren können. In beiden Fällen prädisponieren die vorliegenden Antikörper dazu, später zu erkranken.

6.6 Antikörper bei Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung - uneindeutige Datenlage

Sowohl die Angaben in der Literatur, als auch die Ergebnisse der Antikörpertestungen der eigenen Kohorte sind uneinheitlich in Bezug auf Antikörper als Ursache kinder- und jugendpsychiatrischer Störungen. Die Ergebnisse des kommerziellen CBA zeigten bei 122 MPE keine Häufung neuronaler Oberflächenantikörper im Vergleich zu Kontrollmüttern. Die wenigen in der Literatur dazu verfügbaren Daten berichteten teilweise von einer sehr hohen Prävalenz von im CBA nachgewiesenen Caspr2-Antikörpern bei Müttern von Autisten: in 37 % von 53 Seren, die immunhistochemisch neuronale Antikörper aufwiesen sowie in 17 % von 63 Seren, die immunhistochemisch nicht reaktiv waren [9]. Eine solch hohe Prävalenz von Caspr2-Antikörpern konnte bisher nicht reproduziert werden. In der hier durchgeführten Literaturanalyse waren nur 0,2 % der Gesunden und knapp 3 % der Kontrollgruppe Erkrankter positiv für Caspr2-Antikörper. In der eigenen klinischen Kohorte mit 122 MPE, darunter 8 Mütter von Autisten, und 131 weiblichen Kontrollen wurden keine Caspr2-Antikörper gefunden. Auch Coutinho et al. konnten in nur einem Serum von 95 Müttern von Autisten Caspr2-Antikörper nachweisen [14]. Das Besondere an letzterer Studie ist, dass dabei Seren von Schwangeren im ersten Trimester untersucht wurden, also zu einem pathogenetisch relevanten Zeitpunkt. Bei Müttern von Autisten waren in dieser Studie neuronale Antikörper nicht häufiger [14].

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zwar nicht auf Caspr2-Antikörper, jedoch auf zwei weitere mögliche Pathogene für die Hirnentwicklung hin: NMDAR/NR1- und GABA_BR-Antikörper.

NMDAR/NR1-Antikörper als mögliche Ursache für neuropsychiatrische Entwicklungsstörungen.

Entgegen der Ergebnisse des kommerziellen CBAs, zeigten neun Seren der MPE (7,5 %) und zwei KM (1,9 %) im FACS-Assay NMDAR/NR1-Antikörper. In der Literatur wurden NMDAR/NR1-Antikörper etwas häufiger bei Müttern von Kindern mit mentaler Retardierung oder psychologischer Entwicklungsstörung gefunden, als bei Müttern von Kindern ohne diese Diagnosen, wobei der Unterschied nicht signifikant war (NMDAR/NR1-Antikörper in 10 vs. 9/171) [14]. Aufgrund der wichtigen Rolle für die Hirnentwicklung und entsprechend den pathologischen Veränderungen, die NMDAR/NR1-Antikörper in unserem Mausmodell

hervorgerufen haben [42], könnten einige der neuropsychiatrischen Diagnosen der Kinder unserer MPE-Kohorte durch NMDAR/NR1-Antikörper bedingt sein.

GABA_BR-Antikörper als mögliche Ursache für neuropsychiatrische Entwicklungsstörungen.

In unserer Kohorte der MPE fand sich eine Anti-GABA_BR-positive Mutter eines autistischen Kindes. Die Mutter war zum Zeitpunkt der Blutentnahme 27 Jahre jung und wies einen niedrigen Titer von 1:10 auf. GABA_BR-Antikörper zählen insgesamt zu den selteneren neuronalen Oberflächenantikörpern mit gemäß Literaturanalyse keiner positiven Probe in Gesunden und einer Prävalenz von 0,63 % in der Kontrollgruppe Erkrankter. Bisher wurde noch keine Assoziation zwischen GABA_BR-Antikörpern und neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen bei den Nachkommen diskutiert. Bei sehr niedrigem Titer der hier getesteten MPE ist auch zweifelhaft, ob diese als relevant für die Autismusgenese des Kindes angesehen werden können. Pathophysiologisch wäre ein Einfluss der GABA_BR-Antikörper auf die Hirnentwicklung aber plausibel. GABA ist der vorrangige Neurotransmitter des inhibitorischen Systems. GABA_B-Rezeptoren sind im ZNS weit verbreitet, mit hoher Dichte in Hippocampus, Thalamus und Zerebellum [48]. Wie NMDA-Rezeptoren spielen sie eine basale Rolle in der Hirnentwicklung, der Ausbildung von Synapsen, der Zellproliferation sowie der Migration von Neuronen [6]. Eine Beeinflussung der Hirnentwicklung durch GABA_BR-Antikörper mit Prädisposition für neuropsychiatrische Störungen, kann somit analog zu den NMDAR/NR1- oder Caspr2-Antikörpern angenommen werden. Auch im klinischen Kontext wurden bei psychiatrischen Erkrankungen wie Autismus und Schizophrenie Veränderungen der Funktion oder Anzahl der GABA_B-Rezeptoren beschrieben [35].

Eine Korrelation zwischen Antikörper und Krankheitsbild scheint bisher nicht zu bestehen. Caspr2-Antikörper wurden einerseits mit Autismus [9], andererseits mit mentaler Retardierung ohne Autismus [14] in Verbindung gebracht. In unserem Mausmodell zeigten die Nachkommen der Anti-NMDAR/NR1-exponierten Muttertiere phänotypische Züge, die mit verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen assoziiert sind [42]. Es ist denkbar, dass die Antikörper die Hirnentwicklung auf einem basalen Level stören, die in einer Suszeptibilität für verschiedene neuropsychiatrische Störungen mündet. Die genaue Ausprägung müsste durch weitere molekulare Gegebenheiten oder Umweltfaktoren erklärt werden.

Theoretische Überlegungen zur grundlegenden Funktion der Antikörper für die Hirnentwicklung sowie eindruckliche Daten aus der tierexperimentellen Forschung [9][42] bestärken die Hypothese, dass maternale neuronale Antikörper zu neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen führen. Die epidemiologischen Daten sind allerdings bisher nicht eindeutig. Die Häufigkeit möglicher Antikörperkandidaten variiert in verschiedenen Kohorten [9][14]. In der

eigenen Kohorte wurden mit unterschiedlichen Tests unterschiedliche Ergebnisse erzielt.

Dies kann einerseits bedeuten, dass die bestehenden Antikörpertests für asymptomatische Patienten mit vermutlich niedrigen Titern nicht geeignet sind. Für einen Einfluss auf die fetale Hirnentwicklung könnten niedrige Level allerdings ausreichen, da mütterliche IgG-Antikörper durch aktiven Plazentatransfer im fetalen Kreislauf angereichert werden und damit auch niedrige maternale Level zu einer ausreichend hohen Konzentration im Fötus führen können. Andererseits lässt sich daraus schließen, dass MPE nicht grundsätzlich eine Gruppe mit besonders hoher Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper sind. Möglicherweise kann nur ein kleiner Teil der neuropsychiatrischen Störungen durch maternale Antikörper erklärt werden. Gegebenenfalls müsste eine bestimmte Subgruppe genauer betrachtet werden, zum Beispiel Mütter mit Autoimmunerkrankungen. Diese haben sowohl eine generelle Neigung zur Antikörperproduktion, als auch ein höheres Risiko für Kinder mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung [26]. Da Oberflächenantikörper in allen Studien auch bei Kontrollmüttern gefunden wurden, müssen zusätzliche Faktoren vorhanden sein, damit die Kinder später neuropsychiatrisch auffällig werden. Dies könnten zusätzliche proinflammatorische Zytokine sein, die die Antikörperwirkung in utero erst ermöglichen [14] oder auch postnatale Umweltfaktoren, die in beide Richtungen, schädigend oder protektiv, die neuropsychiatrische Entwicklung der Kinder beeinflussen.

6.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper bei Gesunden, die im Bereich von unter 1 % liegt und damit vergleichbar mit der Prävalenz der langjährig etablierten nAChR-Antikörpern ist. Unter diesem epidemiologischen Aspekt können diese neuen neuronalen Oberflächenantikörper als diagnostische Marker geeignet sein. Darüber hinaus existiert bereits für viele Oberflächenantikörper der Nachweis eines pathophysiologischen Mechanismus und ein dazu passendes klinisches Bild. Unter der Berücksichtigung der Klinik und von Zusatzuntersuchungen wie Liquoranalyse, EEG oder MRT kann bei positivem Antikörperbefund von einer Oberflächenantikörper-bezogenen Erkrankung ausgegangen werden; unter dem Vorbehalt, dass bei ungeklärter klinischer oder pathogenetischer Relevanz eines Antikörpers, ein positives Antikörperergebnis sorgfältiger interpretiert werden sollte [22].

Allerdings wären weitere Studien mit großen Kontrollkohorten, verblindeter Antikörpertestung sowie dem Einschluss von mehr Liquorproben von Kontrollprobanden wünschenswert [52], um die einzelnen neuronalen Oberflächenantikörper hinsichtlich ihrer Spezifität und pathogenetischen Funktion belastbar beurteilen zu können. Um die Verdachtsdiagnose einer autoimmunen Enzephalitis sicher zu bestätigen, erfordert der Antikörpertest darüberhinaus

auch eine hohe Sensitivität. Um ein vollständiges Bild der diagnostischen Wertigkeit der Antikörpertests zu erlangen, müssen die Ergebnisse dieser Arbeit durch Untersuchungen mit Fokus auf das Patientenkollektiv ergänzt werden.

Die Antikörpertestungen des hier aufgebauten Kollektivs erzielten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Hypothese, Oberflächenantikörper seien häufiger bei Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung: Im FACS-Assay, jedoch nicht im CBA, konnte eine Häufung von NMDAR/NR1-Antikörpern bei Müttern neuropsychiatrisch auffälliger Kinder gefunden werden. Bei gutem theoretischem Fundament und guter tierexperimenteller Datenlage wäre es sinnvoll, die Hypothese weiterzuverfolgen. Da neuronale Oberflächenantikörper deutlich seltener zu sein scheinen, als die Prävalenz psychisch auffälliger Kinder (20 % in Deutschland [44]), ist davon auszugehen, dass maximal eine Subgruppe der kinder- und jugendpsychiatrischen Diagnosen durch maternale Antikörper erklärt werden kann.

Das Studienkollektiv sollte in zukünftigen Studien gezielt ausgewählt werden: etwa Mütter von Autisten oder Mütter mit Autoimmunerkrankungen und psychisch auffälligen Kindern. Da hier eine GABA_B-Antikörper-positive Mutter eines Autisten identifiziert wurde, wäre eine tierexperimentelle Studie zu dem Effekt von GABA_B-Antikörpern auf die fetale Hirnentwicklung interessant. Schließlich ist es für diese Fragestellung wesentlich, Assays für niedrige Titer aus dem Serum Gesunder zu optimieren. Diese zu bestimmen, ist vermutlich vor allem durch die Interferenz vieler verschiedener, in ähnlicher Menge vorliegender Antikörper erschwert. Der hier erstmals für Seren angewendete FACS-Assay ist für monoklonale Antikörper vielversprechend zur Identifizierung niedrig-titriger Antikörper. Höhere Anti-NMDAR/NR1-Titer in MPE als in KM bestärken im klinischen Kontext die bestehenden tierexperimentellen Daten zur Rolle von maternalen NMDAR/NR1-Antikörpern für die Entstehung neuropsychiatrischer Entwicklungsstörungen [42]. Jedoch muss der FACS-Assay für Seren hinsichtlich des Hintergrundsignals verbessert und gegen den bisherigen Standard des CBA validiert werden.

Das Forschungsfeld zu neuronalen Oberflächenantikörpern ist vor dem Hintergrund bestehender epidemiologischer sowie tierexperimenteller Daten ein vielversprechendes Gebiet. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit (i) den Bedarf an weiteren Studien, insbesondere mit systematischem Einschluss gesunder Kontrollen und Liquorproben, (ii) mögliche technische Schwierigkeiten in der Testung von Seren Gesunder sowie (iii) nicht eindeutige Ergebnisse hinsichtlich der Antikörperprävalenz bei MPE. Daher ist weitere Forschung sowohl zur Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper im Hinblick auf die Diagnostik von Enzephalitiden als auch zu maternalen neuronalen Oberflächenantikörpern als Ursache neuropsychiatrischer Entwicklungsstörungen lohnens- und erstrebenswert.

7 Literatur

- [1] Armangue T, Moris G, Cantarín-Extremera V, Conde CE, Rostasy K, Erro ME, Portilla-Cuenca JC, Turón-Viñas E, Málaga I, Muñoz-Cabello B, Torres-Torres C, Llufríu S, González-Gutiérrez-Solana L, González G, Casado-Naranjo I, Rosenfeld M, Graus F, Dalmau J; Spanish Prospective Multicentric Study of Autoimmunity in Herpes Simplex Encephalitis. Autoimmune post-herpes simplex encephalitis of adults and teenagers. *Neurology*. 2015 Nov 17;85(20):1736-43. doi: 10.1212/WNL.0000000000002125. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26491084; PMCID: PMC4653102.
- [2] Armangué T, Sabater L, Torres-Vega E, Martínez-Hernández E, Ariño H, Petit-Pedrol M, Planagumà J, Bataller L, Dalmau J, Graus F. Clinical and Immunological Features of Opsoclonus-Myoclonus Syndrome in the Era of Neuronal Cell Surface Antibodies. *JAMA Neurol*. 2016 Apr;73(4):417-24. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.4607. PMID: 26856612; PMCID: PMC5823978.
- [3] Bagasrawala I, Memi F, V Radonjic N, Zecevic N. N-Methyl d-Aspartate Receptor Expression Patterns in the Human Fetal Cerebral Cortex. *Cereb Cortex*. 2017 Nov 1;27(11):5041-5053. doi: 10.1093/cercor/bhw289. PMID: 27664962; PMCID: PMC6077866.
- [4] Bergink V, Armangue T, Titulaer MJ, Markx S, Dalmau J, Kushner SA. Autoimmune Encephalitis in Postpartum Psychosis. *Am J Psychiatry*. 2015 Sep 1;172(9):901-8. doi: 10.1176/appi.ajp.2015.14101332. Epub 2015 Jul 17. PMID: 26183699; PMCID: PMC4854531.
- [5] Binks S, Vincent A, Palace J. Myasthenia gravis: a clinical-immunological update. *J Neurol*. 2016 Apr;263(4):826-34. doi: 10.1007/s00415-015-7963-5. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26705120; PMCID: PMC4826656.
- [6] Bolton MM, Heaney CF, Murtishaw AS, Sabbagh JJ, Magcalas CM, Kinney JW. Postnatal alterations in GABAB receptor tone produce sensorimotor gating deficits and protein level differences in adulthood. *Int J Dev Neurosci*. 2015 Apr;41:17-27. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.10.001. Epub 2014 Oct 12. PMID: 25314921.
- [7] Boronat A, Gelfand JM, Gresa-Arribas N, Jeong HY, Walsh M, Roberts K, Martínez-Hernández E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Graus F, Rudy B, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to dipeptidyl-peptidase-like protein-6, a subunit of Kv4.2 potassium channels. *Ann Neurol*. 2013 Jan;73(1):120-8. doi: 10.1002/ana.23756. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23225603; PMCID: PMC3563722.

- [8] Brilot F, Dale RC, Selter RC, Grummel V, Kalluri SR, Aslam M, Busch V, Zhou D, Cepok S, Hemmer B. Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in children with inflammatory demyelinating central nervous system disease. *Ann Neurol*. 2009 Dec;66(6):833-42. doi: 10.1002/ana.21916. PMID: 20033986.
- [9] Brimberg L, Mader S, Jeganathan V, Berlin R, Coleman TR, Gregersen PK, Huerta PT, Volpe BT, Diamond B. Caspr2-reactive antibody cloned from a mother of an ASD child mediates an ASD-like phenotype in mice. *Mol Psychiatry*. 2016 Dec;21(12):1663-1671. doi: 10.1038/mp.2016.165. Epub 2016 Oct 4. PMID: 27698429; PMCID: PMC5583730.
- [10] Busse S, Busse M, Brix B, Probst C, Genz A, Bogerts B, Stoecker W, Steiner J. Seroprevalence of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDA-R) autoantibodies in aging subjects without neuropsychiatric disorders and in dementia patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2014 Sep;264(6):545-50. doi: 10.1007/s00406-014-0493-9. Epub 2014 Mar 7. PMID: 24604707.
- [11] Carvajal-González A, Leite MI, Waters P, Woodhall M, Coutinho E, Balint B, Lang B, Pettingill P, Carr A, Sheerin UM, Press R, Lunn MP, Lim M, Maddison P, Meinck HM, Vandenberghe W, Vincent A. Glycine receptor antibodies in PERM and related syndromes: characteristics, clinical features and outcomes. *Brain*. 2014 Aug;137(Pt 8):2178-92. doi: 10.1093/brain/awu142. Epub 2014 Jun 20. Erratum in: *Brain*. 2014 Dec;137(Pt 12):e315. Press, Raomand [corrected to Press, Rayomand]. PMID: 24951641; PMCID: PMC4107739.
- [12] van Coevorden-Hameete MH, de Graaff E, Titulaer MJ, Hulsenboom E, Sabater L, Hoogenraad CC, Sillevs Smitt PA. Plasticity-related gene 5: A novel surface autoantigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015 Sep 24;2(5):e156. doi: 10.1212/NXI.0000000000000156. PMID: 26445730; PMCID: PMC4582903.
- [13] van Coevorden-Hameete MH, Titulaer MJ, Schreurs MW, de Graaff E, Sillevs Smitt PA, Hoogenraad CC. Detection and Characterization of Autoantibodies to Neuronal Cell-Surface Antigens in the Central Nervous System. *Front Mol Neurosci*. 2016 May 31;9:37. doi: 10.3389/fnmol.2016.00037. PMID: 27303263; PMCID: PMC4885853.
- [14] Coutinho E, Jacobson L, Pedersen MG, Benros ME, Nørgaard-Pedersen B, Mortensen PB, Harrison PJ, Vincent A. CASPR2 autoantibodies are raised during pregnancy in mothers of children with mental retardation and disorders of psychological development but not autism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017 Sep;88(9):718-721. doi: 10.1136/jnnp-2016-315251. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28572274; PMCID: PMC5561372.

- [15] Crisp SJ, Dixon CL, Jacobson L, Chabrol E, Irani SR, Leite MI, Leschziner G, Slaughter SJ, Vincent A, Kullmann DM. Glycine receptor autoantibodies disrupt inhibitory neurotransmission. *Brain*. 2019 Nov 1;142(11):3398-3410. doi: 10.1093/brain/awz297. PMID: 31591639; PMCID: PMC6821286.
- [16] Dahm L, Ott C, Steiner J, Stepniak B, Teegen B, Saschenbrecker S, Hammer C, Borowski K, Begemann M, Lemke S, Rentzsch K, Probst C, Martens H, Wienands J, Spalletta G, Weissenborn K, Stöcker W, Ehrenreich H. Seroprevalence of autoantibodies against brain antigens in health and disease. *Ann Neurol*. 2014 Jul;76(1):82-94. doi: 10.1002/ana.24189. Epub 2014 Jun 23. PMID: 24853231.
- [17] Dale RC, Merheb V, Pillai S, Wang D, Cantrill L, Murphy TK, Ben-Pazi H, Varadkar S, Aumann TD, Horne MK, Church AJ, Fath T, Brilot F. Antibodies to surface dopamine-2 receptor in autoimmune movement and psychiatric disorders. *Brain*. 2012 Nov;135(Pt 11):3453-68. doi: 10.1093/brain/awz256. Epub 2012 Oct 11. PMID: 23065479.
- [18] Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, Baehring JM, Shimazaki H, Koide R, King D, Mason W, Sansing LH, Dichter MA, Rosenfeld MR, Lynch DR. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol*. 2007 Jan;61(1):25-36. doi: 10.1002/ana.21050. PMID: 17262855; PMCID: PMC2430743.
- [19] Dalton P, Deacon R, Blamire A, Pike M, McKinlay I, Stein J, Styles P, Vincent A. Maternal neuronal antibodies associated with autism and a language disorder. *Ann Neurol*. 2003 Apr;53(4):533-7. doi: 10.1002/ana.10557. PMID: 12666123.
- [20] Deutsche Gesellschaft für Neurologie e.V.. S1-Leitlinie "Paraneoplastische neurologische Syndrome"[Internet]. Berlin: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.; 2012 Sept [updated 2015 Jan; cited 2020 Dec 10]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-064l_S1_Paraneoplastische_neurologische_Syndrome-2015-abgelaufen.pdf
- [21] Doss S, Wandinger KP, Hyman BT, Panzer JA, Synofzik M, Dickerson B, Mollenhauer B, Scherzer CR, Ivinson AJ, Finke C, Schöls L, Müller Vom Hagen J, Trenkwalder C, Jahn H, Höltje M, Biswal BB, Harms L, Ruprecht K, Buchert R, Höglinger GU, Oertel WH, Unger MM, Körtvélyessy P, Bittner D, Priller J, Spruth EJ, Paul F, Meisel A, Lynch DR, Dirnagl U, Endres M, Teegen B, Probst C, Komorowski L, Stöcker W, Dalmau J, Prüss H. High prevalence of NMDA receptor IgA/IgM antibodies in different dementia types. *Ann Clin Transl Neurol*. 2014 Oct;1(10):822-32. doi: 10.1002/acn3.120. Epub 2014 Oct 18. PMID: 25493273; PMCID: PMC4241809.

- [22] Dubey D, Pittock SJ, Kelly CR, McKeon A, Lopez-Chiriboga AS, Lennon VA, Gadoth A, Smith CY, Bryant SC, Klein CJ, Aksamit AJ, Toledano M, Boeve BF, Tillema JM, Flanagan EP. Autoimmune encephalitis epidemiology and a comparison to infectious encephalitis. *Ann Neurol*. 2018 Jan;83(1):166-177. doi: 10.1002/ana.25131. PMID: 29293273; PMCID: PMC6011827.
- [23] EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG. Allgemeine Anleitung für einen indirekten Immunfluoreszenztest von EUROIMMUN [Internet]. Lübeck: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG; 2017 [cited 2017 Jan 31]. Available from: <https://www.euroimmun.de/de/produkte/nachweismethoden/iift/>
- [24] Fluorescence SpectraViewer [Internet]. [place unknown] Thermo Fisher Scientific; 2021 [cited 2021 Jan 9]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html/>
- [25] Gadoth A, Pittock SJ, Dubey D, McKeon A, Britton JW, Schmeling JE, Smith A, Kotsenas AL, Watson RE, Lachance DH, Flanagan EP, Lennon VA, Klein CJ. Expanded phenotypes and outcomes among 256 LGI1/CASPR2-IgG-positive patients. *Ann Neurol*. 2017 Jul;82(1):79-92. doi: 10.1002/ana.24979. PMID: 28628235.
- [26] Gata-Garcia A, Diamond B. Maternal Antibody and ASD: Clinical Data and Animal Models. *Front Immunol*. 2019 May 28;10:1129. doi: 10.3389/fimmu.2019.01129. PMID: 31191521; PMCID: PMC6547809.
- [27] Göbel K, Baumgarten F, Kuntz B, Hölling H, Schlack R. ADHS bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. *Journal of Health Monitoring* 2018; 3(3):46–53. doi: 10.17886/RKIGBE2018078.
- [28] de Graaff E, Maat P, Hulsenboom E, van den Berg R, van den Bent M, Demmers J, Lugtenburg PJ, Hoogenraad CC, Sillevius Smitt P. Identification of delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor as the Tr antigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol*. 2012 Jun;71(6):815-24. doi: 10.1002/ana.23550. Epub 2012 Mar 23. PMID: 22447725.
- [29] Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuropathy from lung cancer. *Neurology*. 1985 Apr;35(4):538-43. doi: 10.1212/wnl.35.4.538. PMID: 2984600.
- [30] Graus F, Keime-Guibert F, Reñe R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, Escaramis G, Delattre JY. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain*. 2001 Jun;124(Pt 6):1138-48. doi: 10.1093/brain/124.6.1138. PMID: 11353730.

- [31] Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, Cortese I, Dale RC, Gelfand JM, Geschwind M, Glaser CA, Honnorat J, Höftberger R, Iizuka T, Irani SR, Lancaster E, Leypoldt F, Prüss H, Rae-Grant A, Reindl M, Rosenfeld MR, Rostásy K, Saiz A, Venkatesan A, Vincent A, Wandinger KP, Waters P, Dalmau J. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol.* 2016 Apr;15(4):391-404. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00401-9. Epub 2016 Feb 20. PMID: 26906964; PMCID: PMC5066574.
- [32] Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, Gleichman AJ, Balice-Gordon R, Rosenfeld MR, Lynch D, Graus F, Dalmau J. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2014 Feb;13(2):167-77. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70282-5. Epub 2013 Dec 18. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2014 Feb;13(2):135. PMID: 24360484; PMCID: PMC4006368.
- [33] Gresa-Arribas N, Planagumà J, Petit-Pedrol M, Kawachi I, Katada S, Glaser CA, Simabukuro MM, Armangué T, Martínez-Hernández E, Graus F, Dalmau J. Human neurexin-3 antibodies associate with encephalitis and alter synapse development. *Neurology.* 2016 Jun 14;86(24):2235-42. doi: 10.1212/WNL.0000000000002775. Epub 2016 May 11. PMID: 27170573; PMCID: PMC4909558.
- [34] Hammer C, Stepniak B, Schneider A, Papiol S, Tantra M, Begemann M, Sirén AL, Pardo LA, Sperling S, Mohd Jofry S, Gurvich A, Jensen N, Ostmeier K, Lühder F, Probst C, Martens H, Gillis M, Saher G, Assogna F, Spalletta G, Stöcker W, Schulz TF, Nave KA, Ehrenreich H. Neuropsychiatric disease relevance of circulating anti-NMDA receptor autoantibodies depends on blood-brain barrier integrity. *Mol Psychiatry.* 2014 Oct;19(10):1143-9. doi: 10.1038/mp.2013.110. Epub 2013 Sep 3. PMID: 23999527.
- [35] Hampson DR, Adusei DC, Pacey LK. The neurochemical basis for the treatment of autism spectrum disorders and Fragile X Syndrome. *Biochem Pharmacol.* 2011 May 1;81(9):1078-86. doi: 10.1016/j.bcp.2011.02.005. Epub 2011 Feb 17. PMID: 21333634.
- [36] Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Feb;87(2):489-99. doi: 10.1210/jcem.87.2.8182. PMID: 11836274.
- [37] Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, Parsons TD, Lynch DR, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor

- encephalitis. *J Neurosci*. 2010 Apr 28;30(17):5866-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0167-10.2010. PMID: 20427647; PMCID: PMC2868315.
- [38] Hutchinson M, Waters P, McHugh J, Gorman G, O’Riordan S, Connolly S, Hager H, Yu P, Becker CM, Vincent A. Progressive encephalomyelitis, rigidity, and myoclonus: a novel glycine receptor antibody. *Neurology*. 2008 Oct 14;71(16):1291-2. doi: 10.1212/01.wnl.0000327606.50322.f0. PMID: 18852446.
- [39] IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR. Indirekte Immunfluoreszenztechnik (IFT) [Internet]. Berlin: IMD Institut für Medizinische Diagnostik Berlin-Potsdam GbR; 2021 [cited 2021 Jan 20]. Available from: <https://www.imd-berlin.de/spezielle-kompetenzen/autoimmunerkrankungen/autoimmundiagnostik/immunfluoreszenztechnik-ift.html>
- [40] Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, Peles E, Buckley C, Lang B, Vincent A. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan’s syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain*. 2010 Sep;133(9):2734-48. doi: 10.1093/brain/awq213. Epub 2010 Jul 27. PMID: 20663977; PMCID: PMC2929337.
- [41] Jarius S, Wildemann B. ‘Medusa-head ataxia’: the expanding spectrum of Purkinje cell antibodies in autoimmune cerebellar ataxia. Part 1: Anti-mGluR1, anti-Homer-3, anti-Sj/ITPR1 and anti-CARP VIII. *J Neuroinflammation*. 2015 Sep 17;12:166. doi: 10.1186/s12974-015-0356-y. PMID: 26377085; PMCID: PMC4574226.
- [42] Jurek B, Chayka M, Kreye J, Lang K, Kraus L, Fidzinski P, Kornau HC, Dao LM, Wenke NK, Long M, Rivalan M, Winter Y, Leubner J, Herken J, Mayer S, Mueller S, Boehm-Sturm P, Dirnagl U, Schmitz D, Kölch M, Prüß H. Human gestational N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies impair neonatal murine brain function. *Ann Neurol*. 2019 Nov;86(5):656-670. doi: 10.1002/ana.25552. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31325344.
- [43] Karni A, Bakimer-Kleiner R, Abramsky O, Ben-Nun A. Elevated levels of antibody to myelin oligodendrocyte glycoprotein is not specific for patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 1999 Mar;56(3):311-5. doi: 10.1001/archneur.56.3.311. PMID: 10190821.
- [44] Klipker K, Baumgarten F, Göbel K, Lampert T, Hölling H. Psychische Auffälligkeiten bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Querschnittergebnisse aus KiGGS Welle 2 und Trends. *Journal of Health Monitoring* 2018; 3(3):37–45.DOI 10.17886/RKIG-BE2018077.

- [45] Kowal C, Athanassiou A, Chen H, Diamond B. Maternal antibodies and developing blood-brain barrier. *Immunol Res.* 2015 Dec;63(1-3):18-25. doi: 10.1007/s12026-015-8714-5. PMID: 26507553; PMCID: PMC4745584.
- [46] Lai, M., et al. Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, Matà S, Kremens D, Vitaliani R, Geschwind MD, Bataller L, Kalb RG, Davis R, Graus F, Lynch DR, Balice-Gordon R, Dalmau J. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol.* 2009 Apr;65(4):424-34. doi: 10.1002/ana.21589. PMID: 19338055; PMCID: PMC2677127.
- [47] Lalive PH, Menge T, Delarasse C, Della Gaspera B, Pham-Dinh D, Villoslada P, von Büdingen HC, Genain CP. Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein are serologic markers of early inflammation in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 14;103(7):2280-5. doi: 10.1073/pnas.0510672103. Epub 2006 Feb 3. PMID: 16461459; PMCID: PMC1413723.
- [48] Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol.* 2010 Jan;9(1):67-76. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70324-2. Epub 2009 Dec 2. PMID: 19962348; PMCID: PMC2824142.
- [49] Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Titulaer MJ, Boulos M, Weaver S, Antoine JC, Liebers E, Kornblum C, Bien CG, Honnorat J, Wong S, Xu J, Contractor A, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to metabotropic glutamate receptor 5 in the Ophelia syndrome. *Neurology.* 2011 Nov 1;77(18):1698-701. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182364a44. Epub 2011 Oct 19. PMID: 22013185; PMCID: PMC3208954.
- [50] Lancaster E. The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis. *J Clin Neurol.* 2016 Jan;12(1):1-13. doi: 10.3988/jcn.2016.12.1.1. PMID: 26754777; PMCID: PMC4712273.
- [51] Lang K, Prüß H, Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis — eine wichtige Differenzialdiagnose. *InFo Neurologie und Psychiatrie.* 2016 Aug;18(7-8):40-48. doi: 10.1007/s15005-016-1780-y.
- [52] Lang K, Prüß H. Frequencies of neuronal autoantibodies in healthy controls: Estimation of disease specificity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017 Jul 18;4(5):e386. doi: 10.1212/NXI.0000000000000386. PMID: 28761905; PMCID: PMC5515597.

- [53] Lee JY, Huerta PT, Zhang J, Kowal C, Bertini E, Volpe BT, Diamond B. Neurotoxic autoantibodies mediate congenital cortical impairment of offspring in maternal lupus. *Nat Med.* 2009 Jan;15(1):91-6. doi: 10.1038/nm.1892. Epub 2008 Dec 14. PMID: 19079257; PMCID: PMC2615794.
- [54] Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med.* 2005 Aug 15;202(4):473-7. doi: 10.1084/jem.20050304. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16087714; PMCID: PMC2212860.
- [55] Levin EC, Acharya NK, Han M, Zavareh SB, Sedeyn JC, Venkataraman V, Nagele RG. Brain-reactive autoantibodies are nearly ubiquitous in human sera and may be linked to pathology in the context of blood-brain barrier breakdown. *Brain Res.* 2010 Jul 23;1345:221-32. doi: 10.1016/j.brainres.2010.05.038. Epub 2010 Jun 11. PMID: 20546711.
- [56] Ly LT, Kreye J, Jurek B, Leubner J, Scheibe F, Lemcke J, Wenke NK, Reincke SM, Prüß H. Affinities of human NMDA receptor autoantibodies: implications for disease mechanisms and clinical diagnostics. *J Neurol.* 2018 Nov;265(11):2625-2632. doi: 10.1007/s00415-018-9042-1. Epub 2018 Sep 5. PMID: 30187160; PMCID: PMC6182686.
- [57] Miske R, Gross CC, Scharf M, Golombeck KS, Hartwig M, Bhatia U, Schulte-Mecklenbeck A, Bönte K, Strippel C, Schöls L, Synofzik M, Lohmann H, Dettmann IM, Deppe M, Mindorf S, Warnecke T, Denno Y, Teegen B, Probst C, Brakopp S, Wandinger KP, Wiendl H, Stöcker W, Meuth SG, Komorowski L, Melzer N. Neurochondrin is a neuronal target antigen in autoimmune cerebellar degeneration. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016 Dec 5;4(1):e307. doi: 10.1212/NXI.0000000000000307. PMID: 27957508; PMCID: PMC5141526.
- [58] Narayan R, Simpson A, Fritsche K, Salama S, Pardo S, Mealy M, Paul F, Levy M. MOG antibody disease: A review of MOG antibody seropositive neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler Relat Disord.* 2018 Oct;25:66-72. doi: 10.1016/j.msard.2018.07.025. Epub 2018 Jul 24. PMID: 30048919.
- [59] Nikolaus M, Meisel C, Kreye J, Prüß H, Reindl M, Kaindl AM, Schuelke M, Knierim E. Presence of anti-neuronal antibodies in children with neurological disorders beyond encephalitis. *Eur J Paediatr Neurol.* 2020 Sep;28:159-166. doi: 10.1016/j.ejpn.2020.07.004. Epub 2020 Jul 30. PMID: 32807683.
- [60] Pandit L. Neuromyelitis optica spectrum disorders: An update. *Ann Indian Acad Neurol.* 2015 Sep;18(Suppl 1):S11-5. doi: 10.4103/0972-2327.164816. PMID: 26538842; PMCID: PMC4604691.

- [61] Petit-Pedrol M, Sell J, Planagumà J, Mannara F, Radosevic M, Haselmann H, Cean-ga M, Sabater L, Spatola M, Soto D, Gasull X, Dalmau J, Geis C. LGI1 antibodies alter Kv1.1 and AMPA receptors changing synaptic excitability, plasticity and memory. *Brain*. 2018 Nov 1;141(11):3144-3159. doi: 10.1093/brain/awy253. PMID: 30346486; PMCID: PMC6202570.
- [62] Pettingill P, Kramer HB, Coebergh JA, Pettingill R, Maxwell S, Nibber A, Malaspina A, Jacob A, Irani SR, Buckley C, Beeson D, Lang B, Waters P, Vincent A. Antibodies to GABAA receptor 1 and 2 subunits: clinical and serologic characterization. *Neurology*. 2015 Mar 24;84(12):1233-41. doi: 10.1212/WNL.0000000000001326. Epub 2015 Jan 30. PMID: 25636713; PMCID: PMC4366091.
- [63] Pittock SJ, Lennon VA, Bakshi N, Shen L, McKeon A, Quach H, Briggs FB, Bernstein AL, Schaefer CA, Barcellos LF. Seroprevalence of aquaporin-4-IgG in a northern California population representative cohort of multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. 2014 Nov;71(11):1433-6. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1581. PMID: 25178362.
- [64] Prasad S, Chen J. What You Need to Know About AQP4, MOG, and NMOSD. *Semin Neurol*. 2019 Dec;39(6):718-731. doi: 10.1055/s-0039-3399505. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31847043.
- [65] Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci*. 2003;21(3-4):79-96. PMID: 14530572.
- [66] Ritter S, Hamouda O, Offergeld R. Blutspenderpopulationen in Deutschland: Demographie und Spendeaktivität - Ergänzung zum Bericht des Robert Koch-Instituts zu den Meldungen nach § 22 Transfusionsgesetz. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch -Gesundheitsschutz* 2008;51:915–925. DOI 10.1007/s00103-008-0613-7.
- [67] Sabater L, Gaig C, Gelpi E, Bataller L, Lewerenz J, Torres-Vega E, Contreras A, Giometto B, Compta Y, Embid C, Vilaseca I, Iranzo A, Santamaría J, Dalmau J, Graus F. A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: a case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study. *Lancet Neurol*. 2014 Jun;13(6):575-86. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70051-1. Epub 2014 Apr 3. Erratum in: *Lancet Neurol*. 2015 Jan;14(1):28. PMID: 24703753; PMCID: PMC4104022.
- [68] Schou M, Sæther SG, Borowski K, Teegen B, Kondziella D, Stoecker W, Vaaler A, Reitan SK. Prevalence of serum anti-neuronal autoantibodies in patients admitted to acute psychiatric care. *Psychol Med*. 2016 Dec;46(16):3303-3313. doi: 10.1017/S0033291716002038. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27609625.

- [69] Shan F, Long Y, Qiu W. Autoimmune Glial Fibrillary Acidic Protein Astrocytopathy: A Review of the Literature. *Front Immunol.* 2018 Dec 5;9:2802. doi: 10.3389/fimmu.2018.02802. PMID: 30568655; PMCID: PMC6290896.
- [70] van Sonderen A, Ariño H, Petit-Pedrol M, Leypoldt F, Körtvélyessy P, Wandinger KP, Lancaster E, Wirtz PW, Schreurs MW, Sillevs Smitt PA, Graus F, Dalmau J, Titulaer MJ. The clinical spectrum of Caspr2 antibody-associated disease. *Neurology.* 2016 Aug 2;87(5):521-8. doi: 10.1212/WNL.0000000000002917. Epub 2016 Jul 1. PMID: 27371488; PMCID: PMC4970662.
- [71] van Sonderen A, Schreurs MW, Wirtz PW, Sillevs Smitt PA, Titulaer MJ. From VGKC to LGI1 and Caspr2 encephalitis: The evolution of a disease entity over time. *Autoimmun Rev.* 2016 Oct;15(10):970-4. doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.018. Epub 2016 Jul 30. PMID: 27485013.
- [72] Steffen A, Akmatov MK, Holstiege J, Bätzing J. Diagnoseprävalenz psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland: eine Analyse bundesweiter vertragsärztlicher Abrechnungsdaten der Jahre 2009 bis 2017. *Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland (Zi).* 2018 Dec;Versorgungsatlas-Bericht Nr. 18/07. doi: 10.20364/VA-18.07. [cited 2020 Dec]. Available from: <https://www.versorgungsatlas.de/themen/alle-analysen-nach-datum-sortiert/?tab=6uid=93>.
- [73] Steiner J, Walter M, Glanz W, Sarnyai Z, Bernstein HG, Vielhaber S, Kästner A, Skalej M, Jordan W, Schiltz K, Klingbeil C, Wandinger KP, Bogerts B, Stoecker W. Increased prevalence of diverse N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antibodies in patients with an initial diagnosis of schizophrenia: specific relevance of IgG NR1a antibodies for distinction from N-methyl-D-aspartate glutamate receptor encephalitis. *JAMA Psychiatry.* 2013 Mar;70(3):271-8. doi: 10.1001/2013.jamapsychiatry.86. PMID: 23344076.
- [74] Stöcker W, Saschenbrecker S, Rentzsch K, Komorowski L, Probst C. Autoantikörperdiagnostik in der Neurologie mittels nativer und rekombinanter Antigensubstrate [Autoantibody diagnostics in neurology using native and recombinant antigenic substrates]. *Nervenarzt.* 2013 Apr;84(4):471-6. German. doi: 10.1007/s00115-012-3607-5. PMID: 23568169.
- [75] Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):157-165. doi:10.1016/S1474-4422(12)70310-1.
- [76] Tombek A. Eine Autoimmunerkrankung kommt selten allein [Internet]. [place unknown]: Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin e.V.; cited 2021 Jan 8. Available from: <http://www.dgern.de/>

ps://www.dgem.de/sites/default/files/PDFs/Veranstaltungen/Ernaehrung2014/Tombek
_EineAutoimmunerkrankungKommtSeltenAllein.pdf

- [77] Trovato CM, Montuori M, Anania C, Barbato M, Vestri AR, Guida S, Oliva S, Mainiero F, Cucchiara S, Valitutti F. Are ESPGHAN "biopsy-sparing" guidelines for celiac disease also suitable for asymptomatic patients? *Am J Gastroenterol*. 2015 Oct;110(10):1485-9. doi: 10.1038/ajg.2015.285. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26372508.
- [78] Vincent A, Clover L, Buckley C, Grimley Evans J, Rothwell PM; UK Myasthenia Gravis Survey. Evidence of underdiagnosis of myasthenia gravis in older people. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Aug;74(8):1105-8. doi: 10.1136/jnnp.74.8.1105. PMID: 12876244; PMCID: PMC1738592.
- [79] Wandinger KP, Klingbeil C, Gneiss C, Waters P, Dalmau J, Saschenbrecker S, Borowski K, Deisenhammer F, Vincent A, Probst C, Stöcker W. Neue serologische Marker zur Differentialdiagnose der Autoimmun-Enzephalitis / New serological markers for the differential diagnosis of autoimmune limbic encephalitis. *J Lab Med*. 2011 Nov;35(6):329-342. doi: 10.1515/JLM.2011.059.
- [80] Wingerchuk DM. Neuromyelitis optica: new findings on pathogenesis. *Int Rev Neurobiol*. 2007;79:665-88. doi: 10.1016/S0074-7742(07)79029-3. PMID: 17531863.
- [81] Ygberg S, Nilsson A. The developing immune system - from foetus to toddler. *Acta Paediatr*. 2012 Feb;101(2):120-7. doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02494.x. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22003882.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katharina Lang, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Prävalenz neuronaler Oberflächenantikörper bei Müttern von Kindern mit neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen und gesunden Kontrollen* (Englisch: *Prevalence of neuronal surface antibodies in mothers of children with psychiatric disorders and in healthy controls*) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

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

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung

Katharina Lang hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: [Lang K, Prüß H], [Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis — eine wichtige Differenzialdiagnose], [InFo Neurologie und Psychiatrie], [2016]

Nach dem Konzept und unter Supervision von Prof. Dr. Prüß ist diese Publikation nach ihrer Recherche erarbeitet und eigenständig geschrieben worden.

Publikation 2: [Lang K, Prüß H], [Frequencies of neuronal autoantibodies in healthy controls: Estimation of disease specificity], [Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm], [2017]

Das Konzept wurde gemeinsam mit Prof. Dr. Prüß erarbeitet. Die Literaturrecherche, Datenakquise und -auswertung sowie die Erstellung des Manuskripts erfolgten durch Katharina Lang und ohne Hilfe Dritter. Darunter fällt auch die Erstellung sämtlicher Tabellen und Schaubilder.

Publikation 3: [Jurek B, Chayka M, Kreye J, Lang K, Kraus L, Fidzinski P, Kornau HC, Dao LM, Wenke NK, Long M, Rivalan M, Winter Y, Leubner J, Herken J, Mayer S, Mueller S, Boehm-Sturm P, Dirnagl U, Schmitz D, Kölch M, Prüß H], [Human gestational N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies impair neonatal murine brain function], [Ann Neurol], [2019]

Der klinische Teil dieser Publikation wurde maßgeblich durch Katharina Lang erarbeitet. Zu ihrem Beitrag gehörten: Mitentwicklung des Konzepts des klinischen Teils sowie Erstellen des Ethikantrages gemeinsam mit Prof. Dr. Prüß. Der Aufbau der Studiengruppe, inklusive Akquirierung der klinischen Daten, erfolgte in eigenständiger Organisation und Durchführung. Ein kleiner Teil der Serumproben aus der Kinder- und Jugendpsychiatrie wurde durch Julia Herken akquiriert. Der Aufbau der Kontrollgruppen erfolgte komplett eigenständig, ebenso die Verarbeitung der Proben, sowie die Auswertung der klinischen Daten.

Die FACS-Messung wurde in Zusammenarbeit mit Betty Jurek und Le Minh Dao durchgeführt. Die Auswertung der FACS-Analyse für diese Publikation erfolgte in Zusammenarbeit mit Betty Jurek. Alle über diese Publikation hinausgehenden Auswertungen, inklusive dem Erstellen sämtlicher in der Monographie gezeigten Tabellen und Schaubilder, erfolgten eigenständig.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

—

—

—

Publikationsliste

Jurek B, Chayka M, Kreye J, Lang K, Kraus L, Fidzinski P, Kornau HC, Dao LM, Wenke NK, Long M, Rivalan M, Winter Y, Leubner J, Herken J, Mayer S, Mueller S, Boehm-Sturm P, Dirnagl U, Schmitz D, Kölch M, Prüß H. Human gestational N-methyl-d-aspartate receptor autoantibodies impair neonatal murine brain function. *Ann Neurol*. 2019 Nov;86(5):656-670. doi: 10.1002/ana.25552. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31325344.

Lang K, Prüß H. Frequencies of neuronal autoantibodies in healthy controls: Estimation of disease specificity. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017 Jul 18;4(5):e386. doi: 10.1212/NXI.0000000000000386. PMID: 28761905; PMCID: PMC5515597.

Lang K, Prüß H. Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis — eine wichtige Differenzialdiagnose. *InFo Neurologie und Psychiatrie*. 2016 Aug;18(7-8):40-48. doi: 10.1007/s15005-016-1780-y.

Danksagung

Ich danke allen voran meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Prüß, der mir diese Arbeit ermöglichte, sowie der gesamten AG Prüß für ihre Unterstützung und das ehrliche und freundschaftliche Arbeitsumfeld. Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden, die mich in der Fertigstellung dieser Arbeit wunderbar unterstützt haben.