

Aus dem
NeuroCure Clinical Research Center
Exzellenzcluster NeuroCure
Koordinator: Prof. Dr. med. Dietmar Schmitz
Charité – Universitätsmedizin Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

„Neue Methoden zur Diagnostik, Differentialdiagnostik und Verlaufsbeurteilung autoimmuner ZNS-Erkrankungen“

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Neurologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Friedemann Paul
geboren am 17.05.1967 in Dorsten/Westf.

Eingereicht: Januar 2010

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung, Düsseldorf

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Guido Stoll, Würzburg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1	Fragestellung und Zielsetzung	4
1.2	Wissenschaftlicher Hintergrund der Fragestellung	5
1.3	Kurze Darstellung der diskutierten Krankheitsbilder	9
1.3.1	Multiple Sklerose	9
1.3.2	Neuromyelitis optica	11

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1	Differentialdiagnostik: Zöliakie-Antikörper bei „white matter lesions“	14
2.2	Virchow-Robin-Räume als neuer MRT-Surrogatmarker entzündlicher Aktivität bei Multipler Sklerose?	17
2.3	Diagnostik des spinalen Motoneuronenverlusts in der Multiplen Sklerose	21
2.4	Untersuchung von Aufmerksamkeitsdefiziten bei Multipler Sklerose: Der „Attention Network Test“ (ANT)	26
2.5	Entwicklung eines neuen Antikörper-Assays zur Diagnostik und Differentialdiagnostik der Neuromyelitis optica	28

3. Zusammenfassung 36

4. Literaturverzeichnis 39

5. Danksagung 46

6. Eidesstattliche Erklärung 47

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANT	„Attention Network Test“
AQP4	Aquaporin-4
CCT	kranielle Computertomographie
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EEG	Elektroenzephalographie
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
FLAIR	“fluid-attenuated inversion recovery”
LETM	longitudinale extensive transverse Myelitis
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSAP	Muskelsummenaktionspotential
MUNE	“motor unit number estimate”
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NMO	Neuromyelitis optica
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
SNAP	sensibles Nervenaktionspotential
VRS	„Virchow-Robin spaces“ (Virchow-Robin-Räume)
WML	“white matter lesions”
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit illustriert neue Erkenntnisse zur Diagnostik und Differentialdiagnostik bei zwei wichtigen chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS), der Multiplen Sklerose (MS) und der Neuromyelitis optica (NMO), und stellt eigene Forschungsergebnisse vor, die im Hinblick auf die Verbesserung und Weiterentwicklung von Diagnostik und Differentialdiagnostik und evtl. zukünftig auch im Hinblick auf die Überwachung des Krankheitsverlaufs sowie therapeutischer Maßnahmen erzielt wurden. Die Fragestellung dieser Arbeit ergibt sich aus der klinischen Situation, in der trotz verbesserter diagnostischer Verfahren etwa in der Neuroradiologie und der Labordiagnostik die exakte Diagnose einer MS nach wie vor in vielen Fällen schwierig bleibt, vor allem in der Abgrenzung zu anderen systemischen Autoimmunerkrankungen mit zentralnervöser Beteiligung (u.a. Vaskulitiden, Kollagenosen) sowie zu der deutlich selteneren, jedoch meist schwerer und nicht selten lebensbedrohlich verlaufenden NMO (Devic-Syndrom). Ähnlich schwierig und unbefriedigend ist die Diagnostik MS-assoziiierter kognitiver Störungen, obwohl diese eines der häufigsten MS-Symptome und häufige Ursache für das vorzeitige Ausscheiden der Patienten aus dem Erwerbsleben sind. Die im Folgenden dargestellten wissenschaftlichen Arbeiten haben allesamt das Ziel, die Diagnostik und Differentialdiagnostik und somit auch die Beratung und Therapie von Patienten mit chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen des ZNS zu verbessern.

1.2 Wissenschaftlicher Hintergrund der Fragestellung

Die Diagnose oder Verdachtsdiagnose einer chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankung des ZNS wird in den letzten Jahren zunehmend häufiger gestellt. Aufgrund der steigenden Verfügbarkeit der Magnetresonanztomographie (MRT) als derzeit sensitivstes bildgebendes diagnostisches Verfahren zur Darstellung des Zerebrums und seiner Hüllen wird diese Methode neben anderen (u.a. CCT, EEG) zunehmend zur Abklärung diverser neurologischer Symptome (etwa bei neu aufgetretenen Kopfschmerzen mit der Frage nach einem Gehirntumor, im Rahmen der Abklärung der Ursache epileptischer Anfälle, bei erstmaligen Lähmungen oder Sensibilitätsstörungen, nach Schädel-Hirn-Traumata verschiedener Schweregrade, bei dem Verdacht auf eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS (z.B. MS) etc.) in der Regel außerhalb der Notfalldiagnostik eingesetzt. So sehr dieses bildgebende Verfahren, welches keine Strahlenbelastung für den Patienten bedeutet und welches auch sonst als sehr risikoarm gilt, zur Verbesserung der Diagnostik und Differentialdiagnostik im Rahmen der Abklärung der o.g. Symptome beigetragen hat und damit für viele Patienten frühzeitig eine korrekte Diagnose und Therapie ermöglicht hat, so sehr tragen die Befunde der MRT auch oft zur Verwirrung und Verunsicherung bei Patienten und behandelnden Neurologen bei. Oft enthalten (neuro)radiologische Befunde wenig klärende Begrifflichkeiten wie „multiple entzündliche Läsionen“, oder „V.a. E.d.“ („Encephalomyelitis disseminata“, älteres Synonym für MS) oder „MS-typische Herde“. Dies verunsichert und beunruhigt Patienten verständlicherweise, vor allem dann, wenn sie nicht wegen einer „MS-typischen“ oder „MS-verdächtigen“ klinischen Symptomatik dem Radiologen vorgestellt werden, sondern etwa zur Abklärung von Kopfschmerzen oder nach einem Schädel-Hirn-Trauma. Eine Ursache für den häufig unkritisch geäußerten Verdacht auf eine MS bzw. chronisch-entzündliche ZNS-Erkrankung bei der

Befundung der MRT-Aufnahmen des Kopfes ist die Tatsache, daß mit dem Lebensalter in zunehmender Häufigkeit zunächst nosologisch unspezifische sog. „white matter lesions“ (WML), d.h. Läsionen der subkortikalen weißen Substanz, die auf bestimmten MRT-Sequenzen (T2-gewichteten Sequenzen und sog. flüssigkeitsunterdrückten FLAIR-Sequenzen („fluid-attenuated inversion recovery“)) hyperintens, d.h. hell bzw. weiß erscheinen (s. Abb 1), detektiert werden können (1), und die mangelnde Kenntnis vieler Radiologen hinsichtlich dieses Sachverhaltes. Nicht in jedem Fall aber sind diese WML ein Hinweis auf eine chronisch-entzündliche (autoimmune) Erkrankung des ZNS, wie oft vorschnell geschlußfolgert wird. Viele nicht-entzündliche Erkrankungen (z.B. ein langjähriger arterieller Hypertonus, Migräne) sind ebenso zu bedenken wie harmlose altersbedingte Veränderungen ohne jeglichen Krankheitswert (2). Wenn allerdings diese WML infolge einer spezifischen Fragestellung, z.B. nach dem Vorliegen einer MS detektiert werden, kann dieser Befund u.U. der Bestätigung dieser Verdachtsdiagnose dienen, die aufgrund einer typischen klinischen Symptomatik und z.B. eines typischen Liquorbefundes mit dem Nachweis oligoklonaler Banden gestellt wurde. Allerdings sind auch im Fall eines klaren MS-Verdachtes die in der MRT detektierbaren Veränderungen möglicherweise typisch, in keinem Fall jedoch spezifisch oder pathognomonisch für eine MS. In jedem Fall erfordert daher diese Konstellation eine umfangreiche Differentialdiagnostik. Ähnlich verhält es sich, wenn WML eher zufällig, also etwa im Rahmen der Abklärung von Kopfschmerzen, detektiert werden. Auch hier ergibt sich die Notwendigkeit zu breiten differentialdiagnostischen Überlegungen, da solche WML in den allermeisten Fällen nicht nur nicht pathognomonisch für eine MS sind, sondern ohne weitere anamnestische Angaben und Zusatzbefunde auch selten die exakte Diagnose einer anderen Erkrankung des ZNS ermöglichen. Erschwert wird das diagnostische Vorgehen noch durch die Tatsache, daß es keinen

allgemein akzeptierten internationalen Standard bzw. Konsens gibt, wie umfangreich die Differentialdiagnostik zu sein hat bzw. welche Untersuchungen durchzuführen sind, um zu einer Diagnose zu kommen. So heißt es in den 2001 publizierten neuen Diagnose-Kriterien der MS (3), daß selbst in dem Fall, daß klinische und paraklinische Befunde auf eine MS hinweisen, es keine bessere Erklärung für die Befunde geben dürfe, um eine sichere MS-Diagnose stellen zu können („concept of no better explanation“). Es werden einige mögliche Differentialdiagnosen genannt, aber keine Konsensusempfehlungen zur erforderlichen Labordiagnostik im differentialdiagnostischen Prozeß. Neuere Befunde, nach denen auch bei einem nicht unbeträchtlichen Teil der NMO-Patienten WML in der kraniellen MRT detektierbar sind (teilweise sogar MS-typisch) tragen nicht zur Vereinfachung der bildgebenden Differentialdiagnostik zwischen MS und NMO bei. Die erhebliche differentialdiagnostische Unsicherheit bei der MS-Diagnostik kommt nicht zuletzt auch darin zum Ausdruck, daß trotz steigender Verfügbarkeit von MRT-Untersuchungen und neurologischer Fachärzte in Deutschland oft immer noch mehrere Jahre vom ersten Symptom zur Stellung der korrekten Diagnose „MS“ oder „NMO“ vergehen. Die Diagnostik und Differentialdiagnostik autoimmuner Erkrankungen des ZNS bleibt also trotz Verbesserungen der bildgebenden und laborchemischen Zusatzdiagnostik eine Herausforderung für die betreuenden Ärzte. Vor dem Hintergrund, daß die Zunahme der diagnostizierten Fälle etwa der MS als häufigster chronisch entzündlicher ZNS-Erkrankung in unseren Breiten wahrscheinlich kein Beobachtungsartefakt ist, sondern aus einem tatsächlichen Anstieg der Inzidenz resultiert, ist eine weitere Verbesserung der Diagnostik und Differentialdiagnostik autoimmuner ZNS-Erkrankungen dringend geboten, nicht zuletzt auch aus ökonomischen Gründen.

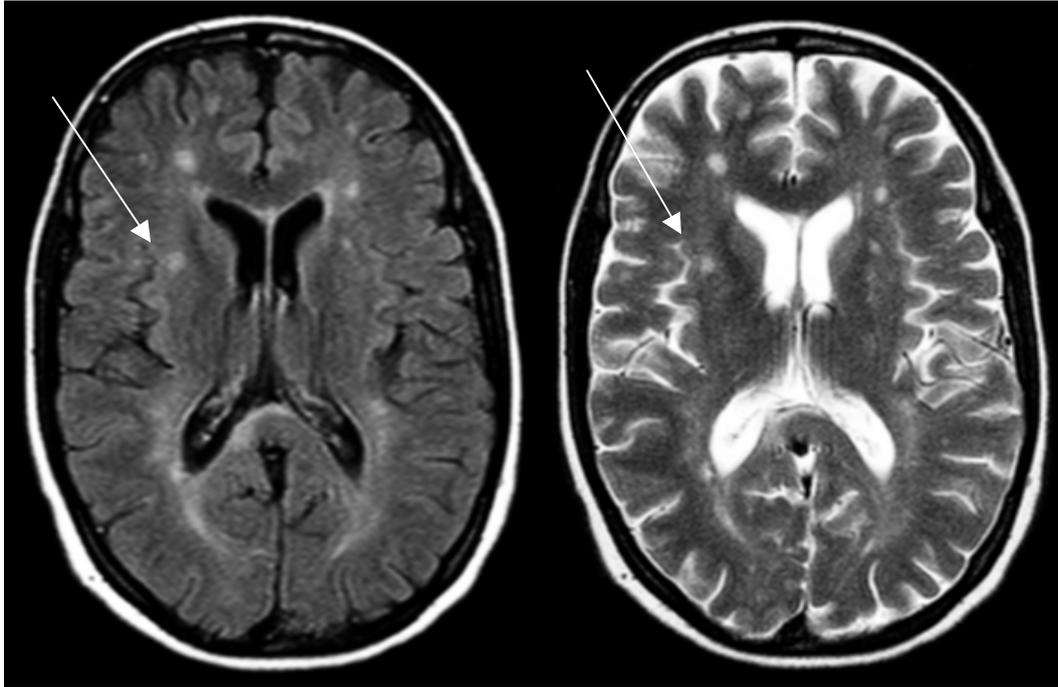


Abb. 1: hyperintense sog. „white matter lesions“ (Pfeile). Links FLAIR-Sequenz, rechts T2-gewichtete Sequenz. In diesem Fall handelt es sich um das MRT einer Patientin mit schubförmiger MS.

Eine rationelle diagnostische Herangehensweise bei bestehendem Verdacht auf eine autoimmune ZNS-Erkrankung wie MS oder NMO sowie bei unklaren WML in der MRT, die im Rahmen anderer Fragestellungen detektiert wurden, sollte (i) behandelbare, evtl. schwerwiegende oder sogar lebensbedrohliche Erkrankungen feststellen können, um daraus rechtzeitig therapeutische Konsequenzen ziehen zu können, (ii) singuläre oder diskrete, vor allem bildgebende Befunde nicht überbewerten bzw. berücksichtigen, daß unspezifische WML mit steigendem Lebensalter sehr häufig sind und keinen Krankheitswert haben, und (iii) vertretbare Kosten verursachen, was im Hinblick auf die zunehmenden finanziellen Restriktionen im Gesundheitswesen in Zukunft eine immer größere Rolle spielen wird. Nach einmal gestellter Diagnose sollte die Therapie, die in manchen Fällen aggressiv immunsuppressiv, in anderen immunmodulatorisch sein muß, gezielt eingesetzt werden und mit Hilfe klinisch-neurologischer Verlaufsuntersuchungen und adäquater paraklinischer (bildgebender, laborchemischer) Surrogatmarker überwacht werden.

1.3 Kurze Darstellung der diskutierten Krankheitsbilder

1.3.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste nicht-infektiöse chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS und die häufigste zu frühzeitiger Behinderung und vorzeitiger Berentung führende entzündliche neurologische Erkrankung im jüngeren und mittleren Erwachsenenalter in Europa (4-6). Wie bei fast allen Autoimmunerkrankungen gibt es eine deutliche Frauenwendigkeit (F:M ca. 2:1). Das typische Erkrankungsalter liegt etwa in der Mitte der 3. Dekade, wobei zunehmend sowohl Erkrankungen im Kindesalter als auch im höheren Erwachsenenalter diagnostiziert werden. In etwa 85-90% der Fälle nimmt die Erkrankung initial einen sog. schubförmigen oder schubförmig-remittierenden Verlauf (RRMS), d.h. es kommt innerhalb von Stunden bis Tagen zu neurologischen Funktionsstörungen (visuell, motorisch, sensibel, zerebellär, vegetativ, neuropsychologisch etc.), welche üblicherweise innerhalb von Tagen bis Wochen (seltener Monaten) teilweise oder vollständig remittieren. Nach einigen Jahren geht die Erkrankung meist in einen sog. sekundär chronisch-progredienten Verlauf mit oder ohne überlagerte Schübe über (SPMS), bei dem es zu einer kontinuierlichen schleichenden Verschlechterung des neurologischen Befundes, in vielen Fällen im Sinne einer progredienten spastischen Paraparese mit Abnahme der Gehstrecke, kommt. In etwa 10-15% der Fälle nimmt die MS von Anfang an einen sog. primär chronisch-progredienten Verlauf (PPMS), bei dem klinisch meist eine langsam progrediente spastische Paraparese im Vordergrund steht. Schübe treten bei dieser Verlaufsform nicht auf. Je höher das Erkrankungsalter, desto höher ist der Anteil der Patienten mit einem primär chronisch-progredienten Verlauf. Ätiopathogenetisch gilt die MS als T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung des ZNS, bei der autoreaktive enzephalitogene T-Zellen nach

Aktivierung außerhalb des ZNS in das immunologisch privilegierte ZNS-Kompartiment invadieren, dort spezifischen Zielstrukturen begegnen (meist Myelin-Antigenen) und infolge einer erneuten Aktivierung und gegen das Myelin gerichteten Immunreaktion Demyelinisierung und axonalen Schaden induzieren (7, 8). Neben einer genetischen Suszeptibilität spielen wahrscheinlich auch Umweltfaktoren für die Auslösung der Erkrankung eine Rolle, was u.a. aus Migrationsstudien und der erheblich unterschiedlichen Prävalenz der MS in Abhängigkeit vom Breitengrad bzw. der geographischen Region gefolgert wurde (4, 6). Diagnostisch spielt die MRT eine zunehmend wichtige Rolle, was sich u.a. daran erkennen läßt, daß die MRT-Untersuchung in den neuen Diagnosekriterien nach McDonald et al. einen wichtigeren Stellenwert einnimmt als andere diagnostische Verfahren, etwa der Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor oder typische, auf eine Demyelinisierung hinweisende Befunde in den evozierten Potentialen. Nach den neuen diagnostischen Kriterien kann die Diagnose einer MS gestellt werden kann, ohne daß ein zweiter Schub erfolgte, wenn bestimmte MRT-Kriterien erfüllt sind (3). Nachdem die MS bis vor kurzem als klassische demyelinisierende Erkrankung des ZNS angesehen wurde, die Neurone und Axone weitestgehend intakt läßt, gewinnt die Erkenntnis eines sehr frühen auch axonalen und neuronalen Schadens, der im übrigen auch schon von Jean-Martin Charcot, welcher bereits im letzten Drittel des 19. Jahrhunderts die typischen histopathologischen Veränderungen der MS beschrieb („sclerose en plaques“), erwähnt, aber lange Zeit in Vergessenheit geraten war, wieder zunehmend an Bedeutung (9-12). In jüngerer Zeit deuten immer mehr Arbeiten mit unterschiedlichen methodischen Ansätzen (bildgebend, tierexperimentell etc.) darauf hin, daß die MS nicht nur eine demyelinisierende Erkrankung ist, sondern auch eine Erkrankung der Neurone und Axone. Dieser axonale und neuronale Schaden könnte mit dazu beitragen, daß es schon sehr früh im Krankheitsverlauf sowohl eine

messbare Hirnatrophie gibt (in der MRT quantifizierbar), als auch kognitive Störungen auftreten.

1.3.2 Neuromyelitis optica

Die Neuromyelitis optica (NMO, Devic-Syndrom) ist eine in der westlichen Welt seltene und zumeist schwer verlaufende Autoimmunerkrankung des ZNS, die sich klinisch an den Sehnerven und dem Rückenmark manifestiert (13, 14). Zwar ist die NMO ursprünglich von Eugène Devic als eigenständige Entität beschrieben (15), jedoch lange Zeit als seltene Variante der MS gesehen worden. Seit kurzem mehren sich jedoch Hinweise, daß es sich bei der NMO um ein gesondertes neuroimmunologisches Krankheitsbild handelt, das sich histopathologisch und serologisch von der MS abgrenzen lässt. Neben charakteristischen histopathologischen Befunden wie entzündlichen Infiltraten aus Makrophagen, neutrophilen sowie eosinophilen Granulozyten und nur wenigen T-Lymphozyten sowie Nachweis perivaskulärer Immunglobulin- und Komplementablagerungen (16) gibt es typische und sehr spezifische Befunde der spinalen MRT-Bildgebung (langstreckige entzündliche Läsionen mit einer Ausdehnung über 3 oder mehr Rückenmarkssegmente, ein für die MS sehr ungewöhnlicher Befund, Abb. 2). Der Liquorbefund bei der NMO zeigt nur in ca. 20-40% oligoklonale Banden (17), diese verschwinden oft auch im Verlauf der Erkrankung, ein ebenfalls für die MS sehr untypischer Befund. Bis vor kurzem war eine Differenzierung der NMO von der MS nach klinischen, laborchemischen und neuroradiologischen Befunden nicht mit Sicherheit möglich. Dies hat vermutlich in nicht wenigen Fällen in der Vergangenheit zu Fehldiagnosen geführt vor allem in dem Sinne, daß Fälle von NMO als MS fehldiagnostiziert wurden. Eine korrekte Abgrenzung der NMO von der MS ist jedoch

von erheblicher therapeutischer Relevanz, da die NMO in den meisten Fällen einen wesentlich aggressiveren und schwereren Verlauf als die MS nimmt. Bis zu 30% der Patienten versterben durch Atemlähmung infolge aufsteigender zervikaler Myelitis (13), und NMO-Patienten sind bei gleicher Krankheitsdauer meist wesentlich schwerer behindert (hochgradige ein- oder beidseitige Sehbehinderung oder Erblindung, hochgradige Para- oder Tetraparese) als MS-Erkrankte. Auch die Therapieansätze unterscheiden sich: die NMO verlangt in der Regel eine konsequente und längerfristige Immunsuppression (eingesetzt werden Prednisolon, Azathioprin, in jüngerer Zeit auch Mitoxantron, Rituximab und Mycophenolat Mofetil (18-23)), während die bei der MS primär eingesetzten immunmodulatorischen Substanzen (Glatirameracetat, Beta-Interferone) keine nachgewiesene Wirksamkeit haben bzw. ein positiver Effekt bei der NMO bislang nur kasuistisch berichtet wurde (Glatirameracetat) (24-26), oder sogar zur Verschlechterung führen können (Beta-Interferone) (27, 28).

Die Entdeckung eines spezifischen Biomarkers der NMO, des sogenannten NMO-IgG, eines im Serum von NMO-Patienten mit einer Häufigkeit von 73% mittels indirekter Immunfluoreszenz nachweisbaren Antikörpers, welcher in der Nähe der Blut-Hirn-Schranke bindet, erleichtert in neuerer Zeit die Abgrenzung der NMO von der MS (29) und unterstützt die Annahme einer humoralen Pathogenese der NMO. Kürzlich wurde mit dem Wasserkanal Aquaporin-4 (AQP4), welcher u.a. vor allem auf Astrozyten-Fortsätzen vorkommt, ein Zielantigen der NMO-Immunglobuline identifiziert (30). Diese Entdeckung führte zur Revision der diagnostischen Kriterien (31), in die nun der Nachweis von NMO-IgG als ein Kriterium aufgenommen wurde. Dies wurde nicht ganz zu unrecht als unethisch kritisiert, da die Testung auf NMO-IgG initial nur an einer Klinik und zudem zu exorbitanten Kosten zur Verfügung stand (32, 33). In der Zwischenzeit sind erfreulicherweise neben einem von uns

entwickelten Radioimmunpräzipitationsassay (siehe 2.5) weitere Assays zur Testung auf AK gegen AQP4 zu vernünftigen Kosten verfügbar. Aktuelle Arbeiten deuten darauf hin, daß die AK gegen AQP4 nicht nur einen Surrogatmarker der NMO darstellen, der für Diagnostik, Differentialdiagnostik und möglicherweise Verlaufsbeurteilung bedeutsam ist, sondern auch pathogenetisch für die Entstehung der Krankheitssymptome relevant sein könnten (34-36).

Abb. 2: Typische langstreckige spinale Läsionen bei einer 64jährigen Patientin mit NMO. Die kraniale MRT war unauffällig, während sich in der spinalen MRT hyperintense multisegmentale T2-Läsionen mit Ausdehnung über das gesamte Thorakalmark abgrenzen ließen (Pfeile markieren Anfang und Ende der Läsion).



2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Differentialdiagnostik: Zöliakie-Antikörper bei „white matter lesions“

Allen Verbesserungen der Diagnostik, vor allem auch der MRT-Bildgebung, zum Trotz gibt es bislang keinen spezifischen bzw. pathognomonischen neuroradiologischen oder laborchemischen diagnostischen Marker der MS. Trotz typischer bildgebender Befunde in der MRT sind umfangreiche differentialdiagnostische Überlegungen erforderlich, um andere Erkrankungen mit ähnlicher klinischer und neuroradiologischer Präsentation auszuschließen. Einige dieser bei klinischem oder bildgebendem MS-Verdacht sowie unklaren WML differentialdiagnostisch zu bedenkenden Erkrankungen, die zum Teil auch in den 2001 publizierten neuen Diagnosekriterien der MS (sog. „McDonald-Kriterien“) erwähnt werden (3), sind u.a. diverse rheumatologische Erkrankungen, darunter vor allem der Systemische Lupus erythematodes, das Anti-Phospholipid-Syndrom, die Neurosarkoidose, zerebrale Vaskulitiden, oder infektiöse Erkrankungen wie die Neurosyphilis, die Neuroborreliose und HIV/AIDS. Neben entzündlichen infektiösen und nicht-infektiösen Ursachen sind auch vaskuläre Erkrankungen in die differentialdiagnostischen Überlegungen einzubeziehen, vor allem bei älteren Personen, bei denen ischämisch bedingte T2- oder FLAIR-hyperintense Läsionen den entzündlichen Läsionen bei MS sehr ähnlich sehen können. Auch nutritive Ursachen, wie etwa ein Vitamin B12-Mangel, kommen als Ursache für WML in Frage. Nicht zuletzt sind in seltenen Fällen auch genetisch/hereditär bedingte Erkrankungen des Myelins, z.B. Leukodystrophien, abzuklären. Bei Patienten mit langjähriger Migräne sind ebenfalls WML beschrieben (37), die am ehesten ischämischen Veränderungen entsprechen, deren Krankheitswert jedoch ungeklärt

ist. Viele der genannten Erkrankungen können durch entsprechende Laboruntersuchungen und evtl. zusätzliche bildgebende Untersuchungen an anderen Organsystemen abgeklärt werden. Trotz umfangreicher differentialdiagnostischer Maßnahmen bleibt jedoch ein nicht unbeträchtlicher Teil der Fälle ungeklärt, und es gibt bislang keinen allgemein akzeptierten Konsens, welche (Labor-)Untersuchungen durchzuführen sind, um möglichst keine behandelbare Erkrankung zu übersehen und evtl. fälschlicherweise die Diagnose einer MS zu stellen.

Die Zöliakie (Sprue) ist eine glutensensitive Enteropathie in genetisch suszeptiblen Individuen mit einer geschätzten Prävalenz von etwa 1% (38). Obwohl die genauen pathogenetischen Zusammenhänge unklar sind, ist seit längerem bekannt, daß es in ca. 6-10% der Patienten mit Zöliakie zu neurologischen Symptomen kommen kann, allen voran nicht anders erklärten zerebellären Ataxien und Polyneuropathien (39). In letzter Zeit wurde angenommen, daß bei Patienten mit ätiologisch unklaren neurologischen Symptomen in einem hohen Prozentsatz Zöliakie-assoziierte Antikörper (vor allem Gliadin-Antikörper) gefunden werden können und daß dies ein Hinweis auf eine okkulte Gluten-Sensitivität als Ursache der neurologischen Symptome sei. Auch für zerebrale WML wurde ein solcher Zusammenhang vor kurzem postuliert (40) und die Empfehlung ausgesprochen, in jedem Fall unklarer WML eine Zöliakie-Antikörper-Diagnostik zu initiieren. Kritisch muß allerdings angemerkt werden, daß in vielen der berichteten Fälle überwiegend oder ausschließlich Gliadin-IgG Antikörper gefunden werden konnten, die als wenig spezifisch für die Zöliakie gelten (41). Vor diesem Hintergrund gingen wir der Frage nach, ob ein routinemäßiges Screening auf Zöliakie-assoziierte AK ein fester Bestandteil im Rahmen der differentialdiagnostischen Abklärung von WML bzw. Autoimmunerkrankungen des ZNS sein sollte (Zusammenarbeit mit PD Dr. Daniel Baumgart, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie und Hepatologie,

Campus Virchow; Dr. Dr. Karl Egerer, Rheumatologisch-immunologisches Labor, Campus Mitte). In einer prospektiven Studie untersuchten wir 86 unselektierte konsekutive Patienten mit zerebralen oder spinalen WML oder Optikusneuritis auf das Vorhandensein von Gliadin-IgA-AK, Gliadin-IgG-AK, anti-Transglutaminase-IgA-AK und anti-Transglutaminase-IgG-AK (42). Als Kontrollen dienten 48 Patienten mit gesicherter MS sowie 39 gesunde Probanden ohne neurologische Erkrankungen. Seren von 5 Patienten mit histologisch gesicherter Zöliakie, aber fehlender strikter Adhärenz an eine gluten-freie Diät, dienten als Kontrollen für die analytische Sensitivität des Assays.

Eigene Referenzen:

Paul F, Pfueller CF, Wuerfel JT, Egerer K, Tanczos B, Baumgart DC, Zipp F.

Celiac antibodies in the diagnostic work-up of white matter lesions.

Neurology 2008;71:223-5.

Zusammenfassend konnten wir keine erhöhte Prävalenz von Zöliakie-Antikörpern bei Patienten mit WML im Vergleich zu den Kontrollgruppen detektieren, und die nachgewiesene Prävalenz der AK in den drei untersuchten Gruppen entsprach der in der Literatur für Blutspender bzw. gesunde Probanden angegebenen (43). Aus unseren Untersuchungen läßt sich also die Schlußfolgerung ziehen, daß ein Routine-Screening auf Zöliakie-AK bei der Abklärung von WML nicht indiziert ist. Eine niedrige analytische Sensitivität unseres ELISA als Ursache der niedrigen Prozentzahlen AK-positiver Probanden scheidet aus, da in den Seren der Zöliakie-Patienten ohne strikte Diät-Adhärenz hochtitrig die o.g. AK detektiert werden konnten.

2.2 Virchow-Robin-Räume als neuer MRT-Surrogatmarker entzündlicher Aktivität bei Multipler Sklerose?

Wie in der Einleitung dargelegt, gibt es bislang keinen pathognomonischen bildgebenden oder laborchemischen Surrogatmarker der MS. Die differentialdiagnostischen Schwierigkeiten in der Abgrenzung der MS von anderen Erkrankungen, die ähnliche MRT-Befunde aufweisen können, begründet die Notwendigkeit zur Suche nach weiteren paraklinischen Befunden, die die diagnostische Sicherheit bei Stellung der Diagnose „MS“ erhöhen können und die darüber hinaus evtl. auch zum Monitoring des Krankheitsverlaufs und des Ansprechens auf eine Therapie dienen könnten. In jüngerer Zeit ist postuliert worden, daß die sog. Virchow-Robin-Räume (VRS), das perivaskuläre Kompartiment, welches kleine zerebrale Gefäße umscheidet, ein neuer neuroradiologischer Marker der MS sein könnten, nachdem berichtet wurde, daß signifikant mehr MS-Patienten in der MRT detektierbare subkortikale VRS haben als gesunde Kontrollen (44).

Wir haben in einem multimodalen MRT-Design, welches T1, T2 und FLAIR-Sequenzen umfaßte, Zahl und Größe der VRS bei 45 Patienten mit schubförmiger MS versus 30 gesunde Kontrollprobanden untersucht, beide Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich Alter und Geschlechterverteilung (Zusammenarbeit mit Prof. Frauke Zipp, Dr. Jens Würfel, Dr. Helmar Waiczies, Mareile Härtle, Cecilie-Vogt-Klinik für Neurologie). Hierbei konnten wir zeigen, daß sich VRS sowohl subkortikal als auch in den Basalganglien als in der Regel nicht größer als 3 mm messende, punktförmige oder tubulär geformte Strukturen in der Nähe von Blutgefäßen detektieren lassen.

Charakteristischerweise erscheinen VRS hyperintens in T2-Sequenzen und hypointens in T1-Sequenzen. In FLAIR-Sequenzen bilden sich VRS ebenfalls hypointens ab, d.h. VRS sind sowohl in T2 als auch in FLAIR-Sequenzen etwa liquorisointens. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, daß sich mittels dieser Sequenzen VRS eindeutig von entzündlichen (z.B. MS) oder vaskulären (z.B. lakunäre ischämische Defekte) Läsionen unterscheiden lassen: diese stellen sich wie VRS auf T2-gewichteten Bildern hyperintens (liquor-isointens) dar, auf T1-gewichteten Bildern ebenfalls wie VRS hypointens (liquorisointens), auf FLAIR-Bildern jedoch hyperintens im Gegensatz zu VRS, welche in dieser Sequenz wieder liquorisointens, also hypointens, zur Darstellung kommen. Aus unserer klinischen Erfahrung wissen wir, daß VRS aufgrund der Unkenntnis des oben dargelegten Signalverhaltens in den unterschiedlichen Sequenzen nicht selten fälschlicherweise als entzündliche Läsionen fehlgedeutet und ebenso befundet werden, was eine weitere Ursache der eingangs diskutierten Schwierigkeiten bei der korrekten Differentialdiagnose von WML und damit der Verunsicherung von Patienten sein dürfte.

Nachdem es uns erfolgreich gelungen war, VRS von ischämischen und entzündlichen Läsionen mittels der o.g. Sequenzen zu differenzieren, haben wir untersucht, inwieweit sich MS-Patienten und gesunde Kontrollpersonen hinsichtlich Zahl und Größe der VRS unterscheiden. Hier machten wir die interessante Beobachtung, daß auch gesunde Probanden in der kraniellen MRT detektierbare VRS hatten, und daß sich die Zahl der VRS zwischen Probanden und MS-Patienten nicht signifikant unterschied (45). In der MRT sichtbare VRS müssen also als physiologisches Phänomen bzw. normaler neuroradiologischer Befund angesehen werden und nicht als *per se* pathologischer Befund, etwa im Zusammenhang mit einer MS, wie zuvor postuliert (44). Bemerkenswert war jedoch, daß die VRS-

Volumina bei den MS-Patienten signifikant höher waren als bei den gesunden Probanden, und daß sich eine signifikante Altersabhängigkeit der Größe bzw. Volumina der VRS (größere VRS bei älteren Personen) nur bei den gesunden Probanden, nicht jedoch bei den MS-Patienten detektieren ließ. Dies könnte dafür sprechen, daß bei der MS noch andere Faktoren als nur das Alter und damit die altersbedingte Hirnatrophie einen Einfluß auf die Größe der VRS haben. Vor dem Hintergrund der Hypothese, daß die VRS Ort entzündlicher Aktivität in der MS sein könnten, also ein Raum, in dem enzephalitogene T-Zellen auf Antigen-präsentierende Zellen des ZNS treffen und konsekutiv die inflammatorische Kaskade in Gang setzen (46), haben wir daraufhin erstmalig in einer longitudinalen Substudie an 18 Patienten, die monatliche MRT-Untersuchungen über den Zeitraum von bis zu einem Jahr hatten, untersucht, ob sich die Zahl und Größe der VRS ändern, wenn ein Wechsel von einem Untersuchungszeitpunkt ohne Nachweis intrazerebraler Kontrastmittelaufnahme zu einem Untersuchungszeitpunkt mit Nachweis intrazerebraler Kontrastmittelaufnahme als Zeichen einer gestörten Blut-Hirn-Schranke auftritt. In der Tat fanden wir, daß die Zahl und Volumina der VRS von einem Kontrastmittel-negativen zu einem Kontrastmittel-positiven Untersuchungszeitpunkt signifikant zunahm, während beim Wechsel von einem Kontrastmittel-positiven zu einem Kontrastmittel-negativen Untersuchungszeitpunkt Zahl und Volumina der VRS nicht signifikant abnahmen. Diese Befunde müssen natürlich aufgrund der kleinen Fallzahl mit Vorsicht interpretiert werden, könnten aber neuroradiologische Hinweise darauf sein, daß die VRS für neuroinflammatorische Prozesse von Bedeutung sein könnten. Festzustellen bleibt nach unseren Ergebnissen allerdings auch, daß sich VRS bislang nicht zur Diskrimination gesund versus krank bzw. MS versus nicht-MS eignen und somit derzeit nicht als bildgebender Surrogatmarker der MS angesehen werden können. Die rasche

Dissemination dieser Erkenntnisse vor allem auch in die klinische Neurologie und Neuroradiologie ist geboten. Eigene Arbeiten am Hochfeld-MRT (7 Tesla) zur besseren Darstellbarkeit der VRS haben vor kurzem begonnen.

Eigene Referenzen:

Wuerfel J, Haertle M, Waiczies H, Tysiak E, Bechmann I, Zipp F*, **Paul F***.

Perivascular spaces-MRI marker of inflammatory activity in the brain?

Brain 2008;131:2332-40.

2.3 Diagnostik des spinalen Motoneuronenverlustes in der Multiplen Sklerose

Wir selbst konnten vor kurzem sowohl im Tiermodell der MS, der sog. experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), als auch in histopathologischen Untersuchungen an verstorbenen MS-Patienten zeigen, daß es zu einem signifikanten Verlust spinaler alpha- und gamma-Motoneurone kommt (12; Zusammenarbeit mit Prof. Robert Nitsch, Dr. Johannes Vogt, Centrum für Anatomie; Prof. Frauke Zipp, PD Dr. Orhan Aktas, Cecilie-Vogt-Klinik für Neurologie). Darüber hinaus hat uns die Frage beschäftigt, ob sich dieser erhebliche spinale Neuronenverlust bei den verstorbenen MS-Patienten von bis zu etwa 75% im Vergleich zu Kontrollen auch *in vivo* bei MS-Patienten nachweisen läßt. Wir haben daraufhin eine große Zahl von MS-Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien und alters- und geschlechtsgematchten gesunden Kontrollen (69 versus 75) elektroneurographisch untersucht. Patienten und Probanden mit einer Anamnese peripherer Nervenläsionen, von Polyneuropathien, Engpass-Syndromen (z.B. Karpaltunnel-Syndrom) oder Radikulopathien wurden ausgeschlossen. Wir führten eine sensible und/oder motorische Neurographie folgender peripherer Nerven durch: N. medianus, N. ulnaris, N. radialis, N. peroneus, N. tibialis und N. suralis. Neben der motorischen und/oder sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) wurden die Amplituden der sensiblen Nervenaktionspotentiale (SNAP) und der motorischen Antwort (sog. Muskelsummenaktionspotential (MSAP)) bestimmt. Letzteres gilt als grober Parameter für die Zahl der funktionsfähigen motorischen Einheiten in einem Muskel bzw. der Zahl der erregbaren Axone (47, 48). Eine erhebliche Reduktion des MSAP findet sich bei allen Erkrankungen, bei denen es zu einem hochgradigen Axonverlust kommt, etwa bei axonalen Polyneuropathien, traumatischen

Nervenläsionen, oder auch bei Motoneuronerkrankungen, etwa der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS). Allerdings hängt die Höhe des MSAP (in mV angegeben) auch von einigen methodischen Aspekten ab, etwa der Position der Ableitelektrode auf dem Muskelbauch des zu untersuchenden Muskels (Entfernung von der Endplattenregion) oder von der Körpertemperatur. Zudem ist die Bestimmung des MSAP als Verlaufsparemeter, etwa zur Erkennung einer Progression der ALS, kritisiert worden, da diese Methode im Falle eines langsamen Motoneuronverlustes diesen nicht ausreichend abbildet: durch kollaterale Reinnervation, wie sie bei langsamen neurogenen Prozessen vorkommt, kann das MSAP lange normal oder allenfalls leicht reduziert sein, obwohl schon ein erheblicher Prozentsatz der Axone untergegangen ist (49, 50). Hinzu kommt die erhebliche interindividuelle Variabilität der MSAP-Amplituden, die die Angabe eines unteren Grenzwertes, unterhalb dessen sicher eine Pathologie angenommen werden kann, erschwert. Auch die intraindividuelle Variabilität kann erheblich sein, wenn bei Längsschnitt-Untersuchungen nicht auf die o.g. technischen Aspekte geachtet wird. Daher ist die Bestimmung der MSAP-Amplituden, obwohl diese in vielen klinischen Studien zur Progression der ALS angewandt wurde, als Methode zur Detektion und Quantifizierung eines progressiven Motoneuronverlustes nicht unumstritten und wird immer wieder kontrovers diskutiert (51). In dem von uns untersuchten Kollektiv fanden wir interessanterweise bei normalen Parametern der sensiblen und motorischen NLG ohne signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe und ebenfalls normalen SNAP-Amplituden hochsignifikant niedrigere MSAP-Amplituden in der MS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In nur wenigen Fällen waren die in der Patientengruppe erhobenen Amplituden eindeutig pathologisch (zum Problem des unteren Grenzwertes s.o.). Dies könnte dadurch bedingt sein, daß bei der MS der Motoneuronverlust sehr langsam voranschreitet, so daß die Möglichkeit zur

kollateralen Reinnervation besteht. Diese Reinnervation würde dazu führen, daß die MSAP-Amplituden trotz eines Motoneuronverlustes lange normal oder allenfalls gering reduziert wären. Für einen sehr langsam voranschreitenden Verlust von Motoneuronen spricht auch die klinische Erfahrung, daß typische Befunde eines rasch progredienten Untergangs von Motoneuronen, wie z.B. eine deutliche Muskelatrophie und Faszikulationen, wie sie klassischerweise bei der ALS, dem „Prototyp“ einer neurodegenerativen Motoneuronerkrankung gesehen werden, bei der MS nur sehr selten erhoben werden können. Unsere neurographischen Befunde sprechen allerdings gegen eine periphere Neuropathie als Ursache der niedrigeren MSAP-Amplituden bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen, da dann auch Verzögerungen der motorischen und sensiblen Nervenleitgeschwindigkeiten und Reduktionen der Amplituden der sensiblen Nervenaktionspotentiale zu erwarten wären, was in unserem Patientenkollektiv nicht der Fall war. Dies ist zunächst schon eine wichtige Aussage, da auch periphere Nervenläsionen bzw. Demyelinisierungen bei der MS, u.a. aufgrund einer möglichen Antigen-Verwandtschaft bzw. Epitop-Ähnlichkeiten zwischen zentralen und peripheren Myelin-Bestandteilen, immer wieder vermutet oder kasuistisch berichtet wurden (52), aber nicht wirklich systematisch und methodisch standardisiert an größeren Kollektiven untersucht wurden.

Zum sicheren Nachweis eines Motoneuronverlustes *in vivo* sind die Befunde unserer neurographischen Untersuchungen allerdings nicht ausreichend, zumal wir auch bis zum jetzigen Zeitpunkt nur querschnittliche Daten erhoben haben und bislang noch keine longitudinale Kohorte, an der sich evtl. intraindividuelle Abnahmen der MSAP-Amplituden über die Zeit nachweisen lassen könnten, untersuchen konnten. Zur weiteren Untermauerung unserer Hypothese eines substanziellen *in vivo* Motoneuronverlustes bei MS-Patienten bzw. zur Erklärung und Absicherung unserer

murinen und humanen histopathologischen Daten haben wir daher eine weitere neurophysiologische Untersuchung bei einem Teil unserer Patienten (n=25) und Kontrollprobanden (n=34) durchgeführt, die sich hierzu bereit erklärten: die sog. MUNE-Methode („motor unit number estimate“) (53). Mit dieser Methode kann *in vivo*, basierend auf nerven- und muskelphysiologischen Erkenntnissen sowie gewissen mathematischen und statistischen Annahmen, die Zahl der motorischen Einheiten in einem Muskel näherungsweise abgeschätzt werden. Mehrere Autoren haben entsprechende Meß- und Auswertemethoden vorgeschlagen. Allerdings hat jede dieser Methoden eine zum Teil nicht unbeträchtliche Fehleranfälligkeit, und bislang konnten sich die verschiedenen MUNE-Methoden international wegen der fehlenden Standardisierung und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen elektrophysiologischen Laboratorien kaum etablieren. In der klinischen Routine spielt sie daher bislang kaum eine Rolle, nicht zuletzt auch wegen der langen Untersuchungszeiten (bis zu 30 Minuten für einen Muskel) und der für den Patienten recht belastenden Untersuchungstechnik (im Einzelfall bis zu mehrere Hundert elektrische Stimuli pro Muskel bzw. Nerv erforderlich, welche z.T. vom Patienten als sehr schmerzhaft empfunden werden). Wir haben uns für die sog. Inkrement-Methode nach McComas entschieden (54), die als relativ zuverlässig und gut reproduzierbar gilt, und zu der auch Normwerte für die Zahl motorischer Einheiten publiziert sind (54, 55). Aus Zeitgründen sowie zur Reduktion der Belastung für die Probanden und Patienten auf ein absolut unvermeidbares Minimum haben wir standardisiert den rechten N. ulnaris am Handgelenk stimuliert und vom M. abductor digiti minimi abgeleitet. Mit dieser Methode konnten wir bei verblindeter Untersuchung und Auswertung tatsächlich eine signifikant niedrigere Zahl motorischer Einheiten bei MS-Patienten versus gesunde Kontrollprobanden feststellen. Somit ergeben unsere Untersuchungen erstmalig auch

elektrophysiologische Hinweise auf einen Verlust spinaler Motoneurone bei MS-Patienten. Ob sich die MUNE-Bestimmung als Verlaufspareter zur Detektion der Krankheitsprogression eignet, wie es für die ALS vorgeschlagen wurde, und ob diese Methode daher evtl. einmal als Endpunkt in klinischen Studien zur Neuroprotektion in der MS in Frage kommt, ist derzeit Gegenstand weiterer an unserer Klinik durchgeführter Untersuchungen. Diese Arbeit ist von großer Bedeutung, da sie noch einmal mehr die neuronale Pathologie bei der MS unterstreicht, die bislang vernachlässigt wurde, was u.a. auch daran erkennbar ist, daß sämtliche bislang zur Verfügung stehenden sog. immunmodulatorischen Therapien der MS auf eine Verminderung der inflammatorischen Aktivität und auf eine Reduktion der Schubfrequenz abzielen, ohne jedoch belegte neuroprotektive Wirkungen zu haben. Aus der Erkenntnis, daß die langfristige Behinderung bei der MS wahrscheinlich eher mit dem Ausmaß des Neuronen- und Axonverlustes (erkennlich in der MRT u.a. durch die Hirnatrophie) korreliert als mit der entzündlichen Aktivität (sog. T2-Last, „burden of disease“), ergibt sich zwingend die Notwendigkeit zur Entwicklung neuroprotektiver Therapieansätze in der MS.

Eigene Referenzen:

Vogt J*, Paul F*, Aktas O*, Müller-Wielsch K, Dörr J, Dörr S, Bharathi BS, Glumm R, Schmitz C, Steinbusch H, Raine CS, Tsokos M, Nitsch R, Zipp F.

Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.

Annals of Neurology 2009;66:310-22.

2.4 Untersuchung von Aufmerksamkeitsdefiziten bei Multipler Sklerose: Der „Attention Network Test“ (ANT)

Kognitive Störungen sind eines der häufigsten Symptome bei MS und betreffen bis zu 70% der Erkrankten im Verlauf. Häufig sind bestimmte kognitive Einschränkungen bereits in sehr frühem Stadium, also bei Diagnosestellung bzw. beim Klinisch Isolierten Syndrom nachweisbar (56-58). Zu den typischerweise betroffenen kognitiven Domänen bei MS gehören u.a. Aufmerksamkeit, Arbeitsgedächtnis, verbales und visuo-spatiales Gedächtnis, Informationsverarbeitungsgeschwindigkeit und exekutive Funktionen, während intellektuelle Funktionen und sprachliche Fähigkeiten weniger beeinträchtigt sind (59). Bislang wird kognitiven Störungen bei MS, vor allem im Hinblick auf die Konsequenzen derselben für die Berufstätigkeit und die sozialen Funktionen, zu wenig Beachtung geschenkt.

Studien zu den bei MS häufigen Aufmerksamkeitsdefiziten (attentionale Defizite) haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Definitionen des Terminus „attention“ und unterschiedlicher Testverfahren. Neuere Forschungsergebnisse aus den kognitiven Neurowissenschaften deuten darauf hin, daß das menschliche Aufmerksamkeitssystem aus drei distinkten Netzwerken besteht („alerting“, „orienting“ und „executive control“) (60, 61). Es konnte gezeigt werden, daß diese drei Netzwerke neuroanatomisch unterschieden werden können und auch von unterschiedlichen Neurotransmittern moduliert werden (60-62). Ein neueres Verfahren zur Untersuchung des menschlichen attentionalen Systems ist der sog. „Attention Network Test“ (ANT), der als computer-basierter Test entwickelt wurde und die drei attentionalen Netzwerke mit ausreichender Reliabilität voneinander abgrenzen konnte (63). Dieser Test konnte in gesunden Populationen validiert

werden, mittlerweile ist er auch bei verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen eingesetzt worden (u.a. bei affektiven Störungen, Demenz, traumatischer Hirnschädigung etc.). Wir haben in Kooperation mit der Psychiatrischen Klinik am Campus Benjamin Franklin der Charité (Dr. Carsten Urbanek, Prof. Michael Dettling) den ANT kürzlich erstmalig bei 57 MS-Patienten eingesetzt und die Testergebnisse mit denen 57 alters- und geschlechtsgemachter gesunder Kontrollprobanden verglichen (64). Wenig überraschend war eine längere globale Reaktionszeit der MS-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Interessant und überraschend war jedoch das Ergebnis, daß die Gruppe der MS-Patienten signifikante Unterschiede zu den Kontrollen im „alerting“-Netzwerk aufwies, wohingegen die „orienting“- und „executive control“-Netzwerke sich nicht unterschieden. Die große Mehrheit der in dieser Kohorte untersuchten Patienten war nicht messbar kognitiv beeinträchtigt. Die Ursachen dieser selektiven Affektion des „alerting“-Netzwerkes sind bislang unklar, möglicherweise spielen hier veränderte Neurotransmitterspiegel eine Rolle. Das „alerting“-Netzwerk soll vornehmlich noradrenerg moduliert sein im Gegensatz zu den „orienting“- und „executive control“-Netzwerken, die als überwiegend cholinerg und dopaminerg moduliert gelten (65). Es könnte sein, daß die bei der MS häufigen attentionalen Defizite auch durch Alterationen des „alerting“-Netzwerkes bedingt sind. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob der ANT in der Routinediagnostik sowie zur Verlaufsbeurteilung attentionaler Störungen bei MS sinnvoll einsetzbar ist.

Eigene Referenzen:

Urbanek C, Weinges-Evers N, Bellmann-Strobl J, ..., **Paul F**. Attention Network Test reveals alerting network dysfunction in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis** **2010;16:93-99**.

2.5 Entwicklung eines neuen Antikörper-Assays zur Diagnostik und Differentialdiagnostik der Neuromyelitis optica

Wir haben kürzlich einen neuartigen Radioimmunopräzipitations-Assay (RIPA) mit rekombinantem AQP4 entwickelt, der mit einer Sensitivität von 63% bei einer hohen Spezifität von 98% Antikörper gegen AQP4 im Serum von NMO-Patienten nachweist (66; Zusammenarbeit mit Prof. Angela Vincent, Dr. Sven Jarius, Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford, UK; Prof. Seelig, Dr. Blüthner, Institut für Immunologie und Molekulare Genetik, Karlsruhe). Hierdurch konnten wir erstmals zeigen, daß tatsächlich AQP4 das Zielantigen bei der Mehrzahl der Patienten mit NMO und LETM (longitudinale extensive transverse Myelitis) ist; letztere gilt als abortive bzw. inaugurale Form der NMO (67). Demgegenüber waren AK gegen AQP4 bei einer großen Zahl von Patienten mit relevanten Differentialdiagnosen (v.a. MS und andere Autoimmunerkrankungen) praktisch nicht nachweisbar. Zudem ist der RIPA im Gegensatz zur indirekten Immunfluoreszenz, welche personal- und kostenintensiv ist, Untersucher-unabhängig, reproduzierbar und kostengünstig; in kurzer Zeit können viele Proben untersucht werden. Somit besteht mit dieser Nachweismethode erstmals die Möglichkeit einer frühzeitigen und klinisch relevanten Differenzierung der NMO von der MS und weiteren Autoimmunerkrankungen und damit die Möglichkeit einer zügigeren Einleitung wirksamer immunsuppressiver Therapien bei den von schwerer Behinderung und verkürzter Lebenserwartung bedrohten NMO-Patienten. Die Entwicklung des RIPA, der mittlerweile in der klinischen Routine etabliert ist, jedoch mit etwas über 60% eine zu niedrige Sensitivität hat, hat die Entwicklung weiterer AK-Testverfahren für den klinischen Routinegebrauch stimuliert. Mittlerweile sind neben der Immunfluoreszenz und dem RIPA weitere Assays zur Testung auf AK gegen AQP4 erhältlich, die teilweise eine höhere Sensitivität bei

ähnlich hoher Spezifität aufweisen. Erste retrospektive Daten lassen vermuten, daß die Bestimmung von AK gegen AQP4 auch für das Monitoring der Krankheitsaktivität bzw. zur Verlaufsbeurteilung der NMO dienen könnten (68). Hiernach scheint die Höhe der AK-Titer mit der klinischen Krankheitsaktivität zu korrelieren, und die Titer scheinen unter immunsuppressiver bzw. B-Zell-depletierender Therapie abzunehmen. Eigene, bislang unveröffentlichte Daten, die gerade gemeinsam mit der deutschlandweiten NEMOS-Initiative (Neuromyelitis optica Studiengruppe) prospektiv erhoben werden, deuten in dieselbe Richtung.

Eigene Referenzen:

Paul F*, Jarius S*, Aktas O*, Bluthner M, Bauer O, Appelhans H, Franciotta D, Bergamaschi R, Littleton E, Palace J, Seelig HP, Hohlfeld R, Vincent A, Zipp F. Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica.

PLoS Medicine 2007;4:e133.

Jarius S, **Paul F**, Franciotta D, Waters P, Zipp F, Hohlfeld R, Vincent A, Wildemann B. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica.

Nature Clinical Practice Neurology 2008;4:202-14.

Paul F, Jarius S, Glumm R, Wildemann B, Zipp F, Aktas O.

Neues zu Pathogenese, Diagnostik und Therapie der Neuromyelitis optica.

Deutsche Medizinische Wochenschrift 2008;133:1125-9.

Jarius S, **Paul F**, Franciotta D, Aktas O, Hohlfeld R, Zipp F, Vincent A.

Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica-incorporation of NMO-IgG status.

Nature Clinical Practice Neurology 2007;3:E1.

Reuss R, Rommer PS, Brück W, **Paul F**, Bolz M, Jarius S, Boettcher T, Grossmann A, Bock A, Zipp F, Benecke R, Zettl UK.

Pregnancy-related relapses of acute myelopathy and miscarriage: case presentation.

British Medical Journal 2009;339:b3862.

Reuss R, Rommer PS, Brück W, **Paul F**, Bolz M, Jarius S, Boettcher T, Grossmann A, Bock A, Zipp F, Benecke R, Zettl UK.

Pregnancy-related relapses of acute myelopathy and miscarriage: case progression.

British Medical Journal 2009;339:b4025.

Reuss R, Rommer PS, Brück W, **Paul F**, Bolz M, Jarius S, Boettcher T, Grossmann A, Bock A, Zipp F, Benecke R, Zettl UK.

Pregnancy-related relapses of acute myelopathy and miscarriage: case outcome.

British Medical Journal 2009;339:b4026.

Jarius S, **Paul F**, Franciotta D, Wildemann B. Neuromyelitis optica and aquaporin-4.
In: T. Tabira, T. Yamamura, J. Kira (Editors), Current topics in Neuroimmunology,
Medimond, 2007.

Antibody to Aquaporin 4 in the Diagnosis of Neuromyelitis Optica

Friedemann Paul^{1,2}, Sven Jarius^{3,4,5}, Orhan Aktas^{1,2}, Martin Bluthner⁶, Oliver Bauer⁶, Heribert Appelhans⁶, Diego Franciotta⁷, Roberto Bergamaschi⁷, Edward Littleton^{4,5}, Jacqueline Palace^{4,5}, Hans-Peter Seelig⁶, Reinhard Hohlfeld³, Angela Vincent^{4,5}, Frauke Zipp^{1,2*}

1 Cecilie-Vogt-Clinic for Molecular Neurology, Charité, University Medicine Berlin, Berlin, Germany, **2** Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany, **3** Institute of Clinical Neuroimmunology, University of Munich, Munich, Germany, **4** Department of Clinical Neurology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, **5** Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, **6** Institute of Immunology and Molecular Genetics, Karlsruhe, Germany, **7** Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Foundation Neurological Institute C. Mondino, University of Pavia, Pavia, Italy

Funding: This work was supported by a grant of the Ministry of Education and Science to FZ (Bundesministerium für Bildung und Forschung-NBL III), and partly by Collaborative Research Center grants to OA and FZ (Sonderforschungsbereich [SFB] 507, SFB 650), and a fellowship from the European Neurological Society to S.J. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Academic Editor: Hans Lassmann, University of Vienna, Austria

Citation: Paul F, Jarius S, Aktas O, Bluthner M, Bauer O, et al. (2007) Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica. *PLoS Med* 4(4): e133. doi:10.1371/journal.pmed.0040133

Received: November 15, 2006

Accepted: February 15, 2007

Published: April 17, 2007

Copyright: © 2007 Paul et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abbreviations: CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; LETM, longitudinally extensive transverse myelitis; MRI, magnetic resonance imaging; MS, multiple sclerosis; NMO, neuromyelitis optica; RIPA, radioimmunoprecipitation assay; SD, standard deviation

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: frauke.zipp@charite.de

These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Background

Neuromyelitis optica (NMO) is a demyelinating disease of the central nervous system (CNS) of putative autoimmune aetiology. Early discrimination between multiple sclerosis (MS) and NMO is important, as optimum treatment for both diseases may differ considerably. Recently, using indirect immunofluorescence analysis, a new serum autoantibody (NMO-IgG) has been detected in NMO patients. The binding sites of this autoantibody were reported to colocalize with aquaporin 4 (AQP4) water channels. Thus we hypothesized that AQP4 antibodies in fact characterize NMO patients.

Methods and Findings

Based on these observations we cloned human water channel AQP4, expressed the protein in a eukaryotic transcription/translation system, and employed the recombinant AQP4 to establish a new radioimmunoprecipitation assay (RIPA). Indeed, application of this RIPA showed that antibodies against AQP4 exist in the majority of patients with NMO ($n = 37$; 21 positive) as well as in patients with isolated longitudinally extensive transverse myelitis ($n = 6$; six positive), corresponding to a sensitivity of 62.8% and a specificity of 98.3%. By contrast, AQP4 antibodies were virtually absent in 291 other participants, which included patients with MS ($n = 144$; four positive), patients with other inflammatory and noninflammatory neurological diseases ($n = 73$; one positive), patients with systemic autoimmune diseases ($n = 45$; 0 positive), and healthy participants ($n = 29$; 0 positive).

Conclusions

In the largest series reported so far to our knowledge, we quantified AQP4 antibodies in patients with NMO versus various other diseases, and showed that the aquaporin 4 water channel is a target antigen in a majority of patients with NMO. The newly developed assay represents a highly specific, observer-independent, and easily reproducible detection method facilitating clinically relevant discrimination between NMO, MS, and other inflammatory diseases.

The Editors' Summary of this article follows the references.

Introduction

Neuromyelitis optica (NMO, Devic syndrome) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS), mainly affecting the optic nerves and the spinal cord [1–4]. It is still a matter of debate whether NMO represents a disease entity in itself or whether it is a subform of multiple sclerosis (MS). Like MS, NMO follows a relapsing–remitting course in the majority of cases, but it usually leads to more severe disability with impairment of functional vision and/or loss of ambulation. Early differentiation of NMO from MS and other inflammatory and demyelinating diseases of the CNS—such as vasculitis, neuroborreliosis, paraneoplastic neurological syndromes, or vitamin B12 deficiency—is highly desirable, as treatment options and prognoses differ widely. However, such differentiation may be difficult or even impossible owing to overlap in clinical presentation and cerebrospinal fluid (CSF) and magnetic resonance imaging (MRI) findings [5].

A serum autoantibody (called NMO-IgG) binding to CNS microvessels, pia, subpia, and Virchow-Robin spaces was recently identified in patients with NMO, using indirect immunofluorescence [6]. The binding sites of this autoantibody were then reported to colocalize with aquaporin 4 (AQP4) water channels in mouse tissue of the brain, stomach and kidney, generating the hypothesis of NMO as an autoimmune channelopathy [7]. However, to date there has been no systematic assessment of the occurrence and frequency of AQP4 antibodies in NMO and other demyelinating diseases. It is therefore still unclear whether antibodies to AQP4 are specific for NMO and whether testing for these antibodies may be useful for its diagnosis and its distinction from diseases with similar clinical and neuroradiological patterns, such as MS and other autoimmune diseases with involvement of the CNS. The aim of our study was to assess the frequency and specificity of antibodies to AQP4 in patients with NMO, as well as relevant differential diagnoses, by means of a newly developed radioimmunoprecipitation assay (RIPA).

Methods

Patients

NMO patients meeting the diagnostic criteria proposed by Wingerchuk et al. [1] and patients with longitudinally extensive transverse myelitis (LETM) were recruited from several neurology centers in Germany, Italy, and Great Britain. Only patients for whom complete clinical and paraclinical data were available (i.e., clinical course, laboratory and CSF findings, MRI scans of the brain and spinal cord) were eligible for participation in the study. Based upon these selection criteria, 37 patients with NMO were included. Spinal cord lesions extending over three or more vertebral segments in MRI were present in all NMO patients, thus also fulfilling the recently published revised criteria [8]. Another six patients had isolated LETM (monophasic in three, relapsing in three), with spinal lesions extending over three or more segments, but without optic neuritis, and were thus considered to be at “high risk of NMO” according to previous proposals [9]. In addition, tests were carried out on serum samples from 217 patients with miscellaneous inflammatory and noninflammatory neurological disorders (among them

144 patients with MS fulfilling the panel criteria [10]), 45 patients with various rheumatological autoimmune diseases, and 29 healthy participants included as controls (for diagnostic categories see Table 1). Control participants were recruited from the Cecilie-Vogt-Clinic for Molecular Neurology in Berlin, Germany, the Clinic of Rheumatology in Berlin, Germany, and the Institute of Clinical Neuroimmunology in Munich, Germany. Serum testing in patients was approved by the ethics committees of the participating institutions.

RIPA

Following PCR-mediated amplification with suitable primer pairs, the cDNA-sequence of human aquaporin 4 (full-length cDNA, amino acids 1–323) was cloned into a pCITE4a vector (Novagen/Merck Biosciences, <http://www.merckbiosciences.com>). In vitro transcription/translation (IvTT) reactions were performed with the cDNA constructs using a commercial system according to the manufacturer’s instructions (Promega, <http://www.promega.com>). Briefly, 25 μ l of rabbit reticulocyte lysate, 2 μ l of reaction buffer, 1 μ l of amino acid mixture (without methionine), 1 μ l of T7 polymerase, 3.5 μ l of Redivue L-³⁵S-methionine (GE Healthcare, <http://www4.gelifesciences.com>), 1 μ l of RNasin (Cambrex BioScience, <http://www.cambrex.com>), and 1 μ g of template DNA were pipetted into a nuclease-free 1.5 ml reaction tube. Nuclease-free water was added to a final volume of 50 μ l. After 90 min incubation at 30 °C, unincorporated ³⁵S-methionine was removed by gel filtration on a sephadex G-50 MicroSpin column (GE Healthcare). The percentage of incorporated ³⁵S-methionine was calculated using an LS1801 liquid scintillation counter (Beckman, <http://www.beckmancoulter.com>). Quality and concentration of labeled recombinant protein were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

Recombinant ³⁵S-methionine-AQP4 was diluted in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.15% Tween-20, 100,000 KIE Trasyolol, 10 mM benzamidine, and 0.1% bovine serum albumin (working dilution) to yield an activity of 40,000 cpm in 50 μ l. Serum sample aliquots of 5 μ l each were added to a 96-well plate, and 50 μ l of ³⁵S-methionine-AQP4 working dilution were added to each well. Following incubation for 3 h at 4 °C on a shaker, 20 μ l protein A Fractogel beads (Merck) were added to each well. After incubation for 1 h at 4 °C the reaction mixtures were transferred to a 0.65 μ m Durapore 96-well filter plate (Millipore, <http://www.millipore.com>). Unbound antigen was removed by vacuum filtration and washing of the filter plates (30 times) with 100 μ l of 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20 each time. After drying the plates overnight, 20 μ l liquid scintillation mix MicroScintO (PerkinElmer, <http://www.perkinelmer.com>) were added to each well and the plates were counted using a Topcount NXT 96-well liquid scintillation counter (PerkinElmer). All determinations were performed in duplicate. A rabbit control antibody (rbAQP4) was prepared, using standard immunization techniques, by immunizing a New Zealand white rabbit with a human AQP4 peptide cocktail.

Mean cpm of five negative controls (healthy blood donors) were used to calculate the antibody ratio (Ab-ratio) according to a formula derived from Frey et al. [11]: Ab-ratio = sample cpm / [mean negative cpm (five negative controls) + $f \times SD$] \times 10. Factor f was 3.041, calculated on the basis of a confidence

Table 1. Study Population and Proportion of AQP4-Positive Individuals in Ten Diagnostic Categories

Category	Number	Sex, Female/Male	Age, y, Mean (Range)	AQP4 Positive, Number	AQP4 Positive, %
NMO	37	30/7	43.8 (12–72)	21	56.8
LETM	6	6/0	38 (22–57)	6	100
MS/ON+	77	50/27	40.9 (18–61)	1	1.3
MS/ON–	67	41/26	41.8 (21–65)	3	4.5
ON	11	9/2	41.6 (17–68)	0	0
MYL	15	8/7	40.3 (19–56)	0	0
OIND	20	12/8	49.4 (20–76)	0	0
OND	27	19/8	60.7 (18–87)	1	3.7
RD	45	36/9	52.3 (24–76)	0	0
HC	29	18/11	38.3 (15–61)	0	0
Total controls	291	193/98	45.6 (15–87)	5	1.7

Diagnostic categories: NMO, neuromyelitis optica; LETM, longitudinally extensive transverse myelitis extending over three or more vertebral segments in MRI (three monophasic, three relapsing); MS/ON+, multiple sclerosis with optic neuritis; MS/ON–, multiple sclerosis without optic neuritis; ON, optic neuritis/optic neuropathy only (six monophasic, three relapsing, two progressive optic atrophy of unknown aetiology); MYL, myelitis extending over fewer than three vertebral segments in MRI (11 monophasic, four relapsing); OIND, other inflammatory neurological disorders and systemic disorders with neurological involvement (five vasculitis, one Wegener disease, two neuroborreliosis, one paraneoplastic encephalitis, one meningitis, three chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, three systemic lupus erythematosus, one CNS lymphoma, two vitamin B12 deficiency, one zoster myelitis and radiculitis); OND, other noninflammatory neurological diseases (carpal tunnel syndrome, radiculopathy, cerebral ischemia, vertigo); RD, rheumatological diseases without neurological involvement (11 rheumatoid arthritis, 16 Sjögren syndrome, eight systemic lupus erythematosus, nine Wegener disease, one Bechterew disease); HC, healthy controls.
doi:10.1371/journal.pmed.0040133.t001

interval of 97.5%. Cutoff was also calculated by means of the equation suggested by Frey et al. [11]. All results with an Ab-ratio >11 were considered positive. All samples were coded with an alphanumeric ID and were analyzed blind. Testing of the rabbit control antibody yielded an Ab-ratio of 133.2.

Statistics

Data processing (descriptive statistics: mean, range, and standard deviation [SD]) and statistical analyses (antibody positivity between groups: Fisher exact test; antibody ratios between groups: Mann-Whitney test) were performed using SPSS version 12.0 (<http://www.spss.com>).

Results

Establishment of a RIPA Based on Recombinant Human AQP4

Using a eukaryotic transcription/translation system, we expressed full-length human AQP4 protein in a cell-free system, labeled with ³⁵S, and established a RIPA. By performing titrations with several different volumes of AQP4 positive and negative sera, we determined 5 µl to be the suitable serum volume for routine analysis (Figure 1A). We also tested two sera and the rabbit anti-AQP4 antibody (5 µl per sample) at different concentrations of ³⁵S-AQP4 and used the highest activity of ³⁵S-AQP4 for the subsequent investigations (Figure 1B). Determination of assay variation was performed for both the rabbit serum rAQP4 and the sera from nine individual patients by screening ten samples from each donor either on one single occasion (intra-assay variation) or on ten different occasions (interassay variation). The mean intra-assay coefficient of variation was 4.0% (SD 1.3%) and the mean interassay coefficient of variation was 20.7% (SD 2.4%) across the range of the assay. We also measured AQP4 antibodies longitudinally in an LETM patient over a period of 1 y, recording persistent antibody ratios between 23 and 28 (three measurements) during the first 6 mo, and a subsequent gradual decline to 16 under immunosuppression during the following 6 mo while the total amount of IgG remained unchanged (unpublished data).

Frequency of AQP4 Antibodies in Patient Populations

Next we tested sera from the different diagnostic categories. AQP4 antibodies were present (i.e., Ab-ratio > 11) in 21/37 patients with NMO and in 6/6 of those with LETM, but in only 5/291 control samples, including 4/144 with MS and 1/73 with other neurological diseases, 0/45 with rheumatological diseases, and 0/29 healthy individuals (Fisher exact test, Chi-square values ranging from 11.099 [NMO group versus optic neuritis/optic neuropathy group, $p = 0.001$] to 49.353 [NMO versus MS with optic neuritis group], $p < 0.001$ for all other tests) (Figure 2; Table 1). All four MS patients who tested positive were female, had Ab-ratios <15 and an onset age >30 y, and had mainly clinical symptoms related to spinal cord lesions, yet they did not meet the 1999 Wingerchuk criteria for NMO. All four patients had oligoclonal bands and none had spinal cord lesions extending over three or more vertebral segments. The patient from the group of individuals with other neurological diseases who tested positive in the RIPA had carpal tunnel syndrome and showed an Ab-ratio just above the cutoff. The results correspond to a sensitivity of 56.8% and a specificity of 98.3% for the test in NMO, and to 62.8% and 98.3%, respectively, if NMO and LETM patients are considered together. The positive and negative likelihood ratio reveal 33.03 and 0.44 for NMO, and 36.54 and 0.38 for NMO and LETM patients together. Mean antibody ratios in the NMO group were significantly higher than in the other groups (Mann-Whitney test, z -values ranging from -2.736 [NMO group versus optic neuritis/optic neuropathy group, $p = 0.006$] to -5.745 [NMO versus healthy controls], $p < 0.001$ for testing against all other groups). Different levels of antibody binding may indicate the existence of different affinity antibodies or different epitopes recognized in these patients. All positive samples were negative when tested against three control antigens: pemphigus vulgaris-associated autoantigen desmoglein 3; M. Addison- and autoimmune polyendocrine syndrome-associated steroid 21-hydroxylase; and the myositis-associated autoantigen Ku 80, expressed in the same vector system (unpublished data).

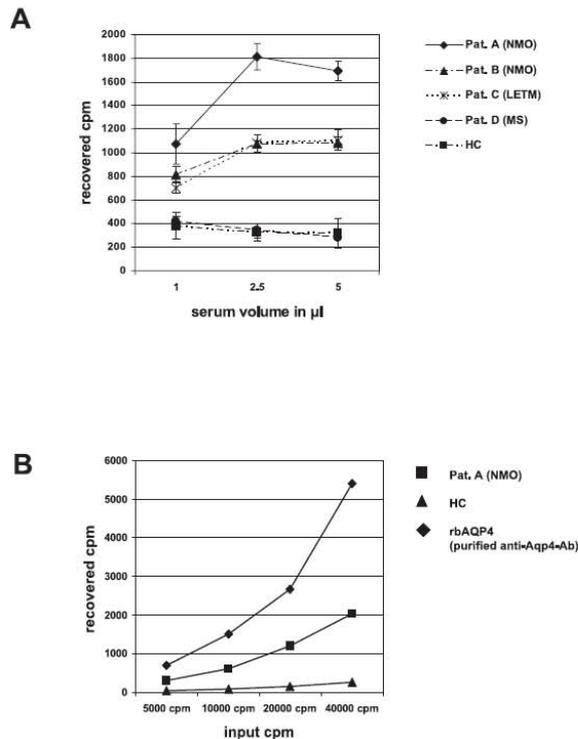


Figure 1. Characteristics of the Radioimmunoprecipitation Assay (A) Titration curve to assess the optimal serum volumes. Five samples are plotted: three positive (two NMO, one LETM) and two negative (one MS, one healthy control [HC]). While positive sera bound up to 1,800 cpm of ^{35}S -AQP4 with maximum binding at 2.5–5 μl , negative samples showed no more than 300–400 cpm of precipitation at all serum volumes. Values represent mean cpm of five independent measurements (error bars: SD). (B) Immunoprecipitation at different concentrations of ^{35}S -AQP4 (input cpm ranging from 5,000 to 40,000) of a positive serum (NMO), a negative serum (HC), and the rabbit serum rbAQP4 (5 μl per sample). doi:10.1371/journal.pmed.0040133.g001

Discussion

This study is, to our knowledge, the first to report on the frequency of autoantibodies recognizing the AQP4 water channel in patients with NMO and to evaluate its specificity when compared to an adequate control group of different patient populations and healthy individuals. Based on the seminal observations of Lennon and colleagues suggesting AQP4 as the target antigen in NMO [7], we cloned and expressed human AQP4 to establish a quantitative radioimmunoprecipitation assay. This novel approach allows standardized high-throughput analysis. In our series of patients with NMO and related disorders, we show that antibodies to the AQP4 water channel are present in 63% of patients with NMO or at high risk of the disease, but are virtually absent in patients with MS and other inflammatory and noninflammatory neurological diseases (5/217), as well as in patients with rheumatological diseases and in healthy controls (0/74). A methodological limitation here is the moderate interassay variation coefficient in this type of assay, although this can be overcome because of the very low intra-assay variation coefficient and the fact that a high number of samples can be measured simultaneously.

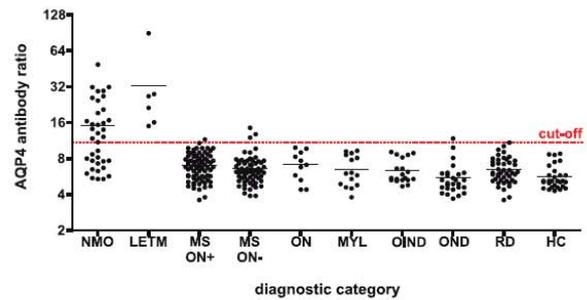


Figure 2. Antibody Ratios Found in Patients with NMO and in Patients with Relevant Differential Diagnoses or Healthy Controls

Each individual value represents the result from a single serum sample tested twice with the AQP4 RIPA. Black horizontal bars represent mean. The dashed horizontal line indicates the cutoff at an antibody ratio of 11. Diagnostic categories: NMO, neuromyelitis optica; LETM, longitudinally extensive transverse myelitis; MS/ON+, multiple sclerosis with optic neuritis; MS/ON-, multiple sclerosis without optic neuritis; ON, optic neuritis; MYL, myelitis extending over fewer than three vertebral segments on MRI; OIND, other inflammatory neurological disorders and systemic disorders with neurological involvement (e.g., neuroborreliosis, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; for exact classification see legend for Table 1); OND, other noninflammatory neurological diseases (e.g., carpal tunnel syndrome); RD, rheumatological diseases without neurological involvement (for exact classification see legend for Table 1); HC, healthy controls. doi:10.1371/journal.pmed.0040133.g002

Recently, the general presence of a brain-specific autoantibody, designated NMO-IgG, was described in NMO and determined in patients by indirect immunofluorescence [6]. This method of testing for NMO-IgG entails laborious and cost-intensive preabsorption of patient sera, employing blocking procedures in order to avoid unspecific binding and false-positive results. Our detection assay for the specific antibody AQP4 provides observer-independent, quantitative data, and is therefore easily reproducible. It remains to be shown whether all NMO-IgG-positive patients reported also reveal reactivity against the AQP4 water channel.

In our study, antibodies to the AQP4 water channel were sufficiently specific for NMO to allow differentiation from MS and other inflammatory neurological diseases. This finding is of clinical relevance, as diagnosis of NMO based solely on clinical, neuroradiological, and CSF findings may be difficult or impossible. One question that has yet to be answered satisfactorily is whether testing for AQP4 antibodies allows diagnosis of NMO after the first event (i.e., first optic neuritis or myelitis). Weinshenker et al. [9] recently demonstrated that NMO-IgG seropositivity at the initial presentation of LETM predicts relapse of myelitis or development of optic neuritis. All six patients in our series with isolated LETM were positive for antibodies to AQP4, a finding that supports the hypothesis that LETM is an inaugural or limited form of NMO [9]. We did not, however, detect the antibody in patients with less extensive lesions, i.e., myelitis involving fewer than three segments.

Finally, our findings suggest that testing for AQP4 antibodies not only enables a reliable distinction to be made between NMO and MS, but also facilitates differential diagnosis concerning other autoimmune diseases affecting the CNS. This ability to distinguish is particularly important when patients presenting with myelitis have concomitant

serological findings suggesting systemic autoimmunity. Positive testing for autoantibodies (ANA, SS-A, SS-B) has been reported in 38%–75% of patients with NMO [12,13], which poses diagnostic challenges to clinicians in many cases. The fact that sera positive for AQP4 antibodies did not show reactivity in testing for the presence of autoantibodies against three unrelated antigens using the same assay system largely rules out nonspecific binding as a cause for anti-AQP4 positivity, and argues for the reliability and specificity of our assay. The negative results in the rheumatological disease group also argue against nonspecific binding of patients' sera to AQP4. Further studies will have to address the question of whether AQP4 is the only target antigen in NMO, and whether antibodies to AQP4 are pathogenic in NMO or a mere epiphenomenon of the disease.

Accession Numbers

The Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/spot>) accession number for aquaporin 4 is P55087.

Acknowledgments

We would like to thank the following colleagues for supporting this work: Norbert Sommer, Department of Neurology, University of Marburg; Tjalf Ziemssen and Hauke Schneider, Department of Neurology, University of Dresden; Benjamin Bausenhardt, Department of Neurology, Katholisches Klinikum Marienhof, Koblenz; Wolfgang Köhler, Department of Neurology, Sächsisches Krankenhaus Hubertusburg; Dieter Pöhlau, Kamillus-Klinik Asbach; Uwe Zettl and Malte Raether, Department of Neurology, University of Rostock; Jürgen Faiss and Peter Kern, Department of Neurology, Landesklinik Teupitz; Alexander Natusch, Rheumaklinik Berlin. We are also indebted to Bibiane Seeger and Helmar Waiczies for expert technical assistance, as well as Andrew Mason and Alistair Noon for their editorial support as native English speakers.

Author contributions. FP, SJ, OA, and FZ designed the study. FP, SJ, OA, MB, and OB analyzed the data. FP, SJ, OA, RB, EL, JP, RH, and FZ enrolled patients. FP, SJ, OA, MB, DF, RH, AV, and FZ contributed to writing the paper. FP, OA, OB, DF, RB, HPS, RH, and FZ collected data or performed experiments for the study. FP, SJ, DF, RB, EL, JP,

RH, and FZ collected and analyzed clinical, CSF, and MRI data, and tested patient sera. HA performed all experiments concerning the molecular cloning of aquaporin cDNA, verifying the DNA sequence, and choosing and providing the expression plasmid for in vitro transcription/translation. AV suggested additional experiments that were done before submission.

References

1. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG (1999) The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53: 1107–1114.
2. Wingerchuk DM, Weinshenker BG (2003) Neuromyelitis optica: Clinical predictors of a relapsing course and survival. *Neurology* 60: 848–853.
3. Cree BA, Goodin DS, Hauser SL (2002) Neuromyelitis optica. *Semin Neurol* 22: 105–122.
4. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, Bruck W, Gleich G, et al. (2002) A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125: 1450–1461.
5. Giovannoni G (2006) Neuromyelitis optica and anti-aquaporin-4 antibodies: Widening the clinical phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 1001–1002.
6. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. (2004) A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364: 2106–2112.
7. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR (2005) IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202: 473–477.
8. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG (2006) Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66: 1485–1489.
9. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, Linbo L, Pittock SJ, et al. (2006) Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol* 59: 566–569.
10. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, et al. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50: 121–127.
11. Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D (1998) A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* 221: 35–41.
12. O'Riordan JI, Gallagher HL, Thompson AJ, Howard RS, Kingsley DP, et al. (1996) Clinical, CSF, and MRI findings in Devic's neuromyelitis optica. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60: 382–387.
13. De Seze J, Stojkovic T, Ferriby D, Gauvrit JY, Montagne C, et al. (2002) Devic's neuromyelitis optica: Clinical, laboratory, MRI and outcome profile. *J Neurol Sci* 197: 57–61.

3. Zusammenfassung

Diagnostik und Differentialdiagnostik autoimmuner ZNS-Erkrankungen stellen trotz Verbesserungen in den bildgebenden Verfahren und der Labordiagnostik nach wie vor eine große Herausforderung für den klinisch tätigen Neurologen dar. Es war das Bestreben der hier skizzierten Arbeiten, einen kleinen Beitrag zu diesem Gebiet zu leisten. Die Fragestellungen, die in den hier referierten Publikationen bearbeitet wurden, ergaben sich meist aus der klinischen Situation. Nachfolgend seien die wichtigsten Ergebnisse noch einmal stichpunktartig zusammengefasst:

1. Die Differentialdiagnostik von WML bleibt nach wie vor eine große Herausforderung. Eine routinemäßige Zöliakie-Diagnostik bei Patienten ohne entsprechende gastrointestinale Beschwerden trägt nicht zur diagnostischen Klärung bei. Es ist zu erwarten, daß die aufkommende Hochfeld- und Ultrahochfeld-Bildgebung des Neurokraniums bei 3 und 7 Tesla zur Verbesserung der Diagnostik von WML beitragen wird.
2. VRS sind auch in der konventionellen MRT-Bildgebung bei 1,5 Tesla Feldstärke gut darstellbar und vor allem in der Regel auch gut von MS-Läsionen unterscheidbar. Gerade diese Erkenntnis wird hoffentlich bald in der klinischen und radiologischen Routine disseminiert werden, da es hier bislang wahrscheinlich häufig zu Fehleinschätzungen kommt und VRS möglicherweise für MS-Läsionen gehalten werden. Allerdings sind VRS bei MS offenbar größer als bei gesunden Probanden, und das Volumen der VRS scheint zuzunehmen, wenn in der MRT intrazerebrale Kontrastmittelaufnahme als Zeichen einer gestörten Blut-Hirn-Schranke detektierbar ist. Insofern könnten VRS ein Kompartiment sein, in dem neuroinflammatorische Prozesse stattfinden. Allerdings eignen sich VRS bislang nicht als diagnostischer

neuroradiologischer Marker der MS, da sie ein auch bei Gesunden nachweisbares physiologisches Phänomen darstellen. Ob sich allerdings Fluktuationen der VRS-Volumina und -Zahlen, welche bei MS-Patienten in Abhängigkeit von Störungen der Blut-Hirn-Schranke aufzutreten scheinen, zur longitudinalen Verlaufsbeurteilung entzündlicher Aktivität eignen können, wird in prospektiven longitudinalen Kohortenstudien an größeren Kollektiven geklärt werden müssen. Auch auf diesem Gebiet könnte die Ultrahochfeld-Bildgebung in Zukunft einen wichtigen Beitrag leisten.

3. Bei der MS wird die frühe Neurodegeneration zunehmend beachtet und wird daher hoffentlich in Zukunft stärker die Entwicklung neuroprotektiver Therapieansätze stimulieren. Wir konnten sowohl im Tiermodell der MS, der EAE, als auch in histopathologischen Untersuchungen an verstorbenen MS-Patienten sowie mit elektrophysiologischen Methoden im Menschen *in vivo* zeigen, daß es in der MS und der EAE zu einem substanzialen Verlust spinaler Motoneurone kommt. Es wird noch zu klären sein, inwieweit sich die von uns in der MS etablierte Methode der Quantifizierung der Zahl motorischer Einheiten (MUNE) *in vivo* zur longitudinalen Verlaufsbeurteilung individueller Patienten bzw. auch größerer Kollektive von MS-Patienten im Rahmen neuroprotektiver Therapiestudien eignet. Hierzu finden bei uns gerade prospektive Untersuchungen an Patienten und gesunden Kontrollen statt.
4. Mit Hilfe des ANT, den erstmals wir bei MS-Patienten einsetzten, konnten wir zeigen, daß es bei MS zu Veränderungen im sog. „alerting“-Netzwerk kommt, was zu den bei der MS sehr häufigen attentionalen Defiziten beitragen könnte. In weiteren Untersuchungen wird sich zeigen, ob der ANT als Ergänzung zu anderen neuropsychologischen Testverfahren zur longitudinalen

Verlaufsbeurteilung geeignet ist. Wichtig ist für die Zukunft, daß kognitive Störungen bei MS mehr Beachtung in der Forschung und der klinischen Beratungssituation finden.

5. Mit Hilfe eines Radioimmunpräzipitationsassays mit rekombinantem AQP4 konnten wir zeigen, daß AQP4 tatsächlich das Zielantigen bei der Mehrzahl von Patienten mit NMO ist. Die Entwicklung dieses Assays, der eine sehr hohe Spezifität, jedoch eine für die klinische Routine eher niedrige Sensitivität aufweist, hat die Entwicklung weiterer Assays mit höherer Sensitivität bei ähnlich guter Spezifität (z.B. sog. Zell-basierte Assays, Fluoreszenzimmunoprecipitationsassay) stimuliert, die teilweise auch für den klinischen Gebrauch verfügbar sind. Diese neuen Forschungsergebnisse haben erheblich zur Verbesserung der klinisch oft schwierigen Differentialdiagnostik zwischen MS und NMO beigetragen. In der Zukunft wird zu klären sein, ob AQP4 das einzige Zielantigen ist, weil auch in den sensitivsten Assays noch bis zu 30% der NMO-Patienten AK-negativ getestet werden, so daß theoretisch weitere Zielantigene denkbar sind. Erste retrospektive Daten deuten darauf hin, daß AQP4-AK möglicherweise intraindividuell mit dem Krankheitsverlauf korrelieren und somit möglicherweise als laborchemischer Marker der Krankheitsaktivität und des Ansprechens auf immunsuppressive Therapien dienen können. Hierzu sind prospektive Untersuchungen unterwegs. Neuere Arbeiten sprechen dafür, daß AQP4-AK nicht nur ein Surrogatmarker der NMO sind, sondern höchstwahrscheinlich auch pathogenetisch bedeutsam sind.

4. Literaturverzeichnis

1. Launer LJ. Epidemiology of white matter lesions. *Top Magn Reson Imaging* 2004;15:365-367.
2. Charil A, Yousry TA, Rovaris M, et al. MRI and the diagnosis of multiple sclerosis: expanding the concept of “no better explanation”. *Lancet Neurol* 2006;5:841-852.
3. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127.
4. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:938-952.
5. Ropper AH, Brown RH. *Adams and Victor's Principles of Neurology*. New York: McGraw-Hill 2005: pp. 771-796.
6. Compston A, Coles A. Multiple Sclerosis. *Lancet* 2008;372:1502-1517.
7. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992;10:153-187.
8. Hohlfeld R, Wekerle H. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101 Suppl 2:14599-14606.
9. Charcot JM. *Lecons sur les maladies du systeme nerveux faites a la Salpetrière*, 4 edn. Paris.
10. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:278-285.

11. Zipp F, Aktas O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2006;29:518-527.
12. Vogt J, Paul F, Aktas O, et al. Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 2009;66:310-322.
13. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 1999;53:1107-1114.
14. Paul F, Jarius S, Glumm R, et al. Neues zu Pathogenese, Diagnostik und Therapie der Neuromyelitis optica. *Dtsch Med Wochenschr* 2008;133:1125-1129.
15. Devic E. Myélite subaiguë compliquée de névrite optique. *Bull Méd* 1894;8:1033-1034.
16. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 2002;125:1450-1461.
17. Bergamaschi R, Tonietti S, Franciotta D, et al. Oligoclonal bands in Devic's neuromyelitis optica and multiple sclerosis: differences in repeated cerebrospinal fluid examinations. *Mult Scler* 2004;10:2-4.
18. Mandler RN, Ahmed W, Dencoff JE. Devic's neuromyelitis optica: a prospective study of seven patients treated with prednisone and azathioprine. *Neurology* 1998;51:1219-1220.
19. Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Lincoff N, et al. Study of mitoxantrone for the treatment of recurrent neuromyelitis optica (Devic disease). *Arch Neurol* 2006;63:957-963.

20. Cree BA, Lamb S, Morgan K, et al. An open label study of the effects of rituximab in neuromyelitis optica. *Neurology* 2005;64:1270-1272.
21. Jacob A, Weinshenker BG, Violich I, et al. Treatment of neuromyelitis optica with rituximab: retrospective analysis of 25 patients. *Arch Neurol* 2008;65:1443-1448.
22. Jacob A, Matiello M, Weinshenker BG, et al. Treatment of neuromyelitis optica with mycophenolate mofetil: retrospective analysis of 24 patients. *Arch Neurol* 2009;66:1128-1133.
23. Schröder A, Ellrichmann G, Chehab G, et al. Rituximab in treatment for neuroimmunological diseases. *Nervenarzt* 2009;80:155-156, 158-160, 162-165.
24. Bergamaschi R, Uggetti C, Tonietti S, et al. A case of relapsing neuromyelitis optica treated with glatiramer acetate. *J Neurol* 2003;250:359-361.
25. Bergamaschi R. Glatiramer acetate treatment in Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 2003;126:1E; author reply 1E-a.
26. Gartzon K, Limmroth V, Putzki N. Relapsing neuromyelitis optica responsive to glatiramer acetate treatment. *Eur J Neurol* 2007;14:e12-e13.
27. Papeix C, Vidal JS, de Seze J, et al. Immunosuppressive therapy is more effective than interferon in neuromyelitis optica. *Mult Scler* 2007;13:256-259.
28. Warabi Y, Matsumoto Y, Hayashi H. Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination. *J Neurol Sci* 2007;252:57-61.
29. Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 2004;364:2106-2112.

30. Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2005;202:473-477.
31. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006;66:1485-1489.
32. Hemmer B, Stüve O. Revised criteria for neuromyelitis optica--a new diagnostic standard? *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3:132-133.
33. Jarius S, Paul F, Franciotta D, et al. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica-incorporation of NMO-IgG status. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3:E1.
34. Jarius S, Paul F, Franciotta D, et al. Mechanisms of disease: aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *Nat Clin Pract Neurol* 2008;4:202-214.
35. Bradl M, Misu T, Takahashi T, et al. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Ann Neurol* 2009;66:630-643.
36. Bennett JL, Lam C, Kalluri SR, et al. Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2009;66:617-629.
37. Kruit MC, van Buchem MA, Hofman PA, et al. Migraine as risk factor for subclinical brain lesions. *JAMA* 2004;291:427-434.
38. Cook HB, Burt MJ, Collett JA, et al. Adult coeliac disease: prevalence and clinical significance. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1032-1036.
39. Holmes GKT. Neurological and psychiatric complications in coeliac disease. In: Gobbi G, Anderman F, Naccarato S et al., eds. *Epilepsy and other neurological disorders in coeliac disease*. London: John Libbey, 1997.
40. Hadjivassiliou M, Grünewald RA, Lawden M, et al. Headache and CNS white matter abnormalities associated with gluten sensitivity. *Neurology* 2001;56:385-388.

41. Lagerqvist C, Ivarsson A, Juto P, et al. Screening for adult coeliac disease- which serological marker(s) to use? *J Intern Med* 2001;250:241-248.
42. Paul F, Pfueller CF, Wuerfel JT, et al. Celiac antibodies in the diagnostic work-up of white matter lesions. *Neurology* 2008;71:223-225.
43. Cross AH, Golumbek PT. Neurologic manifestations of celiac disease: proven, or just a gut feeling? *Neurology* 2003;60:1566-1568.
44. Achiron A, Faibel M. Sandlike appearance of Virchow-Robin spaces in early multiple sclerosis: a novel neuroradiologic marker. *AJNR Am J Neuroradiol* 2002;23:376-380.
45. Wuerfel J, Haertle M, Waiczies H, et al. Perivascular spaces – MRI marker of inflammatory activity in the brain? *Brain* 2008;131:2332-2340.
46. Becher B, Bechmann I, Greter M. Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J Mol Med* 2006;84:532-543.
47. Petajan JH. Quantitative compound muscle action potential: summary. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2002;3S1:S109-S110.
48. De Carvalho M, Chio A, Dengler R, et al. Neurophysiological measures in amyotrophic lateral sclerosis: markers of progression in clinical trials. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2005;6:17-28.
49. Bromberg MB. Electrodiagnostic studies in clinical trials for motor neuron disease. *J Clin Neurophysiol* 1998;15:117-128.
50. Sorenson EJ, Daube JR, Windebank AJ. Electrophysiological findings in a cohort of old polio survivors. *J Peripher Nerv Syst* 2006;11:241-246.
51. Dengler R. Quantitative compound muscle action potential: con. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2002;3S1:S105-S107.

52. Waxman SG. Peripheral nerve abnormalities in multiple sclerosis. *Muscle Nerve* 1993;16:1-5.
53. Daube JR. Estimating the number of motor units in a muscle. *J Clin Neurophysiol* 1995;12:585-594.
54. McComas AJ, Fawcett PR, Campbell MJ, Sica RE. Electrophysiological estimation of the number of motor units within a human muscle. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1971;34:121–131.
55. Galea V, de Bruin H, Cavasin R, McComas AJ. The numbers and relative sizes of motor units estimated by computer. *Muscle Nerve* 1991;14:1123-1130.
56. Hoffmann S, Tittgemeyer M, von Cramon DY. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2007;20:275-280.
57. Amato MP, Ponziani G, Siracusa G, Sorbi S. Cognitive dysfunction in early-onset multiple sclerosis: a reappraisal after 10 years. *Arch Neurol* 2001;58:1602-1606.
58. Rao SM, Leo GJ, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology* 1991;41:685-691.
59. Bobholz JA, Rao SM. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: a review of recent developments. *Curr Opin Neurol* 2003;16:283-288.
60. Posner MI, Petersen SE. The attention system of the human brain. *Annu Rev Neurosci* 1990;13:25-42.
61. Fan J, McCandliss BD, Sommer T, et al. Testing the efficiency and independence of attentional networks. *J Cogn Neurosci* 2002;14:340-347.
62. Fan J, Gu X, Guise KG, et al. Testing the behavioral interaction and integration of attentional networks. *Brain Cogn* 2009;70:209-220.
63. Posner MI. Measuring alertness. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1129:193-199.

64. Urbanek C, Weinges-Evers N, Bellmann-Strobl J, et al. Attention Network Test reveals alerting network dysfunction in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010;16:93-99.
65. Marrocco RT, Witte EA, Davidson MC. Arousal systems. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:166-170.
66. Paul F, Jarius S, Aktas O, et al. Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica. *PLoS Med* 2007;4(4):e133.
67. Weinshenker BG, Wingerchuk DM, Vukusic S, et al. Neuromyelitis optica IgG predicts relapse after longitudinally extensive transverse myelitis. *Ann Neurol* 2006;59:566-569.
68. Jarius S, Aboul-Enein F, Waters P, et al. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 2008;131:3072-3080.

5. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Frauke Zipp bedanken. Ihr verdanke ich die Möglichkeit, in einem stimulierenden wissenschaftlichen Umfeld kreativ an der Schnittstelle zwischen grundlagenorientierten Neurowissenschaften und klinisch angewandter Forschung arbeiten zu können und hier meine langjährige klinisch-neurologische und neurophysiologische Expertise einbringen zu können. Ein förderlicheres Umfeld für meine relativ spät begonnene wissenschaftliche Laufbahn als das, das sie in ihrer Klinik geschaffen hat, hätte es nicht geben können.

Darüber hinaus gilt mein ganz besonders herzlicher Dank Herrn Prof. Dietmar Schmitz vom Exzellenzcluster NeuroCure, der mir vor allem in den letzten Monaten vor der Fertigstellung dieser Arbeit eine unschätzbare wertvolle Hilfe war.

Ich möchte auch meinen Lehrern und Ausbildern in der klinischen Neurologie und Neurophysiologie danken, allen voran Herrn Prof. Roland Schiffter, Herrn Prof. Heinz-Joachim Meencke und Herrn PD Dr. Friedrich Behse.

Weiterer Dank gilt allen Kollegen aus den verschiedenen Berufsgruppen am Institut für Neuroimmunologie, der Cecilie-Vogt-Klinik für Neurologie und dem Exzellenzcluster NeuroCure, ohne deren Unterstützung, Mithilfe und oft auch Geduld mein beruflicher Weg in den letzten Jahren nicht in dieser Form möglich gewesen wäre.

Schließlich danke ich meiner Frau Christine Schennach für ihre Geduld und Unterstützung.

6. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

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

Berlin, den 15. Januar 2010