

# **Detektion und Charakterisierung von Autoantikörpern gegen paranodale Proteine bei Patienten mit inflammatorischer Polyneuropathie**

Detection and characterization of auto-antibodies against paranodal  
proteins in patients with inflammatory polyneuropathy



Dissertation zur Erlangung des medizinischen

Doktorgrades der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Klasse Neurowissenschaften

vorgelegt von

**Luise Theresia Appeltshauser**

aus Coburg

Würzburg, 2018



Eingereicht am: .....

(Bürostempel)

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

Vorsitzende/r .....

1. Betreuer/in: Prof. Dr. Claudia Sommer

2. Betreuer/in: Prof. Dr. Carmen Villmann

3. Betreuer/in: Prof. Dr. Andreas Schlosser

4. Betreuer/in PD Dr. Kathrin Doppler

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunden ausgehändigt am:

.....

Die Promovendin ist Ärztin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
3.1 Inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathien.....	6
3.1.1 Definitionen und Subtypen.....	6
3.1.2 Epidemiologie.....	8
3.1.3 Pathophysiologie.....	9
3.1.4 Klinisches Bild und Unterscheidungsmerkmale.....	10
3.1.5 Diagnostik.....	14
3.1.6 Therapie inflammatorischer Polyneuropathien.....	22
3.2 Nodale Architektur.....	30
3.2.1 Morphologie des peripheren Ranvier'schen Schnürrings.....	30
3.2.2 Pathophysiologie am Ranvier'schen Schnürring bei inflammatorischen Neuropathien.....	32
3.2.3 Der paranodale axogliale Komplex.....	35
3.3 Immunglobulin G (IgG).....	38
3.3.1 Allgemeiner Aufbau von IgG-Antikörpern.....	38
3.3.2 IgG-Subklassen und deren Eigenschaften.....	39
3.4 Das Komplementsystem.....	41
3.4.1 Aufbau und Funktion des Komplementsystems.....	41
3.4.2 Aktivierung und Endstrecke.....	42
3.5 Ziele der Arbeit.....	45
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>46</b>
4.1 Material.....	46
4.2 Patienten und Kontrollen.....	55
4.2.1 Fallzahlberechnung.....	55
4.2.2 Patienten.....	56

4.2.3 Kontrollen .....	57
4.2.4 Probengewinnung.....	57
4.2.5 Erhebung klinischer Daten.....	58
4.2.6 Statistik und Graphiken.....	59
4.3 Bindungsversuche an Zupfnervenpräparaten.....	59
4.3.1 Präparation und Vorbereitung von Zupfnerven .....	59
4.3.2 Immunhistochemische Färbung.....	60
4.3.3 Präabsorptionsversuche mittels transfizierter HEK-293-Zellen .....	62
4.4 ELISA .....	62
4.4.1 Neurofascin-155-ELISA .....	64
4.4.2 Contactin-1-ELISA.....	65
4.4.3 ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgG-Gehalts bei Patienten und Kontrollen .....	70
4.5 ELISA-basierte Komplementbindungsversuche .....	70
4.5.1 Komplementbindungsversuche mit C1q.....	71
4.5.2 Komplementaktivierungsversuche mit C3c .....	72
4.6 Bindungsversuche an transfizierten HEK-293-Zellen .....	73
4.6.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen .....	73
4.6.2 Transfektion von HEK-293-Zellen.....	74
4.6.3 Immunhistochemische Färbung an transfizierten HEK-293-Zellen.....	75
4.7 HEK-293-Zell-basierte Komplementbindungsversuche mit C1q .....	80
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>82</b>
5.1 Detektion von paranodalen Autoantikörpern bei vier Patienten mit CIDP und einem Patienten mit GBS mittels Bindungsversuchen an Zupfnerven .....	82
5.2 Bestimmung des Gesamt-IgG-Gehalts mittels ELISA .....	87
5.3 Keine Detektion von Anti-Neurofascin-155-Autoantikörpern.....	87
5.3.1 Neurofascin-155-IgG-ELISA .....	88
5.3.2 Bindungsversuche an Neurofascin-155-transfizierten HEK-293-Zellen ...	89
5.4 Detektion und Analyse von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern .....	91

5.4.1	<i>Detektion von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern mittels ELISA bei vier Patienten mit CIDP</i> .....	91
5.4.2	<i>Bestätigung der Spezifität über HEK-293-Zell-Präinkubations- und -bindungsversuche</i> .....	92
5.4.3	<i>Titerbestimmung und IgG-Subklassenanalyse Anti-Contactin-1-positiver Proben mittels ELISA</i> .....	97
5.4.4	<i>Reduktion der Anti-Contactin-1-Antikörper bei einer Patientin (Patient 3) im Therapieverlauf</i> .....	100
5.4.5	<i>Komplementbindung und -aktivierung durch Anti-Contactin-1-Autoantikörper</i> .....	101
5.4.6	<i>Effekte von IVIG</i> .....	105
5.5	<i>Detektion und Analyse von Anti-Caspr-Autoantikörpern</i> .....	111
5.5.1	<i>HEK-293-Zell-basierte Detektion von Anti-Caspr-IgG4-Autoantikörpern bei einem Patienten mit CIDP (Patient 5) und Anti-Caspr-IgG3-Autoantikörpern bei einer Patientin mit GBS (Patient 6)</i> .....	111
5.5.2	<i>Subklassenanalyse Anti-Caspr-positiver Proben</i> .....	114
5.5.3	<i>Bestätigung der Spezifität durch Präinkubationsversuche</i> .....	116
5.5.4	<i>Komplementbindung bei IgG3-Antikörpern</i> .....	117
5.6	<i>Klinische Merkmale der Patienten mit Autoantikörpern gegen paranodale Proteine</i> .....	118
5.6.1	<i>Klinische Daten, Verlauf und Therapieansprechen der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4) und Anti-Caspr-positiven Patienten (Patient 5 und 6)</i> .....	118
5.6.2	<i>GBS-artiger Beginn, Ataxie, Tremor sowie histopathologisch vorwiegend chronisch-axonale Schädigung als gemeinsame Merkmale Anti-Contactin-1-positiver Patienten</i> .....	137
5.6.3	<i>Neuropathischer Schmerz als gemeinsames Merkmal Anti-Caspr-positiver Patienten</i> .....	138
5.6.4	<i>Klinische Besserung und Reduktion der paranodalen Antikörperlast unter Rituximab-Therapie bei Patient 3 und 5</i> .....	140
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>146</b>
6.1	<i>Nodo-Paranodopathien als neue Entität autoimmun-vermittelter Neuropathien</i> ..	146
6.1.1	<i>Vorstellung des Begriffes Nodo-Paranodopathie und Zuordnung anhand elektrophysiologischer, histopathologischer und klinischer Kriterien</i> .....	147

6.1.2	<i>Anti-Contactin-1-positive Polyneuropathie mit GBS-artigem Beginn, Tremor und Ataxie</i>	150
6.1.3	<i>Infektttriggerung, fehlende zentrale Beteiligung und neuropathischer Schmerz als Charakteristikum der Anti-Caspr-assoziierten Nodo-Paranodopathie</i>	154
6.1.4	<i>Neurofascin-155 als weiteres Zielantigen bei Nodo-Paranodopathien mit axoglialen Autoantikörpern</i>	156
6.1.5	<i>Kein Nachweis von Autoantikörpern gegen axogliale (para)nodale Proteine bei Patienten mit MMN</i>	158
6.2	Die Rolle der IgG-Subklasse	159
6.2.1	<i>In Bezug auf die Chronifizierung der Erkrankung</i>	159
6.2.2	<i>In Bezug auf die Pathophysiologie: erhöhte Komplementbindung bei Prädominanz der IgG-Subklassen 1-3</i>	162
6.2.3	<i>In Bezug auf das Therapieansprechen auf IVIG</i>	164
6.3	Nierenbeteiligung bei Nodo-Paranodopathien mit Antikörpern gegen Contactin-1 und Neurofascin-155	166
6.4	Klinische Bedeutung der Ergebnisse	168
6.4.1	<i>Evaluation der Screeningmethoden zur Detektion paranodaler axogliale Autoantikörper bei inflammatorischen Polyneuropathien</i>	168
6.4.2	<i>Etablierung neuer diagnostischer Kriterien für Nodo-Paranodopathien</i>	170
6.4.3	<i>Implikationen eines Autoantikörperscreenings auf eine Off-Label-Therapie mit Rituximab und einen Therapieversuch mit IVIG</i>	170
6.5	Ausblick	173
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>175</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>200</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>203</b>
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>205</b>
<b>11.</b>	<b>Anhang</b>	<b>208</b>
	Danksagung	208
	Affidavit / Eidesstattliche Erklärung	209
	Curriculum Vitae	210
	Publikationsverzeichnis	211

# 1. Abstract

Autoantibodies against proteins of the paranodal axoglial complex have been described in recent studies on immune-mediated neuropathies. Nevertheless, their characteristics, prevalences, pathophysiological relevance and impact on diagnostics and therapy have not been fully investigated.

Therefore, sera and plasmapheresis material (PE-material) of 150 patients with inflammatory neuropathy, including 105 patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP), 21 patients with Guillain-Barré-Syndrome (GBS) and 24 patients with multifocal motor neuropathy (MMN), fulfilling established diagnostic criteria for the respective disease, as well as 74 controls were screened for autoantibodies against the paranodal proteins caspr, contactin-1 and neurofascin-155 via immunohistochemic staining of murine teased fiber preparations and/or ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). In the event of a positive result, their specificity was confirmed via immunohistochemic staining on transfected HEK (human embryonic kidney)-293-cells and preincubation experiments. IgG subclasses and antibody titers in human material were analysed and complement binding to the autoantibodies, also under the influence of therapeutic immunoglobulins (IVIg), was investigated in cell based assays and ELISA based assays. Clinical features and therapy response in antibody-positive patients were evaluated and compared to the experimental results.

IgG-autoantibodies against contactin-1 were found in four patients with CIDP, IgG-autoantibodies against caspr were found in one patient with CIDP and one with GBS. No further autoantibodies were detected neither in patients with CIDP, GBS and MMN nor in the controls. The prevalences of autoantibodies against axoglial paranodal proteins in this study therefore are at 4,76% in CIDP and GBS and 0% in MMN. In the acute phase of the disease, autoantibodies of the IgG1 and IgG3 subclass could be detected (in two CIDP patients with anti-contactin-1 antibodies and one GBS patient with anti-caspr antibodies), whereas patients in the chronic phase of the disease showed IgG4-autoantibodies (two CIDP patients

with anti-contactin-1 antibodies and one CIDP patient with anti-caspr antibodies). Complement binding and activation *in vitro* depended on the amount of the IgG subclasses IgG1-IgG3, but not IgG4. Complement binding could be reduced by IVIG dose-dependently. All CIDP-patients with autoantibodies showed a GBS-like onset with severe motor involvement. Additional features of anti-contactin-1 positive neuropathy were ataxia and tremor, of anti-caspr positive disease neuropathic pain. Electrophysiological studies revealed signs of conduction failure accompanied by striking signs of axonal damage. As a histopathologic correlate, a disruption of the nodal architecture and axonal loss were found. Patients only responded well to IVIG in the beginning of the disease. Three patients with autoantibodies of the IgG4 subclass (two patients with anti-contactin-1 and one patient with anti-caspr) were treated with rituximab, leading to a titer reduction accompanied by clinical and electrophysiological improvement in two patients.

The screening methods used in this study are suitable for the detection of autoantibodies against paranodal proteins. Antibody-positive patients define a small subgroup of patients with inflammatory polyneuropathy that is characterized by distinct clinical features. Histopathological findings and therapy response to antibody-depleting treatment in this study as well as findings of further studies argue in favour of a pathogenetic relevance of the autoantibodies. Neuropathies associated with paranodal autoantibodies could belong to the new entity of nodo-paranodopathies, sharing a characteristic pathomechanism with the node of Ranvier being the site of attack. Complement binding and activation as well as response to IVIG could be related to the predominant IgG subclass of the autoantibodies. It could also influence the course and chronification of the disease. Therefore, detection of autoantibodies against paranodal proteins might have a direct impact on diagnostic and therapeutic strategies in patients with CIDP and GBS in the future. Nevertheless, further clinical and experimental data, including data from bigger and prospective studies are needed to understand and fully characterize this novel entity.

## 2. Zusammenfassung

Kürzlich wurden bei immunvermittelten Neuropathien Autoantikörper gegen Proteine des paranodalen axoglialen Komplexes beschrieben. Deren Charakteristika, Prävalenzen, pathophysiologische Relevanz sowie Bedeutung für Diagnostik und Therapie sind jedoch noch nicht abschließend erforscht.

In dieser Studie wurden daher Seren und Plasmapheresematerial (PE-Material) von 150 Patienten mit inflammatorischen Neuropathien, nämlich 105 mit chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie (CIDP), 21 mit Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und 24 mit multifokaler motorischer Neuropathie (MMN), welche etablierte diagnostische Kriterien der jeweiligen Krankheit erfüllen, sowie 74 Kontrollen mittels immunhistochemischen Färbungen an murinen Zupfnervenpräparaten und/oder ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) auf Autoantikörper gegen die paranodalen Proteine Caspr, Contactin-1 und Neurofascin-155 untersucht. Bei positivem Ergebnis wurde deren Spezifität mittels immunhistochemischen Färbungen an transfizierten HEK (Human embryonic kidney)-293-Zellen und Präinkubationsversuchen bestätigt. Es wurden die IgG-Subklassen und die Antikörpertiter bestimmt und das Komplementbindungsverhalten unter Zugabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIg) mit zellbasierten und ELISA-basierten Methoden analysiert. Klinische Merkmale und das Therapieansprechen Antikörper-positiver Patienten wurden ermittelt und mit den experimentellen Ergebnissen in Zusammenhang gesetzt.

IgG-Autoantikörper gegen Contactin-1 konnten bei vier Patienten mit CIDP nachgewiesen werden, IgG-Autoantikörper gegen Caspr bei einem Patienten mit CIDP und einer Patientin mit GBS. Es konnten keine weiteren Autoantikörper bei CIDP-Patienten, GBS-Patienten, MMN-Patienten oder bei den Kontrollen detektiert werden. Die Prävalenz von Autoantikörpern gegen axogliale paranodale Proteine liegt somit in dieser Studie bei jeweils 4,76% bei CIDP und GBS und 0% bei MMN. Die Antikörper gehörten bei Patienten in der akuten Erkrankungsphase (zwei der CIDP-Patienten mit Anti-Contactin-1-Autoantikörpern und eine GBS-

Patientin mit Anti-Caspr-Autoantikörpern) hauptsächlich den Subklassen IgG1 und IgG3 an, bei Patienten in der chronischen Phase (zwei der CIDP-Patienten mit Anti-Contactin-1-Autoantikörpern, ein CIDP-Patient mit Anti-Caspr-Autoantikörpern) überwog die Subklasse IgG4. Experimentell kam es zur Komplexbildung und -aktivierung abhängig vom Gehalt der Subklassen IgG1-3, nicht aber IgG4; diese konnte durch die Zugabe von IVIG dosisabhängig gemindert werden. Alle Autoantikörper-positiven CIDP-Patienten zeigten einen GBS-artigen Beginn mit einer schweren motorischen Beteiligung. Anti-Contactin-1-positive Patienten kennzeichnete klinisch zusätzlich das Vorkommen einer Ataxie und eines Tremors, Anti-Caspr-positive Patienten das Vorkommen starker neuropathischer Schmerzen. Elektrophysiologisch standen neben Hinweisen auf eine Leitungsstörung Zeichen einer axonalen Schädigung im Vordergrund. Als histopathologisches Korrelat lagen eine nodale Architekturstörung und ein Axonverlust vor. Die Patienten zeigten nur in der Anfangsphase der Erkrankung ein Ansprechen auf IVIG. Bei drei CIDP-Patienten mit IgG4-Autoantikörpern (zwei Patienten mit Anti-Contactin-1-Antikörpern und ein Patient mit Anti-Caspr-Antikörpern) wurde eine Therapie mit Rituximab durchgeführt. Diese führte zu einer Titerreduktion und zur zeitgleichen klinischen und elektrophysiologischen Befundbesserung bei zwei Patienten.

Die in dieser Arbeit angewandten Screeningmethoden führten zum erfolgreichen Nachweis von Autoantikörpern gegen paranodale axogliale Proteine. Die Patienten mit positivem Autoantikörpernachweis definieren eine kleine Untergruppe mit ähnlichen klinischen Merkmalen im Kollektiv der Patienten mit inflammatorischen Polyneuropathien. Histopathologische Merkmale sowie das Therapieansprechen auf antikörperdepletierende Therapie sprechen in Kombination mit den Ergebnissen weiterer Studien zu paranodalen Autoantikörpern für eine pathogenetische Relevanz der Autoantikörper. Mit einem charakteristischen, am Schnürring ansetzenden Pathomechanismus könnten Neuropathien mit Nachweis von paranodalen Autoantikörpern der kürzlich eingeführten Entität der Nodo-Paranodopathien angehören. Die Komplektaktivierung und das Therapieansprechen der

Patienten auf IVIG stehen möglicherweise in Zusammenhang mit der prädominanten IgG-Subklasse. Diese könnte auch in Bezug auf die Chronifizierung eine Rolle spielen. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen paranodale Proteine hat wohlmöglich in Zukunft direkte Konsequenzen auf das diagnostische und therapeutische Prozedere bei Patienten mit CIDP und GBS; weitere klinische und experimentelle Daten aus größeren, prospektiven Studien sind jedoch zum weiteren Verständnis und zur Charakterisierung dieser Entität notwendig.

## 3. Einleitung

### 3.1 Inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathien

#### 3.1.1 Definitionen und Subtypen

Inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathien sind seltene Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervensystems (PNS). Diese heterogene Gruppe von Erkrankungen kann je nach zeitlichem Verlauf in chronische und akute Formen unterteilt werden.

##### 3.1.1.1 Chronische inflammatorische Polyneuropathien

Bei der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) handelt es sich um eine erworbene, immunvermittelte, inflammatorische Erkrankung der peripheren Nerven und Nervenwurzeln mit motorischen und/oder sensiblen Dysfunktionen an mehr als einer Extremität mit Persistenz oder Progredienz über einen Zeitraum von mindestens zwei Monaten und elektrophysiologischen oder histopathologischen Zeichen von Demyelinisierung. Neben der klassischen Form der CIDP gibt es weitere Unterformen mit charakteristischen klinischen und elektrophysiologischen Merkmalen sowie unterschiedlichem Therapieansprechen, die je nach Verteilungsmuster, zeitlichem Verlauf, befallener Faserqualität oder Komorbiditäten wie Paraproteinämien, Systemerkrankungen oder spezifischen Symptomkomplexen weiter differenziert werden können. Zu den Unterformen mit typischem Verteilungsmuster zählen beispielsweise die multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie (MADSAM), auch als Lewis-Summer-Syndrom bekannt, und die distal erworbene demyelinisierende sensible Neuropathie (DADS), beim Nachweis von Anti-MAG-Autoantikörpern auch als Anti-MAG-Neuropathie bezeichnet (Saperstein et al, 2001).

### 3.1.1.2 Akute inflammatorische Polyneuropathien

Die häufigste Form akuter inflammatorischer Polyneuropathien ist das Guillain-Barré-Syndrom, eine immunvermittelte Polyradikuloneuropathie, die durch symmetrisch aufsteigende, innerhalb von vier Wochen progrediente Paresen der Extremitäten einhergehend mit Hypo- und/oder Areflexie sowie einem monophasischen Verlauf charakterisiert wird (Asbury & Cornblath, 1990; Hughes & Cornblath, 2005). Auch hier liegen Unterformen vor, deren Pathophysiologie, klinisches Bild, Schweregrad, Verlauf und Prognose sich teilweise stark unterscheiden (van den Berg et al, 2014). Die klassische Form des GBS wird auch als akut inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (AIDP) bezeichnet und zeigt elektrophysiologisch Zeichen von Demyelinisierung, wohingegen bei der akut motorischen axonalen Neuropathie (AMAN) und der akut motorischen und sensiblen axonalen Neuropathie (AMSAN) Zeichen axonaler Schädigung prominent sind (Griffin et al, 1995; Hadden et al, 1998; Kuwabara & Yuki, 2013; Winer, 2014). Weitere akute inflammatorische Polyneuropathien sind die akute panautonome Neuropathie und das Miller-Fisher-Syndrom (MFS), welches mit GQ1b-Antikörpern assoziiert ist und sich klinisch mit der Trias aus Ophthalmoplegie, Ataxie und Areflexie präsentiert (Chiba et al, 1992; Low et al, 1983).

### 3.1.2 Epidemiologie

Chronische inflammatorische Polyneuropathien sind seltene Erkrankungen mit einer Prävalenz von 2-9 auf 100.000 bei CIDP und einem Erkrankungsgipfel jenseits des fünften Lebensjahrzehnts (American Academy of Neurology AIDS Task Force, 1991; Sander & Latov, 2003; Vedeler et al, 2013). Bei der MMN liegt die Prävalenz bei 1-3 auf 100.000 (Muley & Parry, 2012). Das GBS hat in der kaukasischen Bevölkerung eine mit dem Alter steigende jährliche Inzidenz von 0,84-1,91 auf 100.000; bei etwa 70% der Betroffenen wird ein vorangehender Infekt berichtet (McGrogan et al, 2009). Nur 3-5% aller akuten inflammatorischen Polyneuropathien äußern sich in Form eines MFS (Govoni & Granieri, 2001). Die axonalen Varianten des GBS kommen in der japanischen und chinesischen Bevölkerung mit Prävalenzen von 30-47% wesentlich häufiger vor als in der kaukasischen Bevölkerung mit Prävalenzen von 5%; vorangehende Infekte werden hier zudem häufiger beschrieben als bei der klassischen AIDP (Govoni & Granieri, 2001; Hughes & Cornblath, 2005). Diese sind bei der CIDP insgesamt noch seltener (Dimachkie & Barohn, 2013). Männer sind von inflammatorischen Neuropathien im Allgemeinen häufiger betroffen, beim GBS beispielsweise 1,5-mal häufiger als Frauen (Maisonobe et al, 1996; van Doorn et al, 2008).

### 3.1.3 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie inflammatorischer Neuropathien ist angesichts der großen Heterogenität komplex und noch nicht vollständig erforscht. Generell entstehen die Erkrankungen durch Autoimmunität gegen Antigene des peripheren Myelins oder Axons. Dabei sind sowohl humorale Mechanismen, beispielsweise in Form von Autoantikörpern und Komplement, als auch zelluläre Mechanismen, beispielsweise in Form von autoreaktiven T-Zellen oder Makrophagen, beteiligt. Folglich entsteht eine funktionelle und/oder strukturelle Schädigung an Elementen des PNS mit gestörter Erregungsweiterleitung durch Demyelinisierung, direkte Interaktion des schädigenden Agens mit den an der Erregungsweiterleitung beteiligten Strukturen und/oder axonale Schädigung. Diese Erkenntnisse wurden *in vivo* und *in vitro* unter anderem durch histopathologische Studien, Passiv-Transfer-Experimente und Untersuchungen von T-Zell-Populationen im peripheren Blut gewonnen (Dalakas, 2015).

Bei der CIDP wird angenommen, dass komplementvermittelte und zelluläre Mechanismen im Vordergrund stehen, histopathologisch nachweisbar durch perivaskuläre Makrophagen- und T-Zell-Infiltrationen; die humoralen Zielantigene der Immunantwort sind jedoch größtenteils unbekannt (Hughes et al, 2006; Sommer et al, 2005a). Bei akuten demyelinisierenden Erkrankungen wie beim GBS kann ebenfalls eine T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden; es werden aber vor allem humorale Mechanismen im Rahmen einer molekularen Mimikry nach Fremdantigenkontakt angenommen, wenn diese Antigene Glykokonjugat-Epitope mit den Myelinglykoproteinen teilen (Dalakas, 2015; Yuki & Hartung, 2012). So ist beispielsweise das Vorkommen von Anti-Gangliosid-Autoantikörpern wie Anti-GM1-Antikörper, welche strukturelle Ähnlichkeit mit Lipopolysacchariden des Organismus *Campylobacter jejuni* aufweisen, assoziiert mit einer vorangegangenen Infektion mit diesem Erreger; klinisch und experimentell lässt sich unter Einfluss von Anti-GM1-IgG eine axonale Neuropathie nachweisen (Kusunoki & Kaida, 2011; Yuki et al, 2004). Bei weiteren Unterformen der akuten Neuropathie wie dem MFS konnten die Zielantigene bereits charakterisiert werden; hier liegen bei

über 90% der Patienten Anti-GQ1b-IgG vor (Chiba et al, 1992; Dalakas, 2015). Diese Anti-Gangliosid-Antikörper können eine hauptsächlich komplementvermittelte Schädigung induzieren (Berger et al, 2013; Hafer-Macko et al, 1996; McGonigal et al, 2010; Zhang et al, 2004). Bei den chronischen Neuropathien gelang ein Antikörpernachweis vor allem bei der Anti-MAG-Neuropathie und der MMN. Bei letzterer sind bei über 50% aller Patienten Anti-GM1-IgM-Antikörper nachweisbar (Van Asseldonk et al, 2005). Deren Pathogenität wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert, auch wenn aktuellere Studien eher dafür sprechen und auch hier auf einen komplementvermittelten Mechanismus hinweisen (Harschnitz et al, 2016; Harvey et al, 1995; Muley & Parry, 2012; Yuki et al, 2011). Passiv-Transfer-Experimente mit Anti-GM1-Antikörpern an Nagern zeigten widersprüchliche Ergebnisse, beispielsweise konnten die Antikörper zum Teil keine elektrophysiologisch nachweisbaren Leitungsblöcke induzieren (Harvey et al, 1995). Antikörperunabhängig zeigen CIDP-Patienten ebenfalls eine terminale Komplementaktivierung. So sind in deren Serum die Spiegel löslicher, aktivierter Komplementfaktoren erhöht (Quast et al, 2016). Die Ursache unterschiedlicher Befallsmuster von motorischen oder sensiblen Nerven liegt vermutlich in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Myelinglykoproteine bei spezifischen pathogenen Antikörpern (Dalakas, 2015). Insgesamt handelt es sich also um komplexe und vor allem unterschiedliche Pathomechanismen nicht nur in den Hauptgruppen inflammatorischer Neuropathien, sondern auch innerhalb der Untergruppen, was mit direkten Auswirkungen auf Diagnostik und Therapie behaftet ist. Die Rolle des Ranvier'schen Schnürrings in der Pathophysiologie der CIDP wird in Kapitel 3.2.2 und 6.1 thematisiert.

### 3.1.4 Klinisches Bild und Unterscheidungsmerkmale

Im Folgenden werden die klinischen Manifestationen und die Unterscheidungsmerkmale insbesondere für die drei häufigsten inflammatorischen Neuropathien, nämlich für die CIDP, die MMN und das GBS, erläutert und in Tabelle 1 zusammengefasst.

	<b>CIDP</b>	<b>MMN</b>	<b>GBS</b>
vorangehender Infekt	selten	selten	70%
Erkrankungsdauer bis zum Symptumnadir	> 8 Wochen	> 8 Wochen	< 4 Wochen
Verteilung	meist symmetrisch motorisch > sensibel	asymmetrisch multifokal rein motorisch	meist symmetrisch motorisch > sensibel
motorische Symptome	proximal = distal, OE = UE	distal > proximal, OE > UE	proximal = distal, OE = UE
sensible Beteiligung	mild- schwer distal	nicht vorhanden	meist mild distal
motorische Beteiligung	mild-schwer, im Verlauf ggf. Muskelatrophie	mild-schwer, meist erst spät Muskelatrophie	mild-schwer, 25-38% beatmungspflichtig
Muskeleigenreflexe	globale Areflexie	Hyporeflexie in betroffenen Regionen	globale Areflexie
Hirnnervenbeteiligung	selten	sehr selten	häufig
vegetative Beteiligung	selten, meist mild	nicht vorhanden	häufig (70%), meist schwer
weitere neurologische Symptome	ggf. Haltetremor, ggf. Ataxie ggf. Schmerzen	ggf. Haltetremor, Faszikulationen, Krämpfe	ggf. Schmerzen
Verlauf	selten monophasisch, meist schubförmig oder schleichend progredient	schleichend progredient	monophasisch

**Tabelle 1: klinisches Bild und Unterscheidungsmerkmale der inflammatorischen Polyneuropathien CIDP, MMN und GBS**

Abkürzungen: CIDP = chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, ggf. = gegebenenfalls, GBS = Guillain-Barré-Syndrom, MMN = multifokale motorische Neuropathie, OE = obere Extremität, UE = untere Extremität. Zur Quellenangabe siehe Fließtext in Kapitel 3.1.4.1 und 3.1.4.2.

### 3.1.4.1 Symptome und Verteilungsmuster

Die motorischen Defizite bei inflammatorischen Neuropathien äußern sich in Form von schlaffen Paresen. Während diese bei der klassischen CIDP symmetrisch proximal und distal verteilt sind und teilweise mit Atrophien einhergehen, liegen bei der MMN asymmetrisch, multifokal und distal verteilte Paresen mit Betonung der oberen Extremität vor, erst spät im Krankheitsverlauf auch Atrophien; zusätzlich imponieren hier Faszikulationen und Krämpfe wesentlich häufiger (Auer et al, 1989; Bouche et al, 1995; Muley & Parry, 2012; Parry & Clarke, 1988; Saperstein et al, 2001). In der klinisch neurologischen Untersuchung zeigt sich bei der CIDP und dem GBS meist eine generelle Areflexie, bei der MMN eine Hyporeflexie in betroffenen Regionen (Van Asseldonk et al, 2005). GBS-Patienten präsentieren sich mit schnell progredienten, symmetrisch distalen und proximalen Paresen; 25-38% entwickeln eine Ateminsuffizienz mit Beatmungspflichtigkeit (Sudulagunta et al, 2015; van den Berg et al, 2014). Zur Hirnnervenbeteiligung kommt es bei der CIDP bei 10-24%, beim GBS bei 50%, am häufigsten in Form von einer bilateralen fazialen Schwäche und Schluckstörungen, bei der MMN hingegen nur in sehr seltenen Fällen (Asbury & Cornblath, 1990; Axelsson & Liedholm, 2002; Gorson et al, 1997; Maisonobe et al, 1996).

Sensible Symptome sind bei CIDP-Patienten bei über 70% klinisch objektivierbar; diese äußern sich in Form von akralen Hypästhesien, Parästhesien, Pallhypästhesien und Defiziten in der Propriozeption, sind meist aber weniger stark ausgeprägt als die motorischen Symptome (Dyck et al, 1975; McCombe et al, 1987). Sensible Defizite in Form von Hypästhesien und nur milden Parästhesien kommen auch beim GBS häufig vor. Eine sensible Ataxie ist selten und kommt bei 8% aller GBS-Patienten vor, bei den CIDP-Patienten meist bei den rein sensiblen Varianten (Sudulagunta et al, 2015; Vallat et al, 2010). Die MMN ist durch klinisch ausschließlich motorische Beteiligung gekennzeichnet, subklinisch können aber auch sensible Fasern leichte pathologische Veränderungen aufweisen (Corse et al, 1996). Ein hoher Anteil der GBS-Patienten von bis zu 89% entwickelt

neuropathische Schmerzen; sie manifestieren sich in schmerzhaften Dysästhesien, Rückenschmerzen, Muskelschmerzen oder Meningismus und sind bei etwa 33% das Initialsymptom (Moulin et al, 1997; van Doorn et al, 2008). Bei CIDP-Patienten tritt neuropathischer Schmerz bei 20% der Patienten auf, bei der MMN in der Regel nicht (McCombe et al, 1987; Muley & Parry, 2012).

70% aller GBS-Patienten zeigen eine autonome Beteiligung, häufig in Form von einer kardiovaskulären Dysregulation (Arrhythmien oder Blutdruckschwankungen) sowie Blasenfunktionsstörungen. Bei der CIDP ist eine autonome Beteiligung seltener und die Patienten sind meist nur mild beeinträchtigt (Figueroa et al, 2012). Zusätzliche Symptome wie Tremor werden mit unterschiedlicher Häufigkeit beschrieben: Ruhetremor ist nicht typisch, Halte- und Aktionstremor gelten als selten, in zwei Studien aber auch als Charakteristikum bei 50-80% aller CIDP- und MMN-Patienten (Busby & Donaghy, 2003; Cao et al, 2017; Saifee et al, 2013).

#### 3.1.4.2 Krankheitsverlauf und Prognose

Bei der CIDP entwickelt sich der Nadir der Symptome meist langsam über einen Zeitraum von über acht Wochen (American Academy of Neurology AIDS Task Force, 1991). In 2-16% der Fälle kommt es zu einem akuten, GBS-artigen Beginn mit anschließender Progression (Odaka et al, 2003; Ruts et al, 2010; Vallat et al, 2010). MMN-Patienten zeigen einen schleichenden Symptombeginn; in seltenen Fällen wird jedoch auch von einem raschen Fortschreiten berichtet (Jaspert et al, 1996; Muley & Parry, 2012; Parry & Clarke, 1988). Der Nadir der motorischen Symptome wird beim GBS hingegen definitionsgemäß innerhalb von vier Wochen erreicht, bei 50% der Patienten sogar innerhalb von zwei Wochen; nach einem Plateau von 2-4 Wochen bessern sich die Symptome wieder und es bleibt meist bei einem monophasischen Verlauf (American Academy of Neurology AIDS Task Force, 1991; Asbury & Cornblath, 1990). Je nach Alter, Progress, Symptomschwere, Beatmungspflichtigkeit, autonomer Dysfunktion

und elektrophysiologischem Befund ist die Prognose variabel, von einer vollständigen Rekonvaleszenz (60% nach 12 Monaten) über behandlungsbedürftige residuelle Defizite (40% nach 12 Monaten, davon schwere Residuen bei 14%) bis hin zum Tod an der Erkrankung bei 3-7%, meist durch eine autonome Dysfunktion oder Komplikationen der maschinellen Beatmung (Rajabally & Uncini, 2012; van den Berg et al, 2014). Bei 2-5% treten Rückfälle auf (Kuitwaard et al, 2009b). Die CIDP kann monophasisch, schubförmig rekurrent, schleichend progredient oder schubförmig progredient verlaufen. Abhängig vom Erkrankungsalter, der Verlaufsform und dem Therapieansprechen variiert die Prognose stark, ist insgesamt jedoch gut (Vallat et al, 2010). Die MMN verläuft meist schleichend progredient, die Funktionalität eines Großteils der Patienten im Alltag ist jedoch meistens aufgrund des guten Therapieansprechens auf intravenöse Immunglobuline (IVIG) wenig eingeschränkt und die Mortalität extrem gering (Muley & Parry, 2012).

### 3.1.5 Diagnostik

Die Diagnose demyelinisierender inflammatorischer Polyneuropathien erfolgt anhand der Anamnese, des klinischen Bildes und des Verlaufes in Kombination mit Elektrophysiologie und Liquordiagnostik. Anhand spezieller serologischer, humangenetischer oder Liquor-Untersuchungen können Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden. Ergänzend können bildgebende Verfahren oder weitere elektrophysiologische Zusatzuntersuchungen angewandt werden. In unklaren Fällen steht die histopathologische Diagnostik mittels Hautbiopsien oder Nervenbiopsien zur Verfügung (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2012). Die klinischen Merkmale wurden bereits in Kapitel 3.1.4 erläutert; die Charakteristika in der Liquordiagnostik, apparativen Diagnostik und Histopathologie sowie etablierte Diagnosekriterien, welche zur Selektion der Patienten dieser Studie verwendet wurden, werden im Folgenden vorgestellt.

### 3.1.5.1 Liquoranalyse, apparative elektrophysiologische und bildgebende Diagnostik, Histopathologie

In der Liquordiagnostik zeigt sich bei demyelinisierenden entzündlichen Polyneuropathien ein charakteristischer Befund, die zytoalbuminäre Dissoziation als Zeichen einer Radikulitis. Man versteht darunter eine Erhöhung des Gesamtliquoreiweißes, bei 90% aller CIDP-Patienten auf Werte  $>1$  g/l, bei normwertiger Leukozytenzahl von  $<10$  Zellen/ $\mu$ l (Brettschneider et al, 2005; Vedeler et al, 2013). Bei ebenfalls erhöhter Zellzahl im Rahmen einer Schrankenstörung sind differentialdiagnostisch systemische Erkrankungen auszuschließen (Vallat et al, 2010). Bei der MMN ist normalerweise keine zytoalbuminäre Dissoziation nachweisbar, bei GBS-Patienten bei 80% aller Patienten, in den ersten Erkrankungswochen allerdings seltener (Bouche et al, 1995; Hughes & Cornblath, 2005; Vucic et al, 2009).

Elektrophysiologisch stehen bei der akuten und chronischen demyelinisierenden Polyneuropathie Zeichen der segmentalen oder globalen De- und Remyelinisierung wie reduzierte motorische und sensible Nervenleitungsgeschwindigkeiten, verlängerte distal motorische Latenzen und F-Wellen-Latenzen gegebenenfalls mit F-Wellen-Verlust und zeitliche Dispersion im Vordergrund; typisch sind zudem partielle Leitungsblöcke (American Academy of Neurology AIDS Task Force, 1991; Dyck et al, 1975). Axonale Varianten inflammatorischer Neuropathien, beispielsweise die AMAN, sind durch eine distale Amplitudenreduktion bei normwertiger Nervenleitungsgeschwindigkeit gekennzeichnet (Sudulagunta et al, 2015). Bei der CIDP ist ein frühes „axonales“ Muster selten (Uncini et al, 1996; Vallat et al, 2010). Charakteristisch für die MMN sind mehrere komplette Leitungsblöcke an für Engpasssyndrome untypischen Stellen mit Betonung der Armnerven; die oben genannten Zeichen von Demyelinisierung können, müssen aber nicht vorliegen und sensible Nervenleitungsgeschwindigkeiten sind normwertig, auch an Ableitungspunkten motorischer Leitungsblöcke (Chaudhry et al, 1994; Muley & Parry, 2012; Parry & Clarke, 1988). In der sensiblen Elektroneurographie zeigen sich bei der CIDP und beim GBS hingegen pathologische Werte. Spezifisch, jedoch nicht sensitiv für die demyelinisierenden Neuropathien CIDP und

AIDP gegenüber axonalen Varianten oder anderen Erkrankungen ist das sogenannte „sural sparing“, bei dem das Potential am Nervus suralis noch ableitbar, am Nervus medianus oder anderen Armnerven jedoch bereits nicht mehr ableitbar ist (Hiew & Rajabally, 2016). Elektromyographisch zeigen sich bei (sekundärer) axonaler Degeneration sowohl bei der CIDP als auch bei der MMN Zeichen von Spontanaktivität in Form von positiven scharfen Wellen und Fibrillationspotentialen sowie ein chronisch neurogenes Schädigungsmuster mit hohen, polyphasischen und verlängerten Potentialen motorischer Einheiten und einem gleichzeitigen Interferenzmuster (Van Asseldonk et al, 2005). Beim GBS sind elektromyographische Zeichen einer axonalen Degeneration mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Hughes & Cornblath, 2005).

Histopathologisch ist bei der CIDP in der Suralisbiopsie vor allem an den dicken Nervenfasern eine segmentale Demyelinisierung typisch, teilweise einhergehend mit einem Axonverlust. Dieser ist lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch unter Verwendung von Paraffinschnitten und Semidünnschnitten, die segmentale Demyelinisierung immunhistochemisch an Zupfnervenpräparaten nachweisbar (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2012). Sichtbar sind Zwiebelschalenformationen als Zeichen chronischer De- und Remyelinisierung und subperineurale oder endoneurale Ödeme. Inflammation zeigt sich typischerweise durch perivaskuläre Makrophagenansammlungen im Endoneurium; auch T-Zell-Infiltrate können nachgewiesen werden (Sommer et al, 2005a; Vallat et al, 2010). Zwar ist die Biopsie bei den folgenden Erkrankungen kein Teil der Routinediagnostik, ähnliche Befunde liegen allerdings auch bei der AIDP und vereinzelt in milder Form bei der MMN vor, bei der AMAN hingegen wurden normale Biopsiefunde berichtet (Corse et al, 1996; Ho et al, 1997; Hughes et al, 1992).

Obig beschriebene, typische laborchemische, elektrophysiologische und histopathologische Befunde sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

	<b>CIDP</b>	<b>MMN</b>	<b>AIDP</b>	<b>AMAN</b>
Liquorbefund	zytoalbuminäre Dissoziation	normal	z.T. zytoalbuminäre Dissoziation	z.T. zytoalbuminäre Dissoziation
<i>motorische NG</i>				
Amplitude	↔ / ↓	↓ / ↔	↔ / ↓	↓
NLG	↓	↔ / ↓	↓	↔
dmL	↑	↔ / ↑	↑	↔
Dispersion	ja	nein	ja	nein
Leitungsblöcke	partiell/ komplett/ Ø	komplett/ partiell	komplett/ partiell/ Ø	komplett/ partiell/ Ø
F-Wellen-Latenz	↑ / Verlust	↔ / ↑ / Verlust	↑ / Verlust	↔ / ↑ / Verlust
<i>sensible NG</i>				
<b>N. medianus</b>				
Amplitude	↓ / ↔	↔	↓ / ↔	↔
NLG	↓ / ↔	↔	↓ / ↔	↔
<b>N. suralis</b>				
Amplitude	↔ / ↓	↔	↔ / ↓	↔
NLG	↔ / ↓	↔	↔ / ↓	↔
<i>EMG</i>				
Willküraktivität	neurogenes Schädigungsmuster	neurogenes Schädigungsmuster	z.T. neurogenes Schädigungsmuster	z.T. neurogenes Schädigungsmuster
Spontanaktivität	ja	ja	z.T. ja	z.T. ja
Suralisbiopsie	Demyelinisierung, z.T. axonaler Verlust Entzündung	z.T. milde Demyelinisierung	Demyelinisierung, z.T. axonaler Verlust Entzündung	normal

**Tabelle 2: Charakteristische Befunde inflammatorischer Polyneuropathien in der Liquordiagnostik, der elektrophysiologischen Diagnostik und in der Histopathologie**

Die jeweils häufigeren Befunde werden zuerst genannt. Abkürzungen: Ø = keine, ↑ = erhöht/verlängert, ↓ = erniedrigt/verkürzt, ↔ = normwertig, AIDP = akut inflammatorische demyelinisierende Neuropathie, AMAN = akut motorische axonale Neuropathie, CIDP = chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, dmL = distal motorische Latenz, EMG = Elektromyographie, MMN = multifokale motorische Neuropathie, NG = Neurographie, NLG = Nervenleitungsgeschwindigkeit, z.T. = zum Teil. Quellenangabe siehe Fließtext.

Weitere für die CIDP typische Befunde in der apparativen Diagnostik können verlängerte Latenzen bei somatosensibel evozierten Potentialen oder eine pathologische MR-Bildgebung in Form von Kontrastmittelaufnahme, Signalanhebungen oder Hypertrophie an den Nervenwurzeln oder am Plexus sein (Vallat et al, 2010). Bei der MMN wurden ebenfalls pathologische somatosensibel evozierte Potentiale sowie Signalanhebungen im Armplexus in der MR-Bildgebung beschrieben (Valls-Sole et al, 1995; Van Asseldonk et al, 2005).

### 3.1.5.2 INCAT-, Brighton- und EFNS-Diagnosekriterien

Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6 stellen die für diese Arbeit relevanten Diagnosekriterien inflammatorischer Polyneuropathien vor: die INCAT-Kriterien für CIDP, Brighton-Kriterien für GBS und EFNS-Kriterien für MMN, jeweils aus den Originalquellen ins Deutsche übersetzt und zusammengefasst (Hughes et al, 2001; Sejvar et al, 2011; Van Schaik et al, 2010).

klinische Merkmale	motorische und sensible Dysfunktion an > 1 Extremität aufgrund einer Neuropathie Verlauf: Dauer von > 2 Monaten, progredient oder schubförmig
Muskeleigenreflexe	Hypo- oder Areflexie
Liquordiagnostik	<10 Leukozyten/ $\mu$ l
Elektrophysiologie entweder 1.  oder 2.	partieller Leitungsblock oder abnormale zeitliche Dispersion an mind. zwei Nerven sowie signifikant reduzierte NLG, verlängerte dmL, verlängerte F-Wellen-Latenz oder F-Wellen-Verlust an mind. einem weiteren Nerven  bei fehlendem Leitungsblock oder abnormaler zeitlicher Dispersion signifikant reduzierte NLG, verlängerte dmL, verlängerte F-Wellen-Latenz oder F-Wellen-Verlust an mind. drei Nerven

oder 3.	bei neurophysiologisch signifikant abnormalen Werten an nur zwei Nerven auch eindeutige Zeichen von Demyelinisierung in der Suralisbiopsie
<u>Definitionen</u> partieller Leitungsblock  signifikant reduzierte NLG signifikant verlängerte dML signifikant verlängerte F-Wellen-Latenz	≥ 20% Amplitudendifferenz zwischen proximaler und distaler Amplitude  ≤ 80% des UNGW ≥ 125% des ONGW ≥ 150% des ONGW

**Tabelle 3: INCAT-Diagnosekriterien für CIDP, übersetzt nach Hughes et al., 2001**

Alle Kategorien (Zeile 1-4) müssen zur sicheren Diagnose einer CIDP zutreffen. Abkürzungen: dML = distal motorische Latenz, mind. = mindestens, NLG = Nervenleitungsgeschwindigkeit, ONGW = oberer Normgrenzwert, UNGW = unterer Normgrenzwert (Hughes et al, 2001).

	<b>Level 1</b>	<b>Level 2</b>	<b>Level 3</b>
klinische Merkmale	bilaterale schlaffe Paresen der Extremitäten; keine wahrscheinlichere Alternativdiagnose	bilaterale schlaffe Paresen der Extremitäten; keine wahrscheinlichere Alternativdiagnose	bilaterale schlaffe Paresen der Extremitäten; keine wahrscheinlichere Alternativdiagnose
Verlauf	monophasisch, Symptomnadir zwischen 12 Stunden und 28 Tagen mit folgender Plateauphase erreicht	monophasisch, Symptomnadir zwischen 12 Stunden und 28 Tagen mit folgender Plateauphase erreicht	monophasisch, Symptomnadir zwischen 12 Stunden und 28 Tagen mit folgender Plateauphase erreicht
Muskeleigenreflexe	Hypo-/Areflexie an betroffenen Extremitäten	Hypo-/Areflexie an betroffenen Extremitäten	Hypo-/Areflexie an betroffenen Extremitäten
Liquordiagnostik	zytoalbuminäre Dissoziation (erhöhtes Eiweiß, <50 Leukozyten/µl)	< 50 Leukozyten/µl oder nicht durchgeführt	-
Elektrophysiologie (siehe Tabelle 5)	typisch für GBS	typisch für GBS, wenn keine Liquordiagnostik durchgeführt wurde	-

**Tabelle 4: Brighton-Diagnosekriterien für GBS I, übersetzt nach Sejvar et al., 2011**

Alle Kategorien (Zeilen) müssen zur Diagnose eines GBS gleichzeitig zutreffen und können je nach diagnostischer Sicherheit so in drei Diagnoselevel (Spalten) getrennt werden (Sejvar et al, 2011).

<b>AIDP</b>	<b>AMSAN</b>	<b>AMAN</b>
<p>mind. eine der folgenden Eigenschaften an zwei Nerven</p> <p>ODER</p> <p>mind. zwei der folgenden Eigenschaften an einem Nerv, wenn die anderen Nerven nicht ableitbar sind und das SAP &gt; 10% des UNGW ist:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– NLG &lt; 90% des UNGW</li> <li>– dmL &gt; 110% des ONGW</li> <li>– Verhältnis proximales SAP zu distalem SAP &lt; 0,5 und distales SAP &gt; 20% des UNGW</li> <li>– F-Wellen-Latenz &lt; 120% des ONGW</li> </ul>	<p>keine der Eigenschaften der AIDP (Spalte 1) vorhanden</p> <p>AUSSER einer demyelinisierenden Eigenschaft, wenn das distale SAP &lt;10% des UNGW</p> <p>UND</p> <p>SNAP &lt;10% des UNGW</p>	<p>keine der Eigenschaften der AIDP (Spalte 1) vorhanden</p> <p>AUSSER einer demyelinisierenden Eigenschaft, wenn das distale SAP &lt;10% des UNGW</p> <p>UND</p> <p>SNAP normwertig</p>

**Tabelle 5: Brighton-Diagnosekriterien für GBS II, übersetzt nach Sejvar et al., 2011**

Elektrophysiologische Kriterien der einzelnen Unterformen AIDP, AMSAN und AMAN. Abkürzungen: AIDP = akut inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie, AMAN = akut motorische axonale Neuropathie, AMSAN = akut motorisch sensible axonale Neuropathie, mind. = mindestens, ONGW = oberer Normgrenzwert, SAP = Summenaktionspotential, SNAP = sensibles Nervenaktionspotential, UNGW = unterer Normgrenzwert (Sejvar et al, 2011).

<p>klinische Kriterien der MMN</p>	<p><u>Hauptkriterien (beide müssen erfüllt sein)</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. langsam progrediente oder schrittweise progrediente, fokale, asymmetrische Schwäche einer/mehrerer Extremitäten mit Beteiligung mind. zweier Nerven &gt; 1 Monat</li> <li>2. keine objektivierbaren sensiblen Defizite (Ausnahme: leichte Pallhypästhesien der UE)</li> </ol> <p><u>supportive klinische Kriterien</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. Beteiligung der OE &gt; UE</li> <li>4. Hypo- oder Areflexie an der betroffenen Extremität</li> <li>5. keine Hirnnervenbeteiligung</li> <li>6. Krämpfe und Faszikulationen an der betroffenen Extremität</li> <li>7. gutes Ansprechen auf IVIG</li> </ol> <p><u>Ausschlusskriterien</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>8. Zeichen des ersten Motorneurons</li> <li>9. bulbäre Beteiligung</li> <li>10. sensible Beteiligung stärker ausgeprägt als reine Pallhypästhesie der unteren Extremität</li> <li>11. diffuse, symmetrische Schwäche während der ersten Wochen der Erkrankungsmanifestation</li> </ol>
<p>Elektrophysiologische Kriterien eines Leitungsblockes (LB)</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. definitiver LB <ul style="list-style-type: none"> <li>– Reduktion der negativen peak-SAP-Fläche proximal vs. distal &gt; 50%</li> <li>– negative peak-SAP-Amplitude bei distaler Stimulation des Segmentes mit LB &gt;20% des UNGW und &gt; 1mV</li> <li>– Zunahme der negativen peak-SAP-Dauer von proximal nach distal <math>\leq</math> 30%</li> </ul> </li> <li>2. wahrscheinlicher LB <ul style="list-style-type: none"> <li>– Reduktion der negativen peak-SAP-Fläche proximal vs. distal um mind. 30% über ein langes Segment an einem Nerven der OE mit Zunahme der proximalen zu distalen negativen peak-SAP-Dauer <math>\leq</math> 30%</li> <li>– ODER: Reduktion der negativen peak-SAP-Fläche proximal vs. distal um mind. 50% (wie definitiver LB) mit Zunahme der proximalen zu distalen negativen peak-SAP-Dauer &gt; 30%</li> </ul> </li> <li>3. normale sensible Elektroneurographien an den Segmenten der OE mit LB (sh. Ausschlusskriterien)</li> </ol>

Supportive Kriterien	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. erhöhte Anti-Gangliosid-GM1-IgM-Titer</li> <li>2. Liquor: erhöhtes Gesamtliquoreiweiß (&lt;1 g/l)</li> <li>3. MR-Bildgebung mit erhöhter T2-Signalintensität am Plexus Brachialis und diffuser Nervenschwellung</li> <li>4. objektivierbare klinische Besserung unter IVIG-Therapie</li> </ol>
Diagnostische Kategorien	<p><u>Definitive MMN</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– klinische Kriterien 1, 2, 8-11 UND elektrophysiologische Kriterien 1 und 3 an einem Nerven</li> </ul> <p><u>Wahrscheinliche MMN</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– klinische Kriterien 1, 2, 8-11 UND elektrophysiologische Kriterien 2 und 3 an zwei Nerven</li> <li>– klinische Kriterien 1, 2, 8-11 UND elektrophysiologische Kriterien 2 und 3 an einem Nerven UND mind. zwei supportive Kriterien</li> </ul> <p><u>Mögliche MMN</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– klinische Kriterien 1, 2, 8-11 UND normale sensible Elektroneurographie UND supportives Kriterium 4</li> <li>– klinisches Kriterium 1, aber Beteiligung nur eines Nerven, Kriterien 2, 8-11 UND elektrophysiologische Kriterien 1 oder 2 und 3 an einem Nerven</li> </ul>

**Tabelle 6: EFNS-Kriterien für MMN, übersetzt nach van Schaik et al., 2010**

Abkürzungen: IVIG = intravenöse Immunglobuline, LB = Leitungsblock, mind. = mindestens, MMN = motorische multifokale Neuropathie, MR = Magnetresonanztomographie, OE = obere Extremität, ONGW = oberer Normgrenzwert, SAP = Summenaktionspotential, UE = untere Extremität, UNGW = unterer Normgrenzwert, vs. = versus (Van Schaik et al, 2010).

### 3.1.6 Therapie inflammatorischer Polyneuropathien

Die Therapieoptionen bei den inflammatorischen Neuropathien werden im Folgenden erläutert, das jeweilige Ansprechen bei CIDP, MMN und GBS ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Auf die für diese Arbeit relevante Therapie mit IVIG und Rituximab wird in den folgenden Kapiteln ausführlich eingegangen.

### 3.1.6.1 Therapieoptionen und -ansprechen bei GBS, CIDP und MMN

Das GBS wird mit IVIG in einer Dosis von 0,4 g/kg Körpergewicht (KG) pro Tag an 5 Tagen oder 1 g/kg KG pro Tag an 2 Tagen oder Plasmapherese (PE)-Zyklen von 5 Plasmaaustauschen mit je 1,5 l Plasmavolumen über 1-2 Wochen behandelt (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015). Eine Therapie mit IVIG innerhalb von zwei Wochen nach Erkrankungsbeginn führt beim GBS zu einer signifikanten Besserung und ist einer PE-Therapie ebenbürtig; eine Kombination bringt keinen Vorteil (Chevret et al, 2017; Hughes, 1997; Hughes et al, 2014; van Doorn et al, 2008). Kortikosteroide sind beim GBS hingegen wirkungslos (Hughes et al, 2016; Vucic et al, 2009). Eine engmaschige Kontrolle der Vitalparameter, der Vitalkapazität und der Muskelkraft bei mäßigem bis schweren Verlauf mit gegebenenfalls intensivmedizinischer Behandlung ist aufgrund der Gefahr kardialer Arrhythmien und einer drohenden respiratorischen Insuffizienz sinnvoll (Hughes & Cornblath, 2005; Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015). Eine langfristige immunsuppressive Therapie wird meist nur beim Übergang in eine chronische Erkrankung durchgeführt (Stoll & Reiners, 2016). Medikamente, die spezifisch am komplementvermittelten Pathomechanismus (siehe Kapitel 3.1.3) angreifen, wie eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper gegen den Komplementfaktor C5 Eculizumab, befinden sich derzeit noch in der klinischen Erprobung (Davidson et al, 2017; Yamaguchi et al, 2016).

Die CIDP wird in der akuten Erkrankungsphase leitliniengerecht mit PE (5/10 Plasmaaustausche über 2/4 Wochen), IVIG in einer Dosis von 0,4 g/kg KG pro Tag über 5 Tage oder Kortikosteroiden behandelt. Letztere können sowohl als Methylprednisolon-Stoßtherapie mit 500-1000 mg pro Tag Methylprednisolon an 3-5 Tagen mit anschließender Reduktion auf eine orale Erhaltungsdosis oder mit Wiederholung alle 4 Wochen, aber auch als orale Behandlung mit 1 mg/kg Prednisolon-Äquivalent pro Tag durchgeführt werden (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015). Etwa 54-76% aller CIDP-Patienten sprechen auf eine immunmodulatorische Therapie an (Berger et al, 2013;

Ripellino et al, 2014). In der Dauertherapie ist sowohl für IVIG als auch für Kortikosteroide langfristig eine Wirkung bestätigt; es wird dabei idealerweise möglichst nebenwirkungsarm therapiert, gleichzeitig aber eine Progredienz der Erkrankung verhindert (Hughes et al, 2008; Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015). Bei mangelndem Ansprechen, Unverträglichkeit oder unerwünschten Nebenwirkungen stehen Immunsuppressiva zur Verfügung: Die beste Evidenz liegt für eine Cyclophosphamid-Pulstherapie, z.B. mit einer Induktion mit 350 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche (KOF) an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit anschließender Erhaltungstherapie von 600 mg/m<sup>2</sup> KOF in 6-8-wöchigen Abständen vor (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015; Mahdi-Rogers et al, 2017). Weitere Immunsuppressiva wie Methotrexat, Mycophenolat-Mofetil oder Rituximab werden in der Literatur nur in Einzelfällen als wirksam beschrieben, die Verabreichung dieser wird daher nicht generell als Therapieoption empfohlen, sondern bedarf einer individuellen Abwägung (Van den Bergh et al, 2010).

Goldstandard in der Therapie der MMN sind IVIG (van Schaik et al, 2005). Diese werden über 2-5 Tage alle 4-8 Wochen in einer Dosis von 2 g/kg KG oder alle 2-4 Wochen in einer Dosis von 1 g/kg KG verabreicht; auch eine subkutane Gabe in gleicher Dosis ist beim Wunsch nach mehr Patientenautonomie möglich (Eftimov et al, 2009; European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society, 2010). Beim Nichtansprechen auf die Therapie kann Cyclophosphamid eingesetzt werden; PE und Kortikosteroide werden aufgrund von fehlender Besserung beziehungsweise sogar Verschlechterung der Symptome allerdings nicht empfohlen (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015). Neue spezifische Therapien wie Rituximab oder Eculizumab zeigen vereinzelt Erfolge, jedoch ist die derzeitige Datenlage hierzu für eine Empfehlung nicht ausreichend (Fitzpatrick et al, 2011; Nobile-Orazio & Gallia, 2013; Stieglbauer et al, 2009).

	<b>CIDP</b>	<b>MMN</b>	<b>GBS</b>
IVIG	gut	sehr gut	gut
PE	gut	kein Ansprechen, z.T. Verschlechterung	gut
Kortikosteroide	gut	kein Ansprechen, z.T. Verschlechterung	kein Ansprechen, z.T. Verschlechterung
Immunsuppressiva	mäßig	vereinzelt ansprechen	n.d.
zielgerichtete Therapie Anti-CD20 (Rituximab) Anti-C5 (Eculizumab)	z.T. gutes Ansprechen	z.T. gutes Ansprechen	z.T. gutes Ansprechen

**Tabelle 7: Therapieansprechen bei CIDP, MMN und GBS**

Abkürzungen: CIDP = chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, GBS = Guillain-Barré-Syndrom, IVIG = intravenöse Immunglobuline, MMN = multifokale motorische Neuropathie, n.d. = nicht durchgeführt, PE = Plasmapherese, z.T. = zum Teil. Quellenangabe siehe Fließtext.

### 3.1.6.2 Intravenöse Immunglobuline (IVIG)

Die Therapie mit IVIG ist die einzige immunmodulatorische Therapie, die sowohl bei der CIDP, der MMN als auch beim GBS wirksam ist und als Therapie der ersten Wahl empfohlen wird. Im Folgenden werden Eigenschaften, Verabreichung und Wirkmechanismus beschrieben.

#### 3.1.6.2.1 Eigenschaften und Verabreichung

Immunglobuline werden aus gepooltem Plasma von bis zu 10.000 Spendern über Plasmafraktionierung, dem sogenannten Cohn-Prozess, gewonnen und unter Verwendung verschiedener Zucker und Albumin stabilisiert; mögliche Infektionsquellen werden über verschiedene Verfahren inaktiviert (Boros et al, 2005; Dalakas, 1997). Immunglobuline enthalten zu > 95% IgG mit einer etwa der Subklassenverteilung im menschlichen Plasma (siehe Kapitel 3.3) entsprechenden Zusammensetzung von bis zu 70% IgG1, bis zu 38% IgG2, bis 6% IgG3 und bis 2,6% IgG4, des Weiteren immunmodulatorische lösliche Peptide und Leukozytenantigene (Dalakas, 1997). Bis zu 40% der IgG-Antikörper liegen als Dimere vor und binden antiideotypisch an die Fab (Fragment antigen binding)-Regionen

anderer IgG (Dalakas, 1997). Die Verabreichung kann intravenös oder subkutan erfolgen (Leussink et al, 2016). Es wird aufgrund empirischer Erfahrung die Durchführung einer intravenösen Hochdosistherapie mit 1-3 g/kg KG empfohlen (Jacob & Rajabally, 2009). Dabei ist ein bis zu fünffacher Anstieg des Serum-Gesamt-IgG-Gehalts bis zu 61,6 mg/ml (Normwert 5,45-15,60 mg/ml) mit Maximum am dritten bis fünften Tag nach Verabreichung nachweisbar, allerdings gibt es hohe interindividuelle Unterschiede (Dalakas, 1994; 2002; Kuitwaard et al, 2009a; Vlam et al, 2014). In einer Gruppe von MMN-Patienten lag die Differenz des IgG-Spiegels im Serum vor IVIG-Gabe und am fünften Tag nach IVIG-Gabe bei  $\Delta$ IgG = 23,4 mg/ml (Vlam et al, 2014). Die Halbwertszeit der Immunglobuline liegt im Allgemeinen bei 18-32 Tagen; die Gabe ist gemäß der Literatur alle 8-12 Wochen, im klinischen Alltag jedoch oft in kürzeren Intervallen notwendig (Jacob & Rajabally, 2009; Kuitwaard et al, 2009a). Die verabreichten IgG können die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Dalakas, 2002).

#### 3.1.6.2.2 Wirkmechanismus

Die Wirkungsweise von IVIG bei immunvermittelten Neuropathien ist multimodal, jedoch werden als Wirkmechanismus von IVIG bei antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen grundsätzlich zwei Prinzipien vorgeschlagen: entweder erstens eine über das Fab-Fragment der humanen Immunglobuline vermittelte direkte Bindung an ein Antigen beziehungsweise als antiidiotypischer Antikörper an Autoantikörper, oder zweitens eine Bindung an das Fc-Fragment von Autoantikörpern (siehe Kapitel 3.3). Dabei kommt es zur Inhibierung, Neutralisierung oder Modifikation zahlreicher humoraler sowie zellulärer Effektorfunktionen (Boros et al, 2005; Kuitwaard et al, 2009a). Zu diesen zählen das Komplementsystem (siehe Kapitel 3.4), das Zytokinnetzwerk und Antikörper als humorale Funktionen sowie die Modulation der B- und T-Zell-Aktivierung und die Modulation der Funktion dendritischer Zellen und Makrophagen als zelluläre Funktionen.

Während die Bindung an das Fab-Fragment von Autoantikörpern eine Neutralisierung bewirkt, kann durch Fc-Bindung die Funktion der Autoantikörper über Veränderung der Halbwertszeit eingeschränkt werden, beispielsweise durch Glykolysierung (Bleeker et al, 2001; Boros et al, 2005; Dalakas, 2002). Hochdosis-Immunglobuline beeinflussen das Komplementsystem durch Inhibierung von aktivierten Komplementfaktoren über enthaltene neutralisierende Antikörper gegen C1, C3a, C3b und C4b sowie durch Inhibierung der C3-Konvertaseaktivität und Akzeleration einer Degradierung von C3b (Boros et al, 2005; Jacob & Rajabally, 2009). Folglich wird die Bildung des Membranangriffskomplexes verhindert (Dalakas, 2002). Bei der CIDP konnte beispielsweise ein schneller, aber vorübergehender positiver Effekt von IVIG auf die Muskelkraft gezeigt werden, welcher also generell repetitive IVIG-Gaben nötig macht. Mechanistisch wird hierbei sowohl die direkte Inhibierung von Autoantikörpern, welche einen Einfluss auf die axonale Erregbarkeit haben, als auch die unmittelbare Beeinflussung des Komplementsystems vorgeschlagen, weniger aber langfristige Effekte auf De- und Remyelinisierung (Berger et al, 2013). Ein langfristiger Effekt wird eher durch die Minderung immunkomplexvermittelter Pathologien durch die Attenuierung von Komplement erreicht (Lutz et al, 2004). Bei akuten inflammatorischen Polyneuropathien mit Autoantikörpern gegen die Ganglioside GQ1b und GD1a konnte *in vitro* eine Reduktion der Komplementbindung- und Aktivierung durch Zugabe von IVIG gezeigt werden (Jacobs et al, 2003; Sudo et al, 2014; Zhang et al, 2004). Auch bei der MMN verhindert IVIG *in vitro* eine Anti-GM1-IgM-vermittelte Komplementbindung- und Aktivierung (Piepers et al, 2010; Yuki et al, 2011).

Zusammenfassend wird eine Wirkung von IVIG bei inflammatorischen Neuropathien durch eine Kombination der einzelnen Mechanismen, insbesondere der Komplementinhibierung und Antikörperneutralisation, angenommen (Berger et al, 2013; Dalakas, 2002).

### 3.1.6.3 Rituximab

Rituximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der gegen das B-Zell-Oberflächenantigen CD20 gerichtet ist und zur B-Zell-Depletion führt. CD20 wird in allen B-Zell-Stadien bis auf die Stadien der pro-B-Zelle, des Plasmablasten und der Plasmazelle exprimiert (Cragg et al, 2005; Linker & Kieseier, 2008; Schröder A. et al, 2009). Rituximab wurde erstmals 1997 in den USA zugelassen; in der EU ist es unter dem Handelsnamen MabThera® und Truxima® für chronisch-lymphatische Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphome, schwere rheumatoide Arthritis, Granulomatose mit Polyangiitis und mikroskopische Polyangiitis zugelassen (European Medicine Agency, 2009; 2017; McLaughlin et al, 1998; Singh et al, 2010). Auch in der Neurologie hat Rituximab ein weites Anwendungsspektrum, beispielsweise bei der Neuromyelitis optica, der Myasthenia gravis und den Immunneuropathien, wird jedoch ausschließlich als Off-Label-Therapie eingesetzt (Hehir et al, 2017; Schröder A. et al, 2009). In mehreren Fallberichten und Fallserien wurde Rituximab als wirksame Therapie bei therapierefraktärer MMN oder CIDP eingesetzt (Benedetti et al, 2011; Briani et al, 2004; Jinka & Chaudhry, 2014; Nobile-Orazio & Gallia, 2013). Eine Empfehlung wurde jedoch noch nicht ausgesprochen, so dass es experimentell nur in Einzelfällen eingesetzt wird (Dorner et al, 2009; Van den Bergh et al, 2010). Bei der Untergruppe der Anti-MAG-Neuropathie wird ebenfalls ein positiver Effekt von Rituximab beschrieben und konnte in einer kleinen, verblindeten und kontrollierten Studie bestätigt werden (Benedetti et al, 2007; Dalakas et al, 2009; Renaud et al, 2006). Bei Letzterer wird daher in den Leitlinien eine intravenöse Therapie mit zweimaliger Induktion in einer Dosis von 1000 mg im Abstand von 2 Wochen und eine Erhaltungstherapie nach circa 12 Monaten empfohlen (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015). Auch bei der IgM-paraproteinämischen CIDP wird Rituximab in den Leitlinien aufgrund der Evidenzlage für eine Wirksamkeit (Steck et al, 2006) empfohlen (Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 2015). In den letzten Jahren wurden gute Therapieerfolge von

Rituximab besonders bei IgG4-vermittelten neurologischen und nicht-neurologischen Autoimmunerkrankungen berichtet: Bei der Anti-Musk-positiven Myasthenia gravis, der autoimmunen Pankreatitis oder sklerosierenden Cholangitis gibt es bereits eine hohe Evidenz für eine Wirksamkeit von Rituximab. So konnte beispielsweise in einer retrospektiven multizentrischen Studie mit 156 Patienten mit sogenannter „IgG4-related disease“ bei 93,5% (29/31 Patienten) ein Ansprechen auf Rituximab verzeichnet werden und bei der Anti-Musk-positiven Myasthenia gravis in einer prospektiven multizentrischen Studie ein signifikant positives Ansprechen auf Rituximab mit einer „Number needed to treat“ von 2,4 gezeigt werden (Ebbo et al, 2017; Hehir et al, 2017; Khosroshahi et al, 2012). Ein Therapieansprechen bei therapierefraktärer CIDP mit paranodalen IgG4-Autoantikörpern wurde neben dieser Studie erstmals in einer Fallserie von Querol et al. beschrieben sowie im Verlauf auch in weiteren Studien (Delmont et al, 2017; Doppler et al, 2016; Doppler et al, 2015b; Querol et al, 2015).

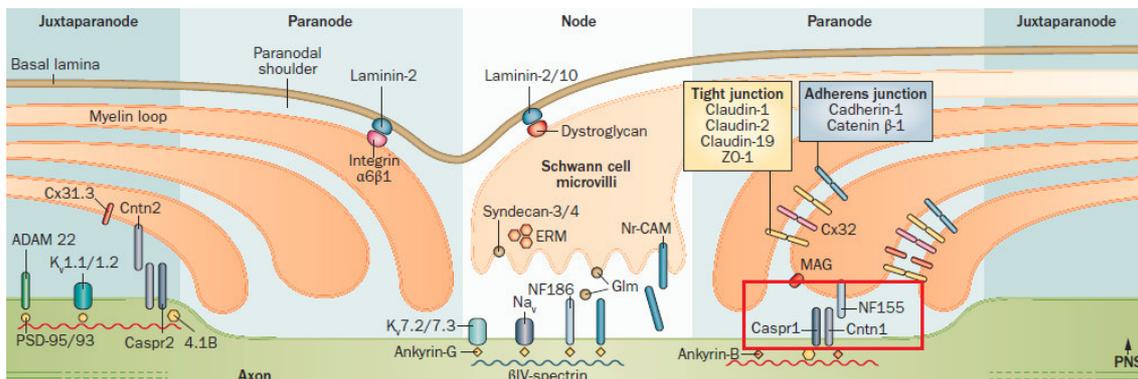
## 3.2 Nodale Architektur

Im Folgenden soll der Ranvier'sche Schnürring mit seiner charakteristischen Architektur als Ausgangspunkt pathophysiologischer Prozesse bei inflammatorischen Neuropathien vorgestellt werden.

### 3.2.1 Morphologie des peripheren Ranvier'schen Schnürrings

Der Ranvier'sche Schnürring im PNS hat eine Länge von circa 1  $\mu\text{m}$ , ist der Ort der saltatorischen Erregungsweiterleitung und kann in drei Regionen unterteilt werden, die von nicht kompaktem Myelin umgeben sind und sich in ihrer Funktion und molekularen Zusammensetzung unterscheiden: Das Nodium, das Paranodium und das Juxtaparanodium. Zwischen den Schnürringregionen liegt das 1-2 mm lange Internodium mit kompakter Myelinscheide (Stathopoulos et al, 2015; Uncini & Kuwabara, 2015). Am Nodium sind spannungsabhängige Natriumkanäle sowie langsame Kaliumkanäle lokalisiert, deren Lateraldiffusion durch das Protein Neurofascin-186 verhindert wird (Davis et al, 1996; Sherman et al, 2005; Thaxton et al, 2011; Waxman & Ritchie, 1993). Die Ionenkanäle des Ranvier'schen Schnürrings werden ebenfalls durch in Lipid Rafts der Zellmembran des Nodiums und Paranodiums enthaltene Glykosphingolipide, den Gangliosiden wie GM1 oder GD1a, stabilisiert (Gong et al, 2002; Susuki et al, 2007a). Die hohe Natriumkanaldichte am Nodium ( $>1000/\mu\text{m}^2$ ) im Gegensatz zu den Internodien ( $<25/\mu\text{m}^2$ ) ermöglicht die saltatorische Erregungsweiterleitung (Poliak & Peles, 2003; Uncini & Kuwabara, 2015). Neurofascin-186 ist genauso wie das Zelladhäsionsmolekül NrCAM über  $\beta$ IV-Spektrin und AnkyrinG mit intrazellulärem Aktin vernetzt, wird aber im Gegensatz zu NrCAM nur am Axon exprimiert (Komada & Soriano, 2002; Tait et al, 2000). Über Interaktion von Neurofascin-186 mit dem Protein Gliomedin, welches in der Extrazellulärmatrix und an den Mikrovilli der Schwannzellen exprimiert wird, wird der axogliale Kontakt stabilisiert (Stathopoulos et al, 2015). Weitere an der Signalweiterleitung beteiligte Proteine an den Myelin-Mikrovilli sind Dystroglykane und Syndekane (Martin et al, 2001; Rambukkana et al, 1998). Am Paranodium festigt der Komplex aus axonalem

Contactin-1 und Caspr sowie glialem Neurofascin-155 den Kontakt zwischen den helixförmigen Myelinfortsätzen und dem Axon (Poliak & Peles, 2003). Der Komplex wird über AnkyrinB und Protein 4.1B im Zytoskelett verankert (Denisenko-Nehrbass et al, 2003). Weitere am Paranodium lokalisierte Strukturen sind Integrine und Glykoproteine wie Myelin-assoziiertes Glykoprotein, kurz MAG (Stathopoulos et al, 2015). Am Juxtaparanodium kommen schnelle, spannungsabhängige Kaliumkanäle in hoher Dichte vor, die durch den Proteinkomplex aus axonalem Caspr2 und glialem Contactin-2 / TAG1 gruppiert werden und mit dem Protein ADAM22, welches ebenfalls für eine intakte Erregungsweiterleitung wichtig ist, interagieren (Poliak et al, 1999; Sagane et al, 2005; Uncini & Kuwabara, 2015). Die Interzellulärkontakte des Ranvier'schen Schnürringes werden durch Gap-Junction-Proteine wie Connexine und Tight-Junction-Proteine wie Claudine aufrechterhalten (Stathopoulos et al, 2015). Abbildung 1 skizziert die molekulare Anatomie des Schnürrings im PNS (Stathopoulos et al, 2015).



**Abbildung 1: Molekulare Anatomie des Schnürrings, modifiziert nach Stathopoulos et al., 2015**

Die Ionenkanäle und Proteine des axoglialen Überganges werden über zytoskelettale Proteine, extrazelluläre Matrix und Adhäsionsmoleküle verankert. Der paranodale axogliale Proteinkomplex von Contactin-1, Caspr und Neurofascin-155 ist rot umrandet. Abkürzungen: ADAM 22 = disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22, Bral1 = brain link protein 1, Caspr = contactin-associated protein, Cntn = Contactin, Cx = connexin, ERM = ezrin-radixin-moesin, Glim = gliomedin, KV = voltage-gated potassium channel, MAG = myelin-associated glycoprotein, NaV = voltage-gated sodium channel, NF = neurofascin, Nr-CAM = neuronal cell adhesion molecule, PNS = peripheral nervous system, PSD = postsynaptic density protein. Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

### 3.2.2 Pathophysiologie am Ranvier'schen Schnürring bei inflammatorischen Neuropathien

Sowohl bei zentralen als auch bei peripheren demyelinisierenden Erkrankungen spielt die Störung der obig beschriebenen nodalen Architektur eine elementare Rolle. Dafür gibt es zahlreiche histopathologische Belege; in den letzten Jahren wurden die Schnürringproteine außerdem als Zielstrukturen autoimmuner, antikörpervermittelter Prozesse identifiziert.

#### 3.2.2.1 Zeichen morphologischer Schädigung

Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Neuritis wurde schon früh elektronenmikroskopisch eine nodale Architekturstörung detektiert (Allt, 1975). Auch in humanem Material konnte sowohl bei zentralen, demyelinisierenden Erkrankungen wie der MS als auch bei peripheren demyelinisierenden Neuropathien wie der CIDP immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch in Nervenbiopsien und Autopsiematerial eine Dispersion von paranodalen Proteinen und Natriumkanälen nachgewiesen werden (Cifuentes-Diaz et al, 2011; Coman et al, 2006). Bei den akuten, axonalen Formen inflammatorischer Polyneuropathien wie der AMSAN und der AMAN fielen neben den elektrophysiologischen Zeichen einer paranodalen, segmentalen Demyelinisierung ebenfalls in mehreren autopsischen Studien verlängerte Schnürringe auf (Franssen & Straver, 2013; Uncini et al, 2013). In Hautbiopsien des Fingers zeigte sich eine segmentale Demyelinisierung und eine Architekturstörung bei Patienten mit inflammatorischen und hereditären demyelinisierenden Neuropathien (Doppler et al, 2013; Li et al, 2005). Eine morphologische Schädigung des Schnürringes bei demyelinisierenden Neuropathien ist also offensichtlich, die Auslöser dieser Pathologie jedoch nicht eindeutig identifiziert.

### 3.2.2.2 Studienlage zu Autoantikörpern gegen (para)nodale Proteine

Die Erstbeschreibung von Autoantikörpern gegen axogliale Proteine des Ranvier'schen Schnürringes erfolgte durch Mathey et al. bei Patienten mit multipler Sklerose (MS); hier konnten Neurofascin-IgG-Antikörper nachgewiesen werden (Mathey et al, 2007). Im Folgenden wurden diese auch bei immunvermittelten Erkrankungen des PNS detektiert (Ng et al, 2012; Pruss et al, 2011). Tabelle 8 liefert eine Auflistung der Studien mit Beschreibung von nodalen, paranodalen und juxtapanodalen IgG-Autoantikörpern bei inflammatorischen Polyneuropathien und bildet die gefundenen Subklassen sowie die teilweise zitierten, teilweise aus den Literaturangaben errechneten Prävalenzen bei CIDP, GBS und MMN ab. Die Ergebnisse dieser Studie wurden während der Arbeit an der Promotion bereits in weiteren Studien der neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg (UKW) veröffentlicht (Doppler et al, 2015a; Doppler et al, 2016; Doppler et al, 2015b). Diese werden zur Vollständigkeit bereits abgebildet, die Prävalenzen weichen aber aufgrund von anderen Fallzahlen von den im Ergebnisteil beschriebenen Prävalenzen ab.

AK	Autor	Jahr	Subklasse	CIDP	GBS	MMN
<u>nodale Antigene</u>						
NF186	Ng J.K et al.	2012	IgG1, IgG3	0%	3%	n.d.
	Devaux et al.	2012	n.d.	12%	15%	n.d.
	Notturmo et al.	2014	n.d.	1%	17,3%	62%
	Doppler et al.	2015	IgG4	n.d.	n.d.	0%
	Delmont et al.	2017	IgG4>IgG3	2%	0%	n.d.
NF140	Delmont et al.	2017	IgG4>IgG3	2%	0%	n.d.
GLDN	Devaux et al.	2012	n.d.	6%	12%	n.d.
	Notturmo et al.	2014	n.d.	1%	24%	40%
	Delmont et al.	2017	n.d.	0%	0%	n.d.
NrCAM	Devaux et al.	2012	n.d.	2%	4%	n.d.
Moesin	Sawai et al.	2014	n.d.	n.d.	12,5%	n.d.

<u>paranodale Antigene</u>						
CNTN1	Devaux et al.	2012	n.d.	16%	12%	n.d.
	Querol et al.	2012	IgG4	8,6%	0%	n.d.
	Doppler et al.	2015	IgG4	3,8%	0%	0%
	Doppler et al.	2015	IgG3	3,8%	0%	0%
	Miura et al.	2015	IgG4	2,4%	0%	n.d.
	Miura et al.	2015	IgG2	0,05%	2,5%	n.d.
	Koike et al.	2016	IgG4	0,07%	n.d.	n.d.
	Devaux et al.	2016	IgG4	2,4%	n.d.	n.d.
	Delmont et al.	2017	n.d.	1%	0%	n.d.
	Mathey et al.	2017	IgG4	7%	n.d.	0%
NF155	Ng J.K et al.	2012	IgG4>IgG3	3,4%	0%	n.d.
	Ng J.K et al.	2012	IgG1, IgG3	0%	3%	n.d.
	Kawamura et al.	2013	n.d.	25%	11%	n.d.
	Querol et al.	2014	IgG4	3,8%	0%	0%
	Ogata et al.	2015	IgG4	18%	0%	n.d.
	Ogata et al.	2015	IgG1	0%	3,8%	n.d.
	Doppler et al.	2015	n.d.	n.d.	n.d.	0%
	Kadoya et al.	2016	IgG4	8%	0%	n.d.
	Koike et al.	2016	IgG4	6,7%	n.d.	n.d.
	Devaux et al.	2016	IgG4	7,2%	0%	n.d.
	Cortese et al.	2016	IgG4	3,8%	n.d.	n.d.
	Delmont et al.	2017	IgG4	4%	0%	n.d.
	Mathey et al.	2017	IgG4	7%	n.d.	0%
Caspr	Doppler et al.	2016	IgG4	2,8%	0%	n.d.
	Doppler et al.	2016	IgG3	0%	4,5%	n.d.
	Delmont et al.	2017	n.d.	1%	0%	n.d.
Cx32	Kwa et al.	2001	n.d.	4,2%	0%	n.d.
	Stathopoulos et al.	2014	n.d.	0%	0%	0%
<u>juxtapanodale Antigene</u>						
Caspr2	Rosch et al.	2014	n.d.	n.d.	zwei Fälle	n.d.
CNTN2	Stathopoulos et al.	2014	n.d.	0%	n.d.	0%
	Prüss et al.	2011	n.d.	n.d.	0%	n.d.

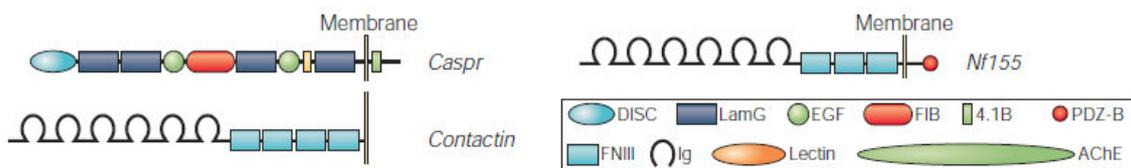
**Tabelle 8: Studien zu nodalen und paranodalen axoglialen Autoantikörpern bei inflammatorischen Neuropathien**

Abkürzungen: AK = Antikörper, Caspr = Contactin associated protein, CIDP = chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, CNTN = Contactin, Cx = Connexin, GBS = Guillain-Barré-Syndrom, GLDN = Gliomedin, IgG = Immunglobulin G, MMN = motorische multifokale Neuropathie, n.d. = nicht durchgeführt, NF = Neurofascin, NrCAM = Neuronal cell adhesion molecule.

Die höchste Relevanz haben also IgG4-Antikörper gegen Bestandteile des paranodalen axoglialen Komplexes aus Contactin-1, Caspr und Neurofascin-155 bei Patienten mit CIDP. Der Aufbau dieses Komplexes wird daher im Folgenden ausführlich beschrieben.

### 3.2.3 Der paranodale axogliale Komplex

Das Myelin liegt am Paranodium in terminalen, helixförmigen Fortsätzen locker um das Axon (siehe Abbildung 1) und wird durch einen axoglialen Komplex aus Caspr, Contactin-1 und Neurofascin-155 verankert (Poliak & Peles, 2003; Sherman et al, 2005). Diese Art von Interzellulärkontakt ähnelt den Septate-Junctions, welche bei Insekten wie *Drosophila* vorkommen und eine Grenze zwischen Epithelzellen bilden, und wird daher Septate-like-Junction genannt (Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013). Experimentell zeigten sich in Abwesenheit dieser Interzellulärkontakte eine Aufweitung der Myelinfortsätze, eine nodale Architekturstörung sowie reduzierte Nervenleitungsgeschwindigkeiten (Bhat et al, 2001; Boyle et al, 2001; Sherman et al, 2005; Sun et al, 2009). Die einzelnen Bestandteile sind im Folgenden näher beschrieben, Abbildung 2 zeigt deren molekulare Domänen (Poliak & Peles, 2003).



**Abbildung 2: Molekulare Struktur der Bestandteile des axoglialen Komplexes aus Caspr, Contactin-1 und Neurofascin-155, modifiziert nach Poliak & Peles, 2003**

Abkürzungen: AChE= Acetylcholinesterase, Caspr = contactin associated protein, DISC = discoidin-like domain, EGF = epidermal growth factor, FIB = fibrinogen-like domain, FNIII = fibronectin-III-like domain, Ig = immunoglobulin-like domain, LamG = laminin G, PDZ-B = PDZ-binding domain, Nf = Neurofascin. Mit freundlicher Genehmigung der Nature Publishing Group.

### 3.2.3.1 Contactin-associated-protein-1 (Caspr1)

Caspr1 (auch bekannt als Paranodin, im Folgenden als Caspr bezeichnet) ist ein neuronales Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 190 kDa, welches zur Gruppe der Neurexine gehört (Einheber et al, 1997; Menegoz et al, 1997; Rios et al, 2000). Proteine dieser heterogenen Familie fungieren als neuronale Zelladhäsionsmoleküle und sind an der interzellulären Signalübertragung beteiligt (Missler & Sudhof, 1998). Es gibt fünf humane Gene *Caspr1-5* der NeurexinIV/Caspr/Paranodin-Familie, welche für Proteine mit unterschiedlichen Expressionsmustern und Funktionen kodieren; sie konnten bisher nur in Nervengewebe und hier axonal, nicht glial nachgewiesen werden (Menegoz et al, 1997; Poliak & Peles, 2003; Spiegel et al, 2002). Caspr wird im PNS diffus an unmyelinisierten Axonen und am Paranodium myelinisierter Axone und zentral vor allem im Zerebellum und am Okzipitalpol exprimiert, Caspr2 hingegen wird im PNS am Juxtaparanodium und im zentralen Nervensystem (ZNS) ubiquitär in zahlreichen Hirnregionen stark exprimiert (Einheber et al, 1997; Spiegel et al, 2002). Alle Caspr-Proteine enthalten extrazellulär eine DISC-, vier LamininG-Domänen und zwei EGF-Repeats (siehe Abbildung 2); ein PGY-Repeat kommt nur bei Caspr1 vor (Spiegel et al, 2002). Caspr1 und Caspr2 unterscheiden sich hauptsächlich in der zytoplasmatischen Domäne, beide binden aber intrazellulär an Protein 4.1B (Poliak & Peles, 2003). Nur Caspr1 bildet mit seiner extrazellulären Domäne einen lateralen cis-Komplex mit Contactin-1 (Boyle et al, 2001; Gollan et al, 2002). Es reguliert die Glykosylierung von Contactin-1, verhindert eine intrazelluläre Bindung von Contactin-1 an Neurofascin-155, was für den Membrantransport wichtig ist, und stabilisiert Contactin-1 am Paranodium (Gollan et al, 2002; Gollan et al, 2003). Dort verhindert Caspr die Lateraldiffusion der Natriumkanäle des Nodiums (Einheber et al, 1997).

### 3.2.3.2 Contactin-1

Contactin-1 ist ein GPI-verankertes Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie mit einem Molekulargewicht von 130kDa, welches im ZNS sowohl auf Neuronen als auch Oligodendrozyten, im PNS nur auf Neuronen, nicht aber an Schwannzellen exprimiert wird (Einheber et al, 1997; Ranscht, 1988; Reid et al, 1994). Es besteht aus sechs IgG-Domänen und vier FNIII-Domänen (siehe Abbildung 2). Im ZNS spielt Contactin als Adhäsionsmolekül auf Axonen und Dendriten eine Rolle bei neuronaler Aussprossung und Wachstum sowie bei der Bildung von Synapsen (Berglund et al, 1999; Boyle et al, 2001; Faivre-Sarrailh & Rougon, 1997). Contactin-1 ist für den effizienten Membrantransport von Caspr nötig; letzteres wird beispielsweise in Zellkulturen ohne Anwesenheit des GPI-Ankers des Proteins Contactin-1 nur intrazellulär exprimiert (Boyle et al, 2001; Faivre-Sarrailh et al, 2000). Contactin-1 bindet am Paranodium an das gliale Protein Neurofascin-155 in trans-Konfiguration und bildet so einen Teil des axogliale Komplexes (Charles et al, 2002; Volkmer et al, 1998). Dies kann auch in Abwesenheit von Caspr1 geschehen, besonders in der mannosereichen Glykoform, und wird über die IgG-Domänen vermittelt (Bonnon et al, 2007; Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013; Poliak & Peles, 2003).

### 3.2.3.3 Neurofascin-155

Neurofascin-155 ist ein Protein der L1-Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie, das an neuronaler Aussprossung und neuronalem Wachstum sowie an Interzellulärkontakten beteiligt ist (Charles et al, 2002; Tait et al, 2000). Das Neurofascin-Gen *Nfasc* kodiert durch alternatives Splicing für mehrere Isoformen, wobei die Splice-Variante mit einem Molekulargewicht von 155kDa (Neurofascin-155) glial und die mit 186kDa (Neurofascin-186) axonal exprimiert wird; Neurofascin-140 wird hauptsächlich stark in der Embryonalentwicklung exprimiert (Davis & Bennett, 1993; Tait et al, 2000; Zhang et al, 2015). Neurofascin-155 besteht aus vier extrazellulären FNIII-Domänen und sechs IgG-Domänen; es unterscheidet sich damit nur in einer zusätzlichen membrannahen FNIII-Domäne

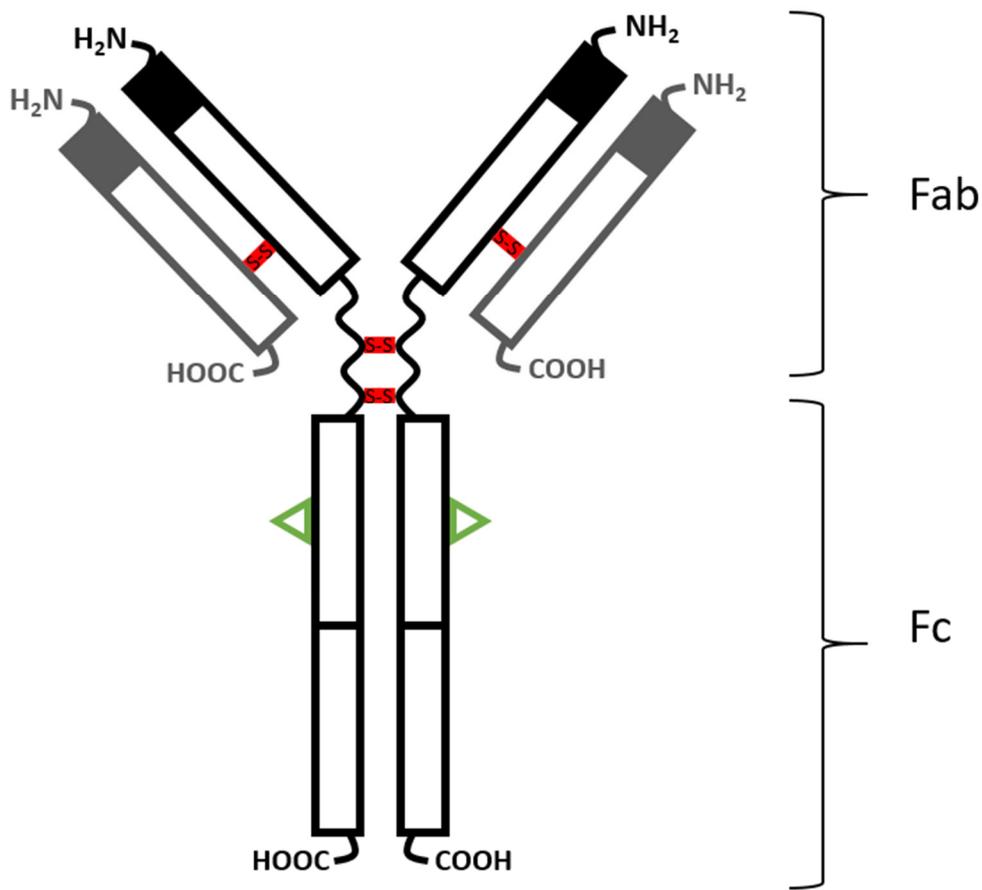
und einer Mucindomäne von Neurofascin-186 (Basak et al, 2007). Die IgG-Domänen 5 und 6 sind für die Interaktion mit Contactin-1 in trans-Konfiguration essentiell (Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013). Im ZNS kommt es ubiquitär an Oligodendrozyten vor, im PNS ist es an den terminalen Myelinschleifen des Paraneuriums lokalisiert (Tait et al, 2000). Dort bildet es die gliale Komponente der Septate-like-Junctions.

### 3.3 Immunglobulin G (IgG)

Im Gegensatz zu Anti-Gangliosid-Antikörpern bei immunvermittelten Neuropathien, die als IgM- oder IgG-Antikörper vorliegen können (Dalakas, 2015; Goodfellow & Willison, 2016), wurden bisher nur Antikörper der Klasse IgG gegen paranodale axogliale Proteine beschrieben (siehe Tabelle 8). Diese Immunglobulinklasse wird daher im Folgenden vorgestellt.

#### 3.3.1 Allgemeiner Aufbau von IgG-Antikörpern

Die Klasse Immunglobulin G macht etwa 10-20% der menschlichen Plasmafraktion und mit > 75% den Hauptanteil der Immunglobulinclassen IgA, IgD, IgE, IgG und IgM aus (Bournazos & Ravetch, 2017; Vidarsson et al, 2014). IgG-Antikörper bestehen aus jeweils einer leichten und einer schweren Peptidkette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind und dimerisieren je nach Subklasse über 2-11 Disulfidbrücken an der schweren Kette; so erreichen sie ein Molekulargewicht von circa 150kDa. Am N-terminalen Ende befindet sich das für die Antigenbindung verantwortliche Fab-Fragment, welches in eine variable, antigenspezifische und eine konstante Region untergliedert werden kann. Letztere ist über eine gelenkartige Aminosäuresequenz an der schweren Kette mit der löslichen Fc-Region verbunden (Hmiel et al, 2015; Porter, 1963). Hier befinden sich Glykolysierungsstellen und Bindungsstellen für Effektorproteine wie Komplementfaktoren (Bournazos et al, 2015). Immunglobulin G hat subklassenabhängig eine Halbwertszeit von einer bis vier Wochen (Spiegelberg & Fishkin, 1972). Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Aufbau eines Antikörpers der Klasse Immunglobulin G**

Die schweren Ketten sind schwarz, die leichten Ketten grau, die variable Region gefüllt dargestellt. Disulfidbrücken sind in rot eingezeichnet. Die Komplementbindungsregion ist durch ein grünes Dreieck markiert. Abkürzungen: Fab = Fragment antigen binding, Fc = crystallisable fragment.

### 3.3.2 IgG-Subklassen und deren Eigenschaften

Immunglobulin G kann in vier Subklassen mit 90% identischer Aminosäuresequenz, aber dennoch unterschiedlichem Aufbau und unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften, unterteilt werden (Schur, 1988; Vidarsson et al, 2014). Diese sind nach ihrer historischen Entdeckung und Häufigkeit im menschlichen Plasma in G1-4 benannt (Aalberse et al, 2009). Während ein Kontakt mit Antigenen, die über MHC II durch T-Zellen präsentiert werden, zur Produktion von IgG1 und IgG3 führt, findet ein Subklassenwechsel zu IgG2 T-Zell-unabhängig nach Kontakt mit Polysaccharid-Antigenen und zu IgG4 nach chronischem Antigenkontakt statt (Aalberse et al, 2009; Bruhns et al, 2009). IgG1 wird als erste

Subklasse nach Kontakt mit löslichen Antigenen produziert und kommt am häufigsten vor (Vidarsson et al, 2014). IgG2 ist IgG1 strukturell sehr ähnlich, macht circa 30% des Gesamt-IgG aus und spielt bei der Abwehr von Bakterien über Bindung an deren Polysaccharidkapseln eine Rolle (Aalberse et al, 2009; Correia, 2010). IgG3 kennzeichnet sich durch eine lange Gelenksregion mit vielen Disulfidbrücken, fungiert vor allem als proinflammatorischer Antikörper, aktiviert zahlreiche Effektorfunktionen wie das Komplementsystem und wird vor allem bei viralen Infektionen produziert (Hmiel et al, 2015; Vidarsson et al, 2014). IgG3 hat durch einen Aminosäureaustausch an Position 435 eine wesentlich kürzere Halbwertszeit als die anderen Subklassen (Irani et al, 2015). IgG4 kann durch den Austausch von Halbdimeren spezifisch an unterschiedliche Antigene binden, erkennt die Fc-Region anderer Immunglobuline, vermittelt Toleranz bei allergischen Reaktionen, wird außerdem bei parasitären Infektionen produziert und ist im Gegensatz zu den anderen Subklassen nicht zur Komplementbindung befähigt (Bindon et al, 1988; Schumaker et al, 1976; Tao et al, 1993; Vidarsson et al, 2014). IgG4 ist hochspezifisch und antigenaffin und entsteht nach langer Antigenexposition und mehrfachen somatischen Hypermutationen (Aalberse et al, 2009; Huijbers et al, 2015; Vidarsson et al, 2014). Tabelle 9 fasst einige Charakteristika der IgG-Subklassen zusammen.

	<b>IgG1</b>	<b>IgG2</b>	<b>IgG3</b>	<b>IgG4</b>
Molekulargewicht (kDa)	146	146	170	146
S-S zwischen den HC	2	4	11	2
mittlere Konzentration in humanem Serum	6,98 mg/dl	3,8 mg/dl	0,51 mg/dl	0,56 mg/dl
Anteil am Gesamt-IgG	>50%	30%	4%	< 5%
Halbwertszeit (Tage)	21	21	7	21
Komplementbindung (C1q)	+++	+	++++	-

**Tabelle 9: Eigenschaften der IgG-Subklassen nach Aalberse et al., 2009, Vidarsson et al., 2014, und Hmiel et al., 2015**

Abkürzungen: Ig = Immunglobulin, HC = Heavy Chain, S-S = Disulfidbrücken (Aalberse et al, 2009; Hmiel et al, 2015; Vidarsson et al, 2014).

## 3.4 Das Komplementsystem

Eine komplementvermittelte Schädigung von durch Autoantikörper gebundenen Strukturen spielt in der Pathophysiologie immunvermittelter Neuropathien eine wichtige Rolle (siehe Kapitel 3.1.3). Im Folgenden werden daher die Funktion und die Wirkungsweise des Komplementsystems erläutert.

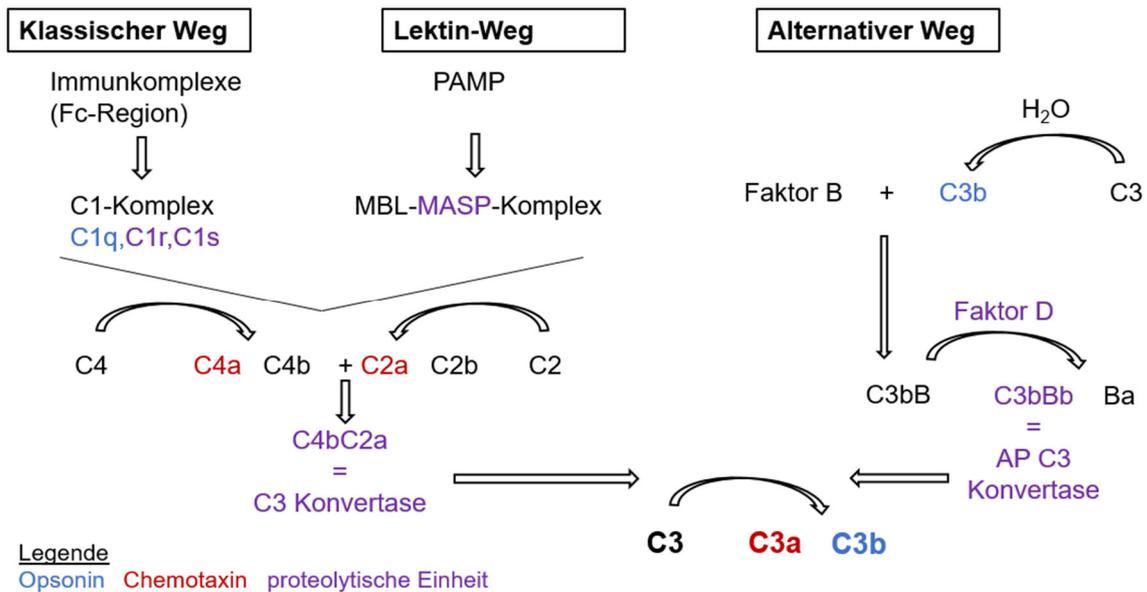
### 3.4.1 Aufbau und Funktion des Komplementsystems

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen, humoralen Immunsystems und dient physiologischerweise über inflammatorische Prozesse und direkte Lyse zur Abwehr von Mikroorganismen. Es setzt sich aus über 30 Plasmaproteinen zusammen, die durch proteolytische Kaskaden aktiviert werden und macht etwa 15% der menschlichen Plasmafraktion aus. Die höchste Konzentration im Plasma erreicht der Komplementfaktor C3 mit durchschnittlich 1 mg/ml; sie ist bei systemischen Entzündungsprozessen allerdings weiter erhöht. Die Opsonisierung, vermittelt über die Komplementfaktoren C1q und C3b, markiert das Pathogen für Fresszellen des Immunsystems, die fremde Zellen so leichter phagozytieren können. Durch die Chemotaxine (C3a, C4a, C5a) werden weitere Entzündungszellen angezogen. Anaphylatoxine (C2a, C3a, C4a, C5a) dienen zur Steigerung der Gefäßpermeabilität. Durch die Bildung des sogenannten Membranangriffskomplexes (C5b, C6-C9) können Zellen direkt lysiert werden (Diebolder et al, 2014; Dunkelberger & Song, 2010; Ricklin et al, 2010; Rodriguez et al, 2015; Walport, 2001).

Daneben hat das Komplementsystem unter anderem auch bei der Angiogenese, bei Regenerationsprozessen, beim Fettstoffwechsel und bei der Migration von Stammzellen eine Bedeutung. Durch Störung der Homöostase zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen ist es auch an zahlreichen pathologischen Entzündungsprozessen beteiligt (Diebolder et al, 2014; Ricklin et al, 2010).

### 3.4.2 Aktivierung und Endstrecke

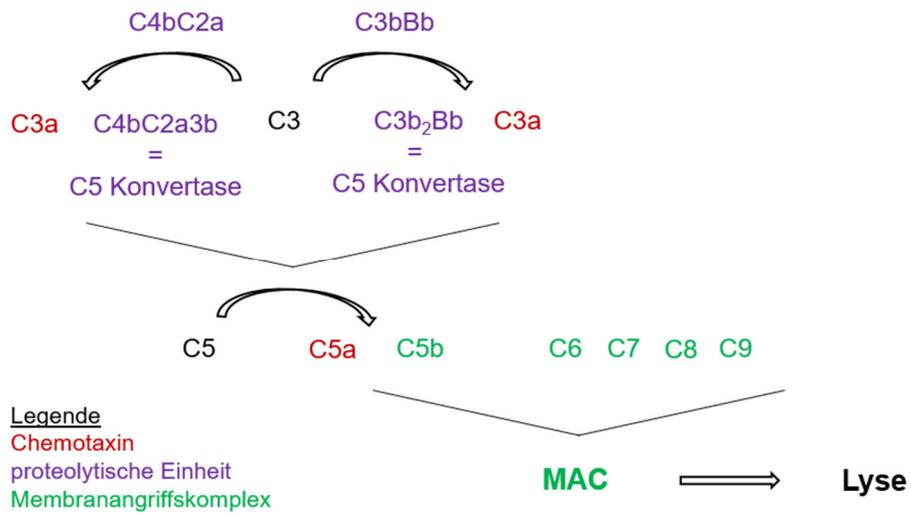
Das Komplementsystem wird durch eine proteolytische Kaskade aktiviert. Dieser Prozess wird je nach aktivierendem Agens auf unterschiedliche Weise initiiert. Dabei kommt es zu engen Verknüpfungen und Interaktionen, klassischerweise unterscheidet man allerdings drei Aktivierungswege (siehe Abbildung 4). Beim klassischen Weg bindet der Komplementfaktor C1q an die Fc-Fragmente von in Komplexen vorliegenden oder gebundenen IgG- und IgM-Antikörpern (siehe Kapitel 3.3.1); daher wird diese Initiierung auch als antikörperabhängig bezeichnet. Dadurch werden die proteolytischen Komplementfaktoren C1r und C1s, welche mit C1q den C1-Komplex bilden, aktiviert und spalten C4 und C2. Aktiviertes C4b und C2a lagern sich zur C3-Konvertase zusammen. Beim Lektin-Weg binden mannosebindende Lektine (MBL) an kohlenhydrathaltige Struktur motive von Erregern, welche PAMPs (Pathogen associated molecular pattern) genannt werden. Die Lektine bilden mit Serinproteasen wie MASP2 einen Komplex, der ähnlich dem klassischen Weg ebenfalls zur Aktivierung von C2 und C4 führt. Der alternative Weg hängt von der spontanen Hydrolyse eines kleinen Anteils der Plasmafraktion von C3 ab. Dieses gelöste C3b, auch als C3u bezeichnet, lagert sich an Faktor B an und wird durch Faktor D gespalten und aktiviert. So kommt es zur Bildung der AP (alternative pathway)-C3-Konvertase. Bei Bindung des löslichen C3b an fremde Zellen wird dieser Mechanismus amplifiziert, bei Bindung an humane Zellen in der Regel reguliert. Dies geschieht durch die Prozessierung von an körpereigene Zellen gebundenem C3b in die inaktiven Abbauprodukte C3c und C3d durch Faktor H und Faktor I (Dunkelberger & Song, 2010; Ricklin et al, 2010; Rodriguez et al, 2015).



#### Abbildung 4: Aktivierungswege des Komplementsystems

Es ist der klassische Weg über Bindung des C1-Komplexes an Immunkomplexe, der Lektin-Weg über Erkennung von PAMPs durch Lektine sowie der alternative Weg, bei dem spontan hydrolysiertes C3b an Faktor B bindet, dargestellt. Opsonine sind blau, Chemotaxine rot und proteolytische Einheiten violett markiert. Abkürzungen: AP = alternative pathway, Fc = crystalisable fragment, MASP = MBL-associated serin protease, MBL = Mannose binding lectine, PAMP = Pathogen associated molecular pattern.

Die C3-Konvertasen aller Initiierungswege katalysieren als gemeinsame Endstrecke die Spaltung von C3 in C3a und C3b. Bei Bindung des Opsonins C3b an die C3-Konvertase entsteht so die C5-Konvertase, welche Faktor C5 aktiviert und in C5a und C5b spaltet. Letzterer lagert sich im Komplex mit C6 und C7 an Zellmembranen an und führt über die Bindung von C8 und C9 im sogenannten Membranangriffskomplex (MAC) zur Bildung einer lytischen Pore. Über den Wassereinstrom kommt es zum Platzen der Zelle und damit zur Eliminierung des Mikroorganismus. Das System unterliegt konstanten Regulationsmechanismen und befindet sich so physiologischerweise in Homöostase (Dunkelberger & Song, 2010; Ricklin et al, 2010). Abbildung 5 skizziert die gemeinsame Endstrecke.



**Abbildung 5: gemeinsame Endstrecke des Komplementsystems**

Die C3-Konvertasen katalysieren die Umsetzung von C3, deren aktive Spaltprodukte aktivieren als C5-Konvertase Faktor C5. C5b bildet daraufhin mit C6-C9 den Membranangriffskomplex, der über Poren in der Zellmembran zur Lyse führt. Abkürzungen: MAC = Membranangriffskomplex.

### 3.5 Ziele der Arbeit

Neue mechanistische Konzepte in der Pathophysiologie inflammatorischer Neuropathien konzentrieren sich besonders auf B-Zell-vermittelte Prozesse und den Ranvier'schen Schnürring (Uncini & Kuwabara, 2015; Uncini et al, 2013). Kürzlich wurden IgG-Autoantikörper vor allem gegen den paranodalen axoglialen Komplex bei Patienten mit CIDP, GBS und MMN identifiziert. Deren Prävalenzen differieren in der Literatur sowohl für die einzelnen Autoantikörper, als auch für die verschiedenen Unterformen inflammatorischer Neuropathien (siehe Kapitel 3.2.2). Die Bedeutung der Subklasse, besonders im Hinblick auf den Pathomechanismus, die Chronifizierung und das Therapieansprechen, ist noch nicht erforscht. Komplementvermittelte Mechanismen, wie sie bei anderen Formen inflammatorischer Neuropathien beschrieben wurden, und deren Beeinflussung durch therapeutische Maßnahmen, wurden bisher nicht berücksichtigt. Mit den Autoantikörpern korrelierte klinische Phänotypen sind bisher nicht eindeutig definiert. In der Routinediagnostik spielen die Antikörper aufgrund unzureichend evaluierter und etablierter Screeningmethoden bisher keine Rolle. Auch die Bedeutung der Autoantikörper sowohl im Hinblick auf klassische Therapien wie IVIG als auch auf neuere, zielgerichtete Therapieformen ist unklar und langfristige Verläufe wurden kaum verfolgt.

Die Ziele dieser Studie sind daher:

1. Die Bestimmung der Prävalenzen und Titer von Autoantikörpern gegen paranodale axogliale Proteine in einer Kohorte von CIDP-, GBS- und MMN-Patienten unter Anwendung verschiedener Detektionsverfahren
2. Die Bestimmung und Analyse der Subklassenzusammensetzung
3. Die Untersuchung der Komplementbindung und -aktivierung durch die Autoantikörper und der Beeinflussung durch IVIG *in vitro*
4. Die Charakterisierung des klinischen Phänotypes und die Evaluation des Therapieansprechens unter Berücksichtigung der experimentellen Daten

## 4. Material und Methoden

Sämtliche Methoden sind in Kurzform in bereits veröffentlichten Studien der neurologischen Klinik und Poliklinik des UKW (Appeltshauser et al, 2017; Doppler et al, 2015a; Doppler et al, 2016; Doppler et al, 2015b), welche während der Arbeit an der Promotion entstanden, beschrieben.

### 4.1 Material

Im Folgenden sind alle für diese Arbeit verwendeten Reagenzien, Materialien, Puffer, Lösungen, Proteine, Antikörper sowie Geräte und Software inklusive Bezeichnung, Produktnummer und Hersteller beziehungsweise Herstellung aufgelistet (Tabelle 10 - Tabelle 18).

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nummer</b>
1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2N)	Fluka® Analytical, Honeywell International Inc, Morristown, USA	35276-1L
Acetone solution 2000 µg/ml	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (DE)	48358
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck KgaA, Darmstadt, DE	A4503-100G
CoverGrip™ Coverslip Sealant	Biotium Inc, Fremont, USA	23005
DAPI	Merck KgaA, Darmstadt, DE	D9542
Fetal Bovine Serum (FBS)	Merck KgaA, Darmstadt, DE	F0804
Goat Serum	Merck KgaA, Darmstadt, DE	G9023
H <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KgaA, Darmstadt, DE	13472-35-0
Human IgG ELISA Kit	AssayPro, St. Charles, USA	E17200-1
Immuno 96 MicroWell™ Feste Platten, Nunc, IDL	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE	456537
Complement component C1q from human serum > 95%	Merck KgaA, Darmstadt, DE	80295-33-6
Mowiol® 4-88 Calbiochem®	Merck KgaA, Darmstadt, DE	475904
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck KgaA, Darmstadt, DE	497-19-8
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KgaA, Darmstadt, DE	10028-24-7
NaCl > 99,8%	Merck KgaA, Darmstadt, DE	31434-1KG-R
NaHCO <sub>3</sub>	Merck KgaA, Darmstadt, DE	144-55-8
PAP pen for immunostaining	Merck KgaA, Darmstadt, DE	Z377821
PFA 95%	Merck KgaA, Darmstadt, DE	30525-89-4
TMB Solution 1x	eBioscience, San Diego, USA	00-4201-56
Triton™ X-100	Merck KgaA, Darmstadt, DE	9002-93-1
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	9127.1
VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI 1.5 µg/ml	Vector Laboratories, Burlingame, USA	H-1200

*Tabelle 10: Reagenzien und Materialien für die Immunhistochemie und ELISA*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellung</b>
0,05M Phosphatpuffer	0,1M Phosphatpuffer wurde 1:1 mit destilliertem H <sub>2</sub> O verdünnt.
0,1M Phosphatpuffer	405 ml 0,2M Stammlösung A und 95ml Stammlösung B wurden gegeneinander auf einen pH = 7,4 titriert und die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1l aufgefüllt.
0,1M Carbonatpuffer	4,2g NaHCO <sub>3</sub> und 1,78g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> wurden in 500ml destilliertem H <sub>2</sub> O gelöst und gegeneinander auf pH = 9,4 titriert.
0,1M PBS	800ml Stammlösung A und 160ml Stammlösung B wurden auf einen pH = 7,4 titriert, 60ml 5M Natriumchlorid hinzugefügt und die Lösung mit destilliertem Wasser auf 2l aufgefüllt.
5M NaCl	146,1g NaCl wurden in destilliertem H <sub>2</sub> O gelöst und auf ein Volumen von 500ml aufgefüllt.
Blockierungslösung (ELISA)	0,1M PBS wurde mit 3,33% BSA und 0,05% Tween® 20 angesetzt.
Blockierungslösung (Zupfnerven)	0,1M PBS wurde mit 4% Goat Serum, 4% FBS und 0,3% Triton™ X-100 angesetzt.
BSA/PBS 10%	1g BSA wurde in 9ml 0,1M PBS gelöst.
BSA/PBS 2%	BSA/PBS 10% wurde 1:4 mit 0,1M PBS verdünnt.
BSA/PBS 1%	BSA/PBS 2% wurde 1:1 mit 0,1M PBS verdünnt.
PFA 4%	4g PFA 95% wurde in 100ml 0,1M Phosphatpuffer gelöst.
Stammlösung A	35,6g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O wurde in 1l destilliertem H <sub>2</sub> O gelöst.
Stammlösung B	31,2g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O wurde in 1l destilliertem H <sub>2</sub> O gelöst.
Waschpuffer (PBS/Tween)	0,1M PBS wurde mit 0,05% Tween®20 angesetzt.

*Tabelle 11: Herstellung von Puffern und Lösungen für immunhistochemische Färbungen und ELISA*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nummer</b>
<u>Primärantikörper</u>		
Anti-Caspr antibody, Rabbit polyclonal to Caspr, reactivity to mouse/rat/human	abcam®, Cambridge, Großbritannien (GB)	ab34151
Anti-Caspr/ paranodin/ neurexin IV, NeuroMab, Host: Mouse, IgG Iso-type IgG1	UC Davis/NIH NeuroMab Facility, Davis, USA	75-001
Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/ rat/ mouse	abcam®, Cambridge, GB	ab105582
Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin	abcam®, Cambridge, GB	ab31457
Human/ Mouse/ Rat Neurofascin Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Chicken IgY	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	AF3235
<u>Sekundärantikörper</u>		
Alexa Fluor 488-AffiniPure Donkey Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	703-545-155
Anti-C1q antibody (FITC), Rabbit polyclonal to C1q (FITC)	abcam®, Cambridge, GB	ab4223
Cy <sup>TM</sup> 2-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	109-225-003
Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	711-165-152
Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	109-165-003
Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	315-165-003
Monoclonal anti-human IgG3-FITC antibody produced in mouse	Merck KgaA, Darmstadt, DE	F4641

Mouse monoclonal [4E3] Secondary Antibody to Human IgG1- hinge heavy chain (FITC)	abcam®, Cambridge, GB	ab99772
Mouse monoclonal HP6014 anti-human IgG2 Fd gamma (FITC)	abcam®, Cambridge, GB	ab99788
Mouse monoclonal HP6025 anti-human IgG4 Fc (FITC)	abcam®, Cambridge, GB	ab99821

*Tabelle 12: Antikörper für immunhistochemische Färbungen*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nummer</b>
<u>Proteine und Komplement</u>		
Complement component C1q from human serum > 95%	Merck KgaA, Darmstadt, DE	80295-33-6
Complement Serum Standard human – aqueous solution	Merck KgaA, Darmstadt, DE	C9473
Full-length human neurofascin 155	(Ng et al., 2012)	nicht kommerziell
Recombinant human CNTN1/Contactin-1	Sino Biological Inc., Beijing, China	10383-H08H
<u>Primärantikörper</u>		
Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/rat/mouse	abcam®, Cambridge, GB	ab105582
Human/ Mouse/ Rat Neurofascin Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Chicken IgY	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	AF3235
<u>Sekundärantikörper</u>		
Anti-Complement C1q Antibody (HRP), polyclonal Sheep IgG	LifeSpan BioSciences, Seattle, USA	LS-C41845
Goat anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	PA1-28798
HRP-conjugated IgG fraction of polyclonal goat antiserum to C3c	Nordic-MUBio, Susteren, Netherlands	GAHu/C3c/PO

fragment of human complement factor C3		
Mouse anti-Human IgG1 Fc Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	A-10648
Mouse anti-Human IgG4 Fc Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	A-10654
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	715-035-150
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab') <sub>2</sub> Fragment Specific	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	109-035-006
Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody to Human IgG2	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	05-0520
Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody to Human IgG3	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	05-3620
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	P 0214

*Tabelle 13: Proteine und Antikörper für ELISA und KBV*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nummer</b>
Ampuwa Steriles pyrogenfreies Aqua	Fresenius Kabi, Sèvres, Frankreich	04801694
CaCl <sub>2</sub>	Merck KgaA, Darmstadt, DE	10043-52-4
CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 75cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich	658 170
D-(+)-Glucose powder, BioReagent	Merck KgaA, Darmstadt, DE	G7021
Deckgläser, rund, 12mm	Novoglas Labortechnik Langenbrinck, Bern, Schweiz	01-0012/1
DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	4720.2

DPBS Dulbecco's PBS	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	14190144
Gibco™ Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	10270106
KCl >99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	6781.1
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	21051040
Minimal essential medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	11090081
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KgaA, Darmstadt, DE	10028-24-7
NaCl > 99,8%	Merck KgaA, Darmstadt, DE	31434-1KG- R
NaOH	Merck KgaA, Darmstadt, DE	1310-73-2
Nucleo Bond® Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel, Düren, DE	740414.10
Nunc™ Zellkultur-Multischalen, 24W	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	142475
Penicillin/ Streptomycin 10000U/ml	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	15140122
Poly-D-Lysine hydrobromide	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	27964-99-4
TE Puffer (100X) pH 8.0	PanReac AppliChem, Illinois Tool Works Inc., Glenview, USA	A0973
Trypan Blue solution 0.4%, liquid	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	T8154
Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	25300054

*Tabelle 14: Reagenzien und Materialien für die Zellkultur*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Herstellung</b>
0,1x TE	TE wurde 1:10.000 in H <sub>2</sub> O verdünnt, steril filtriert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.
2x HBS-Puffer	12mM Glucose aus D-(+)-Glucose- Pulver, 10mM KCl, 280mM NaCl und 1,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O wurden mit NaOH auf pH = 6,95 titriert und steril filtriert. 1ml-Aliquots wurden bei -20°C gelagert.
CaCl <sub>2</sub>	2,5M CaCl <sub>2</sub> wurden in H <sub>2</sub> O auf pH = 7,0 titriert und steril filtriert. 1ml-Aliquots wurden bei -20°C gelagert.
HEK-Medium	5ml L-Glutamin, 5ml Pen/Strep und 50ml steriles, 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviertes Gibco™ FBS wurden auf 500ml mit MEM aufgefüllt und steril filtriert.
PDL	Steriles Poly-D-Lysin Hydrobromid-Pulver wurde mit 50ml destilliertem, sterilem Wasser gelöst und zu je 2ml aliquotiert.

*Tabelle 15: Herstellung von Medien und Puffer für die Zellkultur*

Generell wurden alle Substanzen in der Zellkultur vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Die IVIG-Präparate wurden vom Hersteller aus Plasma menschlicher Spender gewonnen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Nummer</b>
Ig Vena® 50 g/l	Kedrion S.p.A, Barga, Italien	10982369
Privigen® 100 mg/ml	CSL Behring GmbH, Marburg, DE	J1459

*Tabelle 16: verwendete IVIG-Präparate*

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bezeichnung</b>
20x Objektiv Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE	Plan-Apochromat 20x/0,8 Ph2 M27
40x Objektiv Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE	Plan-Apochromat 40x/0,95 Korr Ph3 M27
CO <sub>2</sub> - Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc, Wal- tham, USA	Heracell™ 150i
CoolCell™ FTS30 Freezing container	Merck KgaA, Darmstadt, DE	BCS-170
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE	Axio Imager.M2
Heizplatte	Medax Nagel GmbH, Kiel, DE	SP13
Inversmikroskop	Olympus®, Tokio, Japan	CKX41
Kamera	SPOT Imaging Solutions, Burroughs, USA	Pursuit™ USB 1.4 Mp SLIDER
Konfokalaufsatz	Crestoptics S.p.A., Rom, Italien	X-Light Confocal Imager
Multiscan EX Elisa Reader	Thermo Fisher Scientific Inc, Wal- tham, USA	51118177
Stereomikroskop und Objektiv	Zeiss, Oberkochen, DE	Stemi2000 450043
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Inc, Wal- tham, USA	Herasafe™ KS
Stickstofftank	Messer Group, Bad Soden am Taunus, DE	Chronos
Wasserbad	Memmert GmbH + Co.KG, Schwab- ach, DE	WNB Basic
Zentrifuge	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE	Rotanta 460R
Zentrifuge	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE	ROTOFIX 32A

*Tabelle 17: verwendete Geräte*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Version</b>
EndNote™	Thomson Reuters, NY, USA	X7.7.1
Genesis Lite	Labsystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	2.16
ImageJ	National Institutes of Health, USA	1.49b
Microsoft® Office™ 2016	Microsoft Corporation, Redmond WA, USA	2016
SPSS 23.0	IBM Corporation, Armonk NY, USA	23.0
VisiView®	Visitron Systems, Puchheim, DE	2.1.1

*Tabelle 18: verwendete Software*

## 4.2 Patienten und Kontrollen

Es wurden im Zeitraum von Oktober 2013 bis Dezember 2014 pro- und retrospektiv insgesamt 150 Patienten mit inflammatorischen Polyneuropathien, 60 gesunde Kontrollpersonen und 14 an weiteren autoimmun vermittelten neurologischen Erkrankungen erkrankte Kontrollpersonen (im Folgenden bezeichnet als „erkrankte Kontrollen“) für die Studie rekrutiert. Alle Teilnehmer der Studie wurden mündlich und schriftlich aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Die retrospektiv rekrutierten Patienten und Kontrollpersonen hatten in vorherigen Studien ihr Einverständnis zur Weiterverwendung des archivierten Materials für wissenschaftliche Zwecke erteilt. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg befürwortet (Nr. 278/13).

### 4.2.1 Fallzahlberechnung

Die Prävalenz von Autoantikörpern gegen paranodale Proteine schwankt in der Literatur deutlich und liegt für Anti-Contactin-1 bei 2,4-16% bei CIDP-Patienten und 4-25% bei GBS-Patienten, für Anti-Neurofascin-155 bei 4-18% bei CIDP-Patienten und 4-15% bei GBS-Patienten (Devaux et al, 2012; Kawamura et al, 2013; Miura et al, 2015; Ng et al, 2012; Ogata et al, 2015; Querol et al, 2014; Querol et

al, 2013a). Bei MMN-Patienten wurden Autoantikörper gegen paranodale Proteine bisher nicht beschrieben, Autoantikörper gegen nodale Proteine wurden allerdings mit einer Prävalenz von 62% angegeben (Notturmo et al, 2014). Da kein statistisch signifikanter Unterschied erreicht werden muss, sondern als vorrangiges Ziel die absolute Detektion von Autoantikörpern im Mittelpunkt der Studie steht, sollten zur Detektion von mindestens zwei Patienten pro Antikörpergruppe unter Berücksichtigung der angegebenen größten und kleinsten Prävalenz 11-84 CIDP-Patienten, 8-50 GBS-Patienten und 4 Patienten mit MMN untersucht werden. Letztere Zahl wurde auf 24 Patienten erhöht, da die angegebene Prävalenz (Notturmo et al, 2014) nicht für paranodale Autoantikörper beschrieben ist und nicht durch weitere Studien verifiziert wurde. Die Kohorte der CIDP-Patienten wurde nach Erreichen der Fallzahl weiterhin vergrößert, da das Ziel von zwei Patienten pro Antikörpergruppe noch nicht erreicht war.

#### 4.2.2 Patienten

In die Studie wurden 105 Patienten (25 Frauen, 80 Männer) mit der Diagnose CIDP nach INCAT-Diagnosekriterien (Hughes et al, 2001), 21 Patienten (6 Frauen, 15 Männer) mit GBS nach „Level 1“ der Brighton-Diagnosekriterien (Sejvar et al, 2011) sowie 24 Patienten (7 Frauen, 17 Männer) mit „definitiver MMN“ nach EFNS-Diagnosekriterien (Van Schaik et al, 2010) zum Zeitpunkt der Rekrutierung eingeschlossen. Der Altersmedian betrug 61 Jahre (18-83 Jahre) bei den Patienten mit CIDP, 59 Jahre (38-86 Jahre) bei den Patienten mit GBS und 57 Jahre (33-76 Jahre) bei den Patienten mit MMN. Die Krankheitsdauer bis zur Entnahme des Materials variierte bei den CIDP-Patienten von vier Monaten bis zu 31 Jahren, bei den GBS-Patienten von einer Woche bis zu zwei Monaten und bei den MMN-Patienten von zwei Monaten bis zu 33 Jahren. Im Durchschnitt lag diese bei 86 Monaten (CIDP), 0,5 Monaten (GBS) und 125 Monaten (MMN). Die Patienten mit Nachweis von paranodalen Autoantikörpern wurden chronologisch in Reihenfolge der Detektion der Antikörper als Patient 1-6 pseudonymisiert. Zur Vereinfachung wurde das Geschlecht bei dieser Benennung nicht berücksichtigt. Tabelle 19 gibt einen Überblick über deren klinische Daten.

	<b>Patient 1</b>	<b>Patient 2</b>	<b>Patient 3</b>	<b>Patient 4</b>	<b>Patient 5</b>	<b>Patient 6</b>
Geschlecht	m	m	w	m	m	w
Alter	76	68	62	72	31	69
Krankheitsdauer in Monaten	1	252	20	1	15	0,25
Erkrankung	CIDP	CIDP	CIDP	CIDP	CIDP	GBS
paranodale Autoantikörper	Anti- CNTN1	Anti- CNTN1	Anti- CNTN1	Anti- CNTN1	Anti- Caspr	Anti- Caspr
Material	Serum PE	- PE	Serum PE	- PE	Serum -	- PE

**Tabelle 19: klinische Daten der antikörperpositiven Patienten**

Alter und Krankheitsdauer sind jeweils bei der Rekrutierung angegeben. Abkürzungen: CIDP = chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, CNTN1 = Contactin-1, GBS = Guillain-Barré-Syndrom, m = männlich, PE = Plasmapheresematerial, w = weiblich.

### 4.2.3 Kontrollen

Es wurde Serum von 60 gesunden Kontrollpersonen (28 Frauen, 32 Männer, Altersmedian 54 Jahre, Streubreite 22-82 Jahre) gewonnen. Anamnestisch wurden neurologische Erkrankungen ausgeschlossen. Des Weiteren diente das Serum von zehn Patienten (sieben Frauen, drei Männer, Altersmedian 57, Streubreite 34-78 Jahre) sowie das Plasmapherese-Material (PE-Material) von vier Patienten (vier Männer, Altersmedian 59 Jahre, Streubreite 24-78 Jahre) mit anderen autoimmun vermittelten neurologischen Erkrankungen (sieben Patienten mit MS, vier Patienten mit Myasthenia gravis, drei Patienten mit anderen immunvermittelten Neuropathien) als „erkrankte Kontrolle“.

### 4.2.4 Probengewinnung

Von den prospektiv rekrutierten Patienten und Kontrollen wurde Serum im Rahmen eines stationären oder ambulanten Aufenthaltes im Universitätsklinikum Würzburg (70 Patienten), Gießen (30 Patienten) oder im Caritas-Krankenhaus

Bad Mergentheim (zwei Patienten) entnommen und nach fünfminütiger Zentrifugation bei 5000U/min in der Rotanta 460R-Zentrifuge aliquotiert und bei -20°C kryokonserviert. Plasmafiltrat von Patienten mit Indikation zur therapeutischen Plasmapheresebehandlung im UKW wurde ebenfalls bei -20°C kryokonserviert. Bei Patienten mit paranodalen Antikörpern sowie einem Patienten mit inflammatorischer Polyneuropathie ohne Autoantikörper wurde aufgereinigtes IgG-Material über etablierte Verfahren der neurologischen Klinik über Ionenaustauschchromatographie (Buchwald et al, 1998; Geis et al, 2012; Sommer et al, 2005b) aus dem Plasmafiltrat gewonnen. Retrospektiv wurde zur Erhöhung der Fallzahl zusätzlich auf bereits archiviertes Serum und PE-Material aus vorherigen Studien an der neurologischen Klinik des UKW ab dem Jahr 2005 zurückgegriffen. Es stand so insgesamt das Serum von 86 Patienten mit CIDP, 10 Patienten mit GBS und 24 Patienten mit MMN sowie das PE-Material von 23 Patienten mit CIDP und 11 Patienten mit GBS für die Versuche zur Verfügung. Das Material wurde chronologisch pseudonymisiert.

#### 4.2.5 Erhebung klinischer Daten

Die klinischen Daten wurden retrospektiv nach Abschluss der Diagnostik aus Arztbriefen der Neurologischen Klinik des UKW, Laboruntersuchungen und Ergebnissen elektrophysiologischer Untersuchungen gewonnen. Daten extern rekrutierter Patienten wurden pseudonymisiert zugesandt. Die relevanten Patientendaten wurden in einer *Excel*-Tabelle dokumentiert, diese diente zur Überprüfung der Diagnosekriterien der jeweiligen Erkrankung. Patienten, die diese nicht erfüllten, wurden ausgeschlossen. Im Rahmen der Follow-Up-Untersuchungen der Patienten mit paranodalen Autoantikörpern wurde eine ausführliche Anamnese und klinisch-neurologische Untersuchung durchgeführt sowie der Befund gegebenenfalls unter Einverständnis des Patienten videodokumentiert. Bei der Anti-Contactin-1-positiven Patientin (Patient 3) wurde zusätzlich eine Tremoranalyse durchgeführt.

## 4.2.6 Statistik und Graphiken

Die deskriptive Statistik wurde mittels *Microsoft Excel* berechnet. Diagramme und Graphiken wurden mittels *Excel* und *SPSS 23.0* erstellt (siehe Tabelle 18).

## 4.3 Bindungsversuche an Zupfnervenpräparaten

Die Morphologie des Schnürringes ist bei Vertebraten ähnlich und die Bestandteile des paranodalen Komplexes Contactin-1/ Caspr/ Neurofascin-155 zeigen bei Nagetieren und beim Menschen zu über 90% identische Aminosäuresequenzen (Menegoz et al, 1997; Peles et al, 1997), daher eignen sich Präparate muriner Zupfnerven zur Testung humanen Materials auf Autoantikörper gegen paranodale Strukturen.

### 4.3.1 Präparation und Vorbereitung von Zupfnerven

Weibliche adulte C57BL/6 Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Ischiasnerven wurden entnommen, 10 Minuten in 4% PFA vorfixiert und in 0,1M Phosphatpuffer überführt. Auf einem Objektträger wurde der Nerv anschließend in 0,05M Phosphatpuffer mit Pinzetten vom Epi- und Perineurium befreit und kleine Faszikel entnommen. Diese wurden so gezupft, dass einzelne Axone unter dem Mikroskop sichtbar waren. Anschließend wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und am nächsten Tag für die immunhistochemische Färbung verwendet oder bei -20°C kryokonserviert.

### 4.3.2 Immunhistochemische Färbung

Mittels immunhistochemischer Färbung wird die Visualisierung einer Antigen-Antikörperbindung über Fluoreszenzmikroskopie möglich. Im ersten Schritt bindet der gesuchte Primärantikörper spezifisch an ein fixiertes Antigen. Im zweiten Schritt wird ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper benutzt, welcher an das Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet und so die Detektion von Antikörpern sowie die Einschätzung topischer Zusammenhänge fluoreszenzmikroskopisch ermöglicht. Über Doppelfärbungen und Kollokalisationsstudien mit speziellen bekannten Antikörpern können mögliche Zielstrukturen identifiziert werden.

Alle Reagenzien und Puffer für die immunhistochemische Färbung an Zupfnerve sind in Tabelle 10 und Tabelle 11, die verwendeten Antikörper in Tabelle 12, Geräte und Software in Tabelle 17 und Tabelle 18 aufgeführt. Nach Beschriftung wurden die Objektträger (OT) für 10 Minuten in Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert und auf einer Heizplatte bei  $38^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Die Zupfnerve wurden auf dem Objektträger mit einem *PAP pen for immunostaining* umrandet und mit 0,1M PBS gewaschen. Anschließend wurden durch Inkubation mit Blockierungslösung (Zupfnerve) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer unspezifische Bindungen minimiert. Nach Abtropfen wurde der in Blockierungslösung verdünnte Primärantikörper, als Negativkontrolle auf einem separaten Objektträger Blockierungslösung und als Kontrollfärbung separat das in Blockierungslösung verdünnte Serum einer gesunden Kontrolle aufgebracht und über Nacht bei  $+4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am Folgetag wurden die OT dreimal in 0,1M PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem korrespondierenden Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in 0,1M PBS wurden die OT mit *VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI 1.5  $\mu\text{g/ml}$*  eingedeckelt und mit *CoverGrip™ Coverslip Sealant* versiegelt. Die Beurteilung erfolgte nach Trocknung verblindet. Die Negativkontrolle mit Serum einer gesunden Kontrolle wurde als Referenz unspezifischer Bindung für die Beurteilung der Objektträger am *Axiolmager.M2*-Mikroskop genutzt.

#### 4.3.2.1 Einzelfärbungen und Subklassenanalyse

Als Primärantikörper wurde Patientenserum beziehungsweise PE-Material sowie Serum einer gesunden Kontrolle jeweils 1:100 und 1:500 verdünnt verwendet. *Anti-Caspr antibody, Rabbit polyclonal to Caspr, reactivity to mouse/rat/human* 1:1000 und *Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin* 1:400 wurden separat als Positivkontrolle für paranodale Bindung verwendet. Als Sekundärantikörper dienten Cy<sup>TM</sup>3-konjugierte *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)* und *AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)*-Antikörper 1:100. Bei jeder Charge diente jeweils ein anderes Serum einer gesunden Kontrolle als Referenz, sodass insgesamt das Material aller Patienten und Kontrollen untersucht wurde. In unklaren Fällen wurde die Färbung wiederholt. Bei den Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-3) und Anti-Caspr-positiven Patienten (Patient 5 und 6) sowie jeweils beim Serum einer gesunden Kontrolle als Negativkontrolle wurden separat subklassenspezifische, FITC-markierte Sekundärantikörper *Mouse monoclonal [4E3] Secondary Antibody to Human IgG1- hinge heavy chain*, *Mouse monoclonal HP6014 anti-human IgG2 Fd gamma*, *Monoclonal anti-human IgG3-FITC antibody produced in mouse* und *Mouse monoclonal HP6025 anti-human IgG4 Fc* 1:200 in Blockierungslösung verwendet.

#### 4.3.2.2 Doppelfärbungen mit Anti-Caspr und Anti-Neurofascin

Bei Patienten, die ein auffälliges Muster am Paranodium in der Einzelfärbung zeigten, wurde eine Doppelfärbung durchgeführt. Dabei wurde der Primärantikörper mit den Antikörpern *Anti-Caspr antibody, Rabbit polyclonal to Caspr, reactivity to mouse/rat/human* 1:1000 beziehungsweise *Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin* 1:400 koinkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Cy<sup>TM</sup>2-konjugierte *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)* und Cy<sup>TM</sup>3-konjugierte *AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)*-Antikörper. Kolokalisation wurde über *VisiView®* und *ImageJ* bestimmt.

### 4.3.3 Präabsorptionsversuche mittels transfizierter HEK-293-Zellen

Ziel der Präinkubationsversuche ist die indirekte Identifikation von paranodalen Autoantikörpern. Durch Präinkubation mit einem speziellen Antigen wird das Patientenmaterial von Antikörpern gegen dieses Antigen spezifisch befreit. Zeigt sich an der Zupfnervenfärbung nach Präinkubation mit GFP oder anderen Antigenen, nicht jedoch bei Präinkubation mit dem Ziel-Antigen, eine paranodale Bindung, ist vom Vorliegen von Autoantikörpern gegen diese Struktur auszugehen.

HEK-293-Zellen wurden wie in Kapitel 4.6 beschrieben kulturell angezchtet, auf *Nunc™ Zellkultur-Multischalen, 24 Wells* ausgesät und mit Contactin-1 und Caspr transfiziert. Als Negativkontrolle wurden GFP-transfizierte HEK-293-Zellen verwendet. Das Serum/PE-Material von Patienten mit Verdacht auf paranodale Autoantikörper sowie Serum einer gesunden Kontrolle wurde je 1:500 und 1:1000 in Blockierungslösung (Zupfnerven) verdünnt und mit vorher 20 Minuten in 4% PFA fixierten, Contactin-1-transfizierten Zellen oder nicht fixierten Caspr-transfizierten Zellen seriell in drei Wells je eine Stunde bei Raumtemperatur präinkubiert. Im Anschluss wurde das Material entnommen und eine Einzelfärbung an Zupfnerven wie in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben durchgeführt. Als Referenz für die Beurteilung dienten jeweils parallel nicht präinkubierte sowie auf GFP- oder Contactin-1-transfizierten Zellen präinkubierte Proben des jeweiligen Materials.

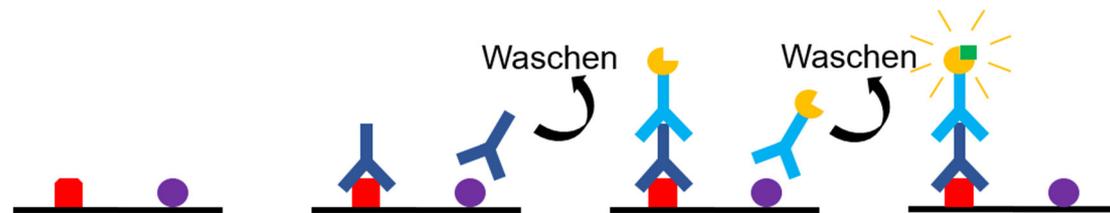
## 4.4 ELISA

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ermöglicht den immunologischen Nachweis von gegen spezifische Antigene gerichteten Antikörpern über eine Enzymreaktion (Engvall & Perlmann, 1971). Zur Detektion paranodaler IgG-Antikörper gegen Contactin-1 und Neurofascin-155 wurden ELISAs etabliert und alle in die Studie eingeschlossenen Patienten und Kontrollen in einem Screeningverfahren getestet. Die Etablierung eines ELISA zur Detektion von Antikörpern gegen das paranodale Protein Caspr gelang aufgrund methodischer Limitationen

nicht. Die für den ELISA verwendeten Reagenzien und Puffer sind in Tabelle 10 und Tabelle 11, Proteine und Antikörper in Tabelle 13 und IVIG in Tabelle 16 aufgeführt. Es wurden nicht sterile, MaxiSorp-beschichtete *Immuno 96 MicroWell™ Feste Platten, Nunc, IDL* mit dem paranodalen Ziel-Antigen bei 4°C über Nacht beschichtet; als Negativkontrolle wurde ein Duplet unbeschichtet belassen. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde eine Stunde mit je 200 µl Blockierungslösung (ELISA) zur Vermeidung unspezifischer Bindung inkubiert. Zwischen jedem folgenden Schritt wurde nun, soweit nicht anders vermerkt, viermal mit Waschpuffer (PBS/Tween) gewaschen, überschüssiger Waschpuffer durch sanftes Klopfen beseitigt und so nicht gebundene Substanzen entfernt. Als Primärantikörper wurde Serum oder PE-Material der Patienten und Kontrollen verdünnt in Blockierungslösung (ELISA) sowie auf jeder Platte eine Negativkontrolle nur mit Blockierungslösung und eine Positivkontrolle mit dem kommerziell erworbenen Antikörper eine Stunde bei 37°C unter Agitation inkubiert. Spezifische, gebundene IgG-Antikörper wurden über einen passenden Sekundärantikörper, der an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, detektiert. Dazu wurden im Anschluss 100 µl des in Blockierungslösung (ELISA) verdünnten Sekundärantikörpers 30 Minuten bei 37°C unter Agitation inkubiert. Als chromogenes Substrat diente 100 µl *TMB Solution 1x* pro Well, die im Dunkeln inkubiert wurde. Die Meerrettichperoxidase oxidiert das Substrat TMB, es entsteht so ein unlöslicher, blauer Farbstoff. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 1M Schwefelsäure  $H_2SO_4$  (2N) nach genau 15 Minuten ohne vorherigen Waschschrift gestoppt. Es kommt so zur Bildung eines gelben Farbkomplexes (Martin et al, 1984; Nakane & Kawaoi, 1974). Die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450$  nm wurde im *Multiscan EX Elisa Reader* bestimmt. Eine Kalibrierung über eine Standardreihe zur quantitativen Analyse war nicht möglich. Es wurde daher der Mittelwert der OD aller Kontrollen gebildet und als Schwellenwert für ein positives Ergebnis die fünffache Standardabweichung des Mittelwertes festgesetzt. Das Prinzip eines Antigen-basierten ELISAs ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

### Legende

Zielantigen	Sekundärantikörper
Fremdantigen	Meerrettichperoxidase
Primärantikörper	chromogenes Substrat



**Abbildung 6: Prinzip des ELISAs**

Der Primärantikörper (dunkelblau) bindet spezifisch an ein gebundenes Zielantigen (rot), überflüssige Antikörper werden durch Waschschritte entfernt. Ein mit Meerrettichperoxidase (gelb) gekoppelter Sekundärantikörper (hellblau) erkennt die Fc-Region des Primärantikörpers. Die Menge des gebundenen Sekundärantikörpers wird anschließend über Messung der OD bei Hinzugabe eines chromogenen Substrates (grün) und konsekutiver Farbreaktion quantifiziert.

Zur Minimierung von Pipettierfehlern wurden in allen folgenden ELISAs und ELISA-basierten Komplementversuchen Wells in Duplets beschichtet und bei der Auswertung mittels *Excel* jeweils der Mittelwert gebildet. Von diesem wurde der Mittelwert des Duplets der Negativkontrolle (Verwendung von Blockierungslösung an Stelle eines Primärantikörpers, siehe oben) subtrahiert, um unspezifischen Hintergrund in der Auswertung zu minimieren. Rechnerisch so möglicherweise entstandene negative Werte wurden auf 0 zurückgesetzt.

#### 4.4.1 Neurofascin-155-ELISA

Die 96-Well-Platte wurde mit 100  $\mu$ l *Full-length human neurofascin 155* (Ng et al, 2012) pro Well in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml in PBS beschichtet. Als Primärantikörper dienten Serum und PE-Material in einer Verdünnung von 1:100 sowie als Positivkontrolle *Human/Mouse/Rat Neurofascin Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Chicken IgY* 1:5000 in Blockierungslösung (ELISA). Als Sekundärantikörper wurden HRP-konjugierte *Goat anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody* und *Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP* Antikörper je 1:10.000 in Blockierungslösung (ELISA) verwendet. Das restliche Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

#### 4.4.2 Contactin-1-ELISA

Die 96-Well-Platte wurde mit 100 µl *Recombinant human CNTN1/ Contactin-1* pro Well in einer Konzentration von 2 µg/ml in 0,1M Carbonatpuffer beschichtet. Als Primärantikörper dienten Serum und PE-Material 1:100 sowie als Positivkontrolle *Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/rat/mouse* 1:200 in Blockierungslösung (ELISA). Als Sekundärantikörper wurden HRP-konjugierte *AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG* 1:1000 und *Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP* 1:10.000 in Blockierungslösung (ELISA) verwendet. Das restliche Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

##### 4.4.2.1 Titerbestimmung bei positiven Patienten

Bei den vier Patienten, deren OD über dem Schwellenwert lag, wurde der Titer der Anti-Contactin-1-Antikörper jeweils in unterschiedlichen Serumproben und/oder PE-Material bestimmt. Dazu wurde jeweils eine Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:50.000 in Blockierungslösung (ELISA) angelegt. Als Negativkontrolle wurde das Serum einer Normalkontrolle ebenfalls entsprechend verdünnt. Die Verdünnung, deren OD als Letzte über dem Schwellenwert lag, wurde als Titer festgesetzt.

##### 4.4.2.2 Bestimmung der IgG-Subklassen

Zur Bestimmung der IgG-Subklassen wurde ein ELISA nach Protokoll wie in Kapitel 4.4 und 4.4.2 beschrieben durchgeführt, allerdings wurden subklassenspezifische Sekundärantikörper verwendet. Diese wurden in Verdünnungsreihen mit Blockierungslösung (ELISA) als Primärantikörper getestet und als optimale Verdünnung diejenige gewählt, bei der alle Subklassenantikörper eine ähnliche OD für die Negativkontrolle aufwiesen. Als Primärantikörper wurden Serum und PE-Material von Patient 1-4, als Negativkontrolle das Serum einer gesunden Kontrolle 1:100 in Blockierungslösung (ELISA) verdünnt. Es wurden HRP-konjugierte *Peroxidase-Mouse Monoclonal Anti-Human IgG1 Fc* 1:1000, *anti-IgG2*

1:4000, *anti-IgG3* 1:3000 und *anti-IgG4 Fc* 1:2000 verwendet. In einem separaten Versuch wurde PE-Material von Patient 1-3 in Verdünnungen entsprechend dem C1q-Komplementbindungsversuch, also 1:20 für Patient 1 und 3 sowie 1:8,6 für Patient 2 verwendet. So wurden die Subklassen bei jeweils gleicher Konzentration von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern in den unterschiedlichen Patientenproben ermittelt (siehe 4.4.2.3). Es diente jeweils das PE-Material einer „erkrankten Kontrolle“ in einer Verdünnung von 1:20 und 1:8,6 als Negativkontrolle. Die subklassenspezifischen Sekundärantikörper wurden 1:5000 (IgG1, IgG4), 1:10.000 (IgG3) und 1:15.000 (IgG2) verdünnt.

#### 4.4.2.3 Anpassung des Anti-Contactin-1-Gehalts durch Berechnung unterschiedlicher Verdünnungen

Um Proben mit vergleichbarer Menge von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern bei Anti-Contactin-1-positiven Patientenproben mit unterschiedlichen Titern für die Komplementbindungs- und -aktivierungsversuche zu erhalten, wurden Verhältnisse und optimale Verdünnungen rechnerisch ermittelt. Das Material von Patient 1, 2 und 3 wurde, je 1:1000, 1:1500 und 1:2000 verdünnt, als Primärantikörper in einem ELISA nach obig beschriebenem Protokoll verwendet (siehe Tabelle 20, Zeile A, Spalte 1-3). Das Verhältnis des OD-Gehalts der einzelnen Patienten bei jeder Verdünnung wurde bestimmt und jeweils der Mittelwert gebildet (siehe Tabelle 20, Zeile A, Spalte 3-6). Rechnerisch wurde die Verdünnung an das jeweilige Verhältnis angepasst. Bei Patient 1 und 3 war keine Anpassung aufgrund von ähnlichen Konzentrationen und Verhältnissen nötig, bei Patient 2 erfolgte die Anpassung um den Faktor 2,3 (siehe Tabelle 20, Zeile B und C).

		1	2	3	4	5	6
		Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 1: Patient 2	Patient 1: Patient 3	Patient 3: Patient 2
<b>A</b>	<b>OD IgG-ELISA</b>						
	1:1000	2,443	1,036	2,517	2,358	0,980	2,430
	1:1500	1,826	0,800	1,863	2,284	0,971	2,440
	1:2000	1,433	0,612	1,319	2,342	1,086	2,155
	<b>Mittelwert</b>				<b>2,328</b>	<b>1,012</b>	<b>2,305</b>
<b>B</b>	<b>Verdünnung ELISA (x2,3)</b>	<b>1:100</b>	<b>1:43</b>	<b>1:100</b>			
<b>C</b>	<b>Verdünnung C1q-KBV (x2,3)</b>	<b>1:20</b>	<b>1:8,6</b>	<b>1:20</b>			

**Tabelle 20: Anpassung des Anti-Contactin-1-Gehalts für den C1q-KBV**

Die OD des ELISAs ist in Zeile A, Spalte 1-3, die Berechnung von Verhältnissen in Spalte 4-6, die konsequente Endverdünnung für den ELISA in Zeile B und für den KBV mit C1q in Zeile C dargestellt. Abkürzungen: ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IgG = Immunglobulin G, KBV = Komplementbindungsversuch, OD = optische Dichte.

Für den C3c-Komplementaktivierungsversuch (KAV) wurde der Gesamt-IgG Gehalt der Patientenproben für Patient 2 und 3 mittels *Human IgG ELISA-Kit* nach Protokoll des Herstellers bestimmt (siehe Tabelle 21 Zeile A). Auf die Bestimmung bei Patient 1 konnte bei annähernd gleichen Titern und Verhältnissen zwischen Patient 1 und 3 (siehe Tabelle 20, Zeile A) verzichtet werden. Analog zur Berechnung für den C1q-Komplementaktivierungsversuch und ELISA (siehe Tabelle 20) wurde die Konzentration des aufgereinigten IgGs, welche bei den für den C1q-KBV ermittelten Verdünnungen vorliegt, berechnet und zueinander ins Verhältnis gesetzt (siehe Tabelle 21 Zeile A und B). Die Verdünnung des aufgereinigten IgG-Materials (Originalkonzentration 100 mg/ml) wurde um den Faktor 3,51 bei Patient 2 angepasst. Die Endkonzentration des aufgereinigten IgG-Materials betrug somit 2,5 mg/ml bei Patient 3 sowie 8,77 mg/ml bei Patient 2 (siehe Tabelle 21, Zeile C und D). Bei dieser Konzentration lag rechnerisch nun jeweils der gleiche Gehalt an Anti-Contactin-1-IgG vor.

		<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		Patient 2	Patient 3	Patient 2: Patient 3
<b>A</b>	<b>IgG-Gehalt</b> Total (mg/ml) Verdünnung C1q KBV (µg/ml)	9,65 1122,1	6,39 319,5	
<b>B</b>	<b>Verhältnis</b> Verdünnung C1q KBV (µg/ml)			<b>3,51</b>
<b>C</b>	<b>Verdünnung C3c-KAV (x3,51)</b>	<b>1:11,4</b>	<b>1:40</b>	
<b>D</b>	<b>Endkonzentration</b> aufgereinigtes IgG- Material (mg/ml)	8,77	2,5	

**Tabelle 21: Anpassung des Anti-Contactin-1-Gehalts für den C3c-KAV**

Der Gesamt-IgG-Gehalt für Patient 2 und 3 ist in Zeile A, das Verhältnis in Zeile B und die konsekutive Verdünnung in Zeile C mit Endkonzentration in Zeile D dargestellt. Abkürzungen: IgG = Immunglobulin G, KAV = Komplementaktivierungsversuch.

Zur Verifizierung der Berechnungen wurde ein Anti-Contactin-1-ELISA mit den berechneten Verdünnungen in Duplets durchgeführt (siehe Tabelle 22, Spalte 1-3) und das Verhältnis der OD der einzelnen Patienten zueinander berechnet (siehe Tabelle 22, Spalten 4-6). Das optimale Verhältnis bei gleichem Anti-Contactin-1-Gehalt beträgt 1,00. Dieses wurde gerundet für jeden Patienten erreicht (siehe Tabelle 22, Spalten 4-6) und die Methode somit verifiziert.

		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
	<b>OD IgG-ELISA</b>	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 1: Patient 2	Patient 1: Patient 3	Patient 3: Patient 2
<b>A</b>	<b>PE-Material</b> Verdünnung C1q-KBV	3,107	3,159	3,187	<b>0,984</b>	<b>0,975</b>	<b>1,009</b>
<b>B</b>	<b>IgG</b> Verdünnung C3c-KAV	3,193	3,126	3,207	<b>1,021</b>	<b>0,996</b>	<b>1,026</b>

**Tabelle 22: Verifizierung der Berechnung für C1q-KBV und C3c-KAV mittels ELISA**

Die optische Dichte (OD) der einzelnen Patienten, jeweils für das PE-Material (Zeile A) und das aufgereinigte IgG-Material (Zeile B), ist in Spalte 1-3, das Verhältnis der Patienten zueinander in Spalte 4-6 dargestellt. Abkürzungen: ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay, IgG = Immunglobulin G, KAV = Komplementaktivierungsversuch, KBV = Komplementbindungsversuch, OD = optische Dichte, PE = Plasmapherese.

#### 4.4.2.4 Contactin-1-ELISA unter Zugabe von IVIG

Der Effekt von IVIG auf die Bindung der Anti-Contactin-1-Autoantikörper an Contactin-1 konnte mittels ELISA *in vitro* untersucht werden. Ein Contactin-1-ELISA wurde dazu wie in Kapitel 4.4 beschrieben durchgeführt. Die Beschichtung erfolgte mit 100 µl *recombinant human CNTN1/ Contactin-1* pro Well in einer Konzentration von 2 µg/ml in 0,1M Carbonatpuffer. Als Primärantikörper wurde PE-Material in einer Verdünnung von 1:100 für Patient 1 und 3 sowie 1:43 für Patient 2 (siehe Tabelle 20) in Blockierungslösung (ELISA) sowie als Negativkontrolle PE-Material einer „erkrankten Kontrolle“ mit immunvermittelter, inflammatorischer Neuropathie ohne Anti-Contactin-1-Autoantikörper 1:100 sowie 1:43 verwendet. Zusätzlich wurden die Primärantikörper mit den IVIG-Präparaten *Ig Vena® 50 g/l* und *Privigen® 100 mg/ml* und als Negativkontrolle separat mit *Bovine Serum Albumin (BSA)* in einer Konzentration von 0,2-25 mg/ml koinkubiert. Diese gewählten Konzentrationen entsprechen dem Anstieg des IgG-Gehalts nach IVIG-Gabe bei Patienten (vergleiche Kapitel 3.1.6.2.1). Als Sekundärantikörper diente der 1:150.000 in Blockierungslösung (ELISA) verdünnte, HRP-konjugierte *AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab')<sub>2</sub> Fragment Specific*. Die OD von Patient 1-3 bei Koinkubation mit IVIG/BSA bei jeder Verdünnung ( $c = 0,2-25$  mg/ml) wurde ins Verhältnis zur OD von Patient 1-3 bei Koinkubation ohne IVIG/BSA ( $c = 0$  mg/ml) gesetzt. Die Mittelwerte dieses Verhältnisses der drei Patienten wurden mit Standardabweichung berechnet und in einem *Excel*-Diagramm gegen die jeweilige Konzentration separat für die beiden IVIG-Präparate sowie für die Kontrolle mit BSA aufgetragen. Zur Untersuchung eines möglichen verdrängenden Effektes von IVIG auf die Antigen-Antikörperbindung wurden die IVIG-Präparate oder BSA nicht mit, sondern nach der Inkubation des Primärantikörpers in einem zusätzlichen Schritt für 30 Minuten inkubiert und wieder ausgewaschen, das restliche Vorgehen erfolgte wie oben beschrieben.

#### 4.4.3 ELISA zur Bestimmung des Gesamt-IgG-Gehalts bei Patienten und Kontrollen

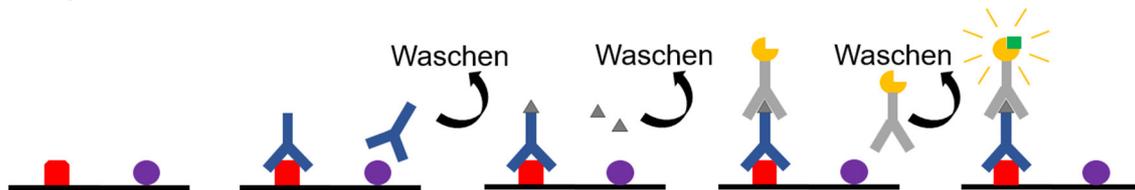
Der Gesamt-IgG Gehalt der Seren aller gesunden Kontrollen sowie des PE-Materials aller in die Studie aufgenommenen Personen (23 CIDP-Patienten, 11 GBS-Patienten, 4 „erkrankte Kontrollen“) wurde mittels *Human IgG ELISA Kit* nach Protokoll des Herstellers bestimmt. Ebenfalls wurde dieser bei den Contactin-1- und Anti-Caspr-positiven Patienten im PE-Material (Patient 1, 2, 3, 4, 6) und soweit verfügbar im Serum (Patient 1, 3, 5) bestimmt.

#### 4.5 ELISA-basierte Komplementbindungsversuche

Bei Patienten mit Anti-Contactin-1-Autoantikörpern mit hohen Titern (Patient 1-3) wurde das Komplementbindungs- und -aktivierungsverhalten *in vitro* untersucht. Dazu wurde ein modifizierter ELISA verwendet. Die für die ELISA-basierten Komplementbindungsversuche verwendeten Reagenzien und Puffer sind in Tabelle 10 und Tabelle 11, Proteine und Antikörper in Tabelle 13 und die IVIG-Präparate in Tabelle 16 aufgeführt. Die Beschichtung von *MaxiSorp Immuno 96 MicroWell™ Feste Platten, Nunc, IDL* mit Contactin-1 erfolgte wie in Kapitel 4.4 und 4.4.2 beschrieben. Die Anti-Contactin-1-Autoantikörper der positiven Patienten wurden nach Blockierung unspezifischer Bindung mittels Inkubation mit Blockierungslösung (ELISA) für zwei Stunden bei 37°C unter Agitation analog zum ELISA an das Zielprotein Contactin-1 gebunden und nicht gebundenes Material durch Waschschrte mit Waschpuffer (PBS/Tween) entfernt. Die Waschschrte wurden, soweit nicht anders vermerkt, zwischen jedem weiteren Schritt sechsmal durchgeführt und überschüssiger Waschpuffer durch sanftes Klopfen entfernt. Im Anschluss wurden Komplementfaktoren in die Wells gegeben und inkubiert. An die Primärantikörper gebundenes Komplement wurde über einen korrespondierenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper markiert und mittels Farbreaktion des chromogenen Substrates TMB und Messung der optischen Dichte detektiert (vergleiche 4.4). Das Prinzip des ELISA-basierten Komplementbindungsversuches ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

#### Legende

Zielantigen  
Fremdantigen  
Primärantikörper  
Komplement  
Sekundärantikörper  
Meerrettichperoxidase  
chromogenes Substrat



**Abbildung 7: Prinzip des ELISA-basierten Komplementbindungsversuches**

Nach Bindung des Primärantikörpers (blau) an das Zielantigen (rot) wird Komplement (dunkelgrau) hinzugegeben. Dieses wird im Falle der Bindung durch einen spezifischen, Meerrettichperoxidase (gelb)-markierten Sekundärantikörper (hellgrau) erkannt und die Bindung über die OD-Messung der Farbreaktion mit dem chromogenen Substrat (grün) quantifiziert.

#### 4.5.1 Komplementbindungsversuche mit C1q

Als Primärantikörper diente je 100 µl PE-Material von Patient 1-3 in an die Anti-Contactin-1-Titer adaptierten Verdünnungen (Berechnung siehe Tabelle 20, Zeile C), als Negativkontrolle das PE-Material der vier „erkrankten Kontrollen“ je in den Verdünnungen 1:20 und 1:8,6 und als Positivkontrolle *Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/rat/mouse* 1:20 in Blockierungslösung (ELISA). Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Alle folgenden Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur unter konstanter Agitation. Als Komplementquelle diente *Complement component C1q from human serum > 95%* in einer Verdünnung von 10 µg/ml in Blockierungslösung (ELISA) mit einer Inkubationszeit von zwei Stunden. C1q ist die bindende Untereinheit des Komplementfaktors C1 und steht am Anfang des klassischen Aktivierungsweges der Komplementkaskade (siehe 3.4.2); somit ist es als Indikator für Komplementbindung geeignet. Als Sekundärantikörper wurde HRP-konjugierter *Anti-Complement C1q Antibody (HRP), polyclonal Sheep IgG* 1:200 in Blockierungslösung (ELISA) für 30 Minuten inkubiert. Der Einfluss von IVIG auf die Komplementbindung durch Anti-Contactin-1-Antikörper wurde separat untersucht. Hierzu wurden die beiden IVIG-Präparate

und als Kontrolle BSA zusammen mit oder als zusätzlicher Schritt nach der Inkubation mit Komplement für 30 Minuten in Konzentrationen von 0,2-25 mg/ml verwendet (vergleiche Kapitel 4.4.2.4).

#### 4.5.2 Komplementaktivierungsversuche mit C3c

Als Primärantikörper wurde 100 µl aufgereinigtes IgG-Material (c = 100 mg/ml) von Patient 1-3 und als Negativkontrolle aufgereinigtes IgG-Material (c = 100 mg/ml) einer „erkrankten Kontrolle“ mit inflammatorischer Polyneuropathie ohne Anti-Contactin-1-Antikörper in den an den Gesamt-IgG-Gehalt adaptierten Verdünnungen 1:40 oder 1:11,4 (Berechnung siehe Tabelle 21) sowie als Positivkontrolle *Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/rat/mouse* 1:20 in Blockierungslösung (ELISA) verwendet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Eine Durchführung der Versuche mit PE-Material oder Serum konnte methodisch nicht etabliert werden, da angesichts der niedrigen Verdünnung der Komplementquelle das Hintergrundsignal auch bei Anti-Contactin-1-negativen Kontrollseren unspezifisch erhöht war. Alle folgenden Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur unter konstanter Agitation. Als Komplementquelle diente je 100 µl *Complement Serum Standard human* 1:10 in Blockierungslösung (ELISA) verdünnt, die Inkubation erfolgte über Nacht. Als Sekundärantikörper wurde ein HRP-konjugierter Anti-C3c-Antikörper *IgG fraction of polyclonal goat antiserum to C3c fragment of human complement factor C3* in einer Verdünnung von 1:7000 in Blockierungslösung (ELISA) für 30 Minuten inkubiert. Im Rahmen der Komplementaktivierung wird der Faktor C3 in C3a und C3b gespalten, letzteres wird wiederum in C3c und C3d umgesetzt (siehe 3.4.2). Der verwendete Sekundärantikörper erkennt nach Angaben des Herstellers das Epitop der C3c-Domäne und bindet an C3c, C3b und kleinere Abbauprodukte und ist somit als Indikator für Komplementaktivierung geeignet. Um die Effekte von IVIG auf die Komplementaktivierung zu untersuchen, wurden die IVIG-Präparate und als Kontrolle BSA mit dem humanen Komplement in einer Konzentration von 25 mg/ml analog zum ELISA mit IVIG und dem C1q-KBV mit IVIG (vergleiche Kapitel 4.4.2.4 und 4.5.1) koinkubiert. Es wurde allerdings keine komplette Verdünnungsreihe von 0,2-25 mg/ml

durchgeführt, da nur begrenzte Mengen des aufgereinigten IgGs für Versuche zur Verfügung standen und in Vorversuchen geringe IVIG-Konzentrationen keinen Effekt auf die Komplementaktivierung gezeigt hatten.

#### 4.6 Bindungsversuche an transfizierten HEK-293-Zellen

Zur Identifizierung von Autoantikörpern gegen paranodale Proteine wurde eine embryonale humane Nierenepithel-Zelllinie (HEK-293) verwendet. Diese seit Jahren etablierte Zelllinie (Shein & Enders, 1962) findet in der Zellbiologie vielseitige Anwendungen, beispielsweise wird sie zur Expression antigener Strukturen über Transfektion mit Fremd-DNA genutzt. So kann über immunhistochemische Färbungen das Bindungsverhalten monospezifischer Antikörper an die eingebrachten Antigene untersucht werden.

##### 4.6.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen

Die für die Arbeit in der Zellkultur verwendeten Materialien sind in Tabelle 14, die verwendeten Puffer und Medien in Tabelle 15, die Geräte in Tabelle 17 aufgelistet. Alle offenen Arbeiten an lebenden Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zur Inkubation wurde der *Heracell™ 150i CO<sub>2</sub>-Inkubator* bei 5% CO<sub>2</sub> genutzt. Die HEK-293-Zellen (*ATCC, Wesel, DE*) wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Villmann zur Verfügung gestellt, in *Gibco™ Fetal Bovine Serum (FBS)* mit 10% *DMSO* in 1ml-Kryo-Tubes unter Verwendung des *CoolCell™ FTS30 Freezing container* eingefroren und bei -80°C im Stickstofftank kryokonserviert. Zur Kultivierung wurde ein Kryo-Tube im Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension auf 15ml vorgewärmtes HEK-Medium pipettiert und bei 800 rpm fünf Minuten lang mit der *ROTOFIX 32A Zentrifuge* zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in HEK-Medium gelöst und in einer Zellkulturflasche *CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 75cm<sup>2</sup>* mit 15ml HEK-Medium für eine Woche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator angezchtet. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal wöchentlich nach Waschen mit sterilem *DPBS Dulbecco's PBS* fünf Minuten lang bei 37°C mit *Trypsin-EDTA (0.05%) phenol red* anverdaut,

mit 10ml HEK-Medium vom Flaschenboden gelöst, bei 800 rpm für fünf Minuten zentrifugiert, resuspendiert und mit einer Dichte von 2 Millionen Zellen pro 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche in 10ml HEK-Medium (c = 200.000/ml) erneut ausgesät. Zur Berechnung der Konzentration wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau *Trypan Blue solution 0.4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture* angefärbt, in einer Neubauerzählkammer mit dem *Inversmikroskop CKX41* gezählt und die Verdünnung zum Erreichen der Zielkonzentration berechnet. Nach der 20. Passage wurden die Zellen verworfen.

#### 4.6.2 Transfektion von HEK-293-Zellen

Zur Verbesserung der Zelladhärenz am Deckglas wurde eine Beschichtung mit Poly-D-Lysin (PDL) durchgeführt. Sterilisierte 12mm-Glasdeckgläser wurden dazu in *Nunc™ Zellkultur-Multischalen, 24 Wells* ausgelegt, mit 150 µl PDL pro Deckglas eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und überschüssiges PDL durch zweimaliges Waschen mit destilliertem, sterilem Wasser *Ampuwa Steriles pyrogenfreies Aqua* entfernt. Danach wurden die Deckgläser für 24h bei Raumtemperatur getrocknet. Am folgenden Tag wurden die HEK-293-Zellen wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben aus den Zellkulturflaschen gelöst und in einer Dichte von 50.000/Well auf die beschichteten Deckgläser ausgesät. Nach einer Inkubation von 24 Stunden erfolgte die Transfektion mit Fremd-DNA. Dazu wurde die Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode verwendet. Dieses einfache Transfektionsverfahren beruht auf der Bildung von Komplexen aus ausgefälltem Calciumphosphat und DNA, welche über unspezifische Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. So kann die Fremd-DNA in das Genom integriert werden (Graham & van der Eb, 1973). Auf diese Weise kann eine Transfektionsrate von 10-50% an Säugetierzellen erreicht werden (Chen & Okayama, 1987). Zur Transfektion wurden freundlicherweise DNA-Plasmide von humanem Caspr und Contactin-1 von Prof. Eilior Peles (Peles et al, 1995; Peles et al, 1997), Ratten-Contactin-1 von PhD Sulayman D. Dib-Hajj und PhD, MD Stephen G. Waxman (Liu et al, 2001; Peles et al, 1995) und humanem Neurofascin-155 von PhD Dr. Judy Ng und Prof. Dr. E. Meinel (Ng et al, 2012) zur Verfügung gestellt und von

Prof. Dr. Carmen Villmann durch Retransformation in NEB5 $\alpha$  C2987I-kompetente *Escherichia coli* (*New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE*) und anschließende Maxi-Plasmid-Präparation unter Verwendung des *Nucleo Bond® Xtra Maxi-Kits* vermehrt. Als positive Kontrolle für die erfolgreiche Transfektion dienten separat Green-Fluorescent-Protein (GFP)-Plasmide (Shimomura et al, 1962). Es wurden 44% 0,1x TE-Puffer mit DNA in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  mit 1,25% 2,5M  $\text{CaCl}_2$  in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt und tropfenweise mit 2x HBS-Puffer aufgefüllt. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und fünf Minuten lang bei 37°C inkubiert. Darunter kam es als Zeichen der Präzipitatbildung zu einer Trübung. Pro Well wurden nun 50  $\mu\text{l}$  tropfenweise auf die Zellen gegeben und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurde so eine Transfektionsrate von 20% erreicht. Am Folgetag wurde der Überstand entfernt, zweimalig mit HEK-Medium gewaschen und wiederum 24 Stunden in HEK-Medium inkubiert. Daraufhin konnte die immunhistochemische Färbung erfolgen.

#### 4.6.3 Immunhistochemische Färbung an transfizierten HEK-293-Zellen

Die für die immunhistochemische Färbung an HEK-293-Zellen verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 10 und Tabelle 11, die Antikörper in Tabelle 12 und die Geräte und Software in Tabelle 17 und Tabelle 18 aufgeführt. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen für fünf Minuten in *DPBS* gewaschen und anschließend für 20 Minuten mit 200  $\mu\text{l}$  4% PFA pro Well fixiert. Alle folgenden Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und unspezifische Bindung durch Inkubation mit BSA/PBS 10% für 20 Minuten blockiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit BSA/PBS 1% für fünf Minuten. Der in BSA/PBS 2% verdünnte Primärantikörper wurde im Anschluss für zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen für fünf Minuten in PBS zum Entfernen nicht gebundener Substanzen erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in BSA/PBS 2% für eine Stunde. Nach wiederholtem Waschen wurden die Deckgläser mit Pinzetten

vorsichtig aus der 24-Well Platte entnommen und mit *Mowiol® 4-88 Calbiochem®* mit *DAPI* auf beschrifteten Objektträgern eingedeckelt. Nach Trocknung konnte die Auswertung verblindet am *Axiolmager.M2*-Mikroskop erfolgen.

#### 4.6.3.1 Einzelfärbungen an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen

Das Serum aller gesunden Kontrollen und das Serum und PE-Material der Patienten wurde als Primärantikörper in Verdünnungen von 1:100 und 1:500 in BSA/PBS 2% (200 µl pro Well) für zwei Stunden mit Contactin-1- und als Kontrolle separat mit GFP-transfizierten Zellen inkubiert. Als Positivkontrolle diente bei jeder Färbung *Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/rat/mouse* 1:200 in BSA/PBS 2% auf separaten Objektträgern. Nach obig beschriebenen Waschschritten erfolgte die Inkubation für zwei Stunden mit dem passenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:300 in BSA/PBS 2%. Für das humane Material wurde der Cy<sup>TM</sup>3-konjugierte *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)*, für die Positivkontrolle der Cy<sup>TM</sup>3-konjugierte *AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)*-Antikörper verwendet. Zur Auswertung wurde die Färbung der jeweiligen Patientenprobe an Contactin-1-transfizierten Zellen verblindet mit der Vergleichsprobe an GFP-transfizierten Zellen verglichen; als Referenz diente außerdem die Positivkontrolle an Contactin-1-transfizierten Zellen. So konnte eine Einteilung in die Kategorien „positiv“, „negativ“ und „negativ (hoher Hintergrund)“ vorgenommen werden. In der Auswertung fiel nach Durchführung der Färbung des Materials aller Kontrollen, von 74% der CIDP-Patienten, 100% der MMN-Patienten und von 81% der GBS-Patienten bei 38% aller gesunden Kontrollen, 24% der getesteten CIDP-Patienten, 54% der MMN-Patienten und 65% der GBS-Patienten eine hohe, unspezifische Hintergrundfärbung sowohl an den Contactin-1- als auch den GFP-transfizierten Zellen auf, was die eindeutige Auswertung erschwerte. Es wurde daher die Methode der Einzelfärbung mit einer GFP-Transfektion als Referenz als aufwändige Screening-Methode für alle in die Studie eingeschlossenen Patienten verworfen und folglich nicht alle Patienten in der Einzelfärbung getestet. Im Folgenden wurden nur Patienten mit Verdacht auf paranodale Antikörper, nämlich diejenigen, die ein

paranodales Bindungsmuster an den Zupfnerven gezeigt hatten oder im Neurofascin-155- oder Contactin-1-ELISA über dem Schwellenwert lagen, einer Einzel- und Doppelfärbung (siehe Kapitel 4.6.3.3) an mit paranodalen Proteinen transfizierten Zellen unterzogen.

#### 4.6.3.2 Einzelfärbungen an Neurofascin-155-transfizierten HEK-293-Zellen

Das Serum der Patienten und Kontrollen wurde in Verdünnungen von 1:100 und 1:500 in BSA/PBS 2% (200 µl pro Well) für zwei Stunden mit Neurofascin-155- und als Kontrolle mit GFP-transfizierten Zellen inkubiert. Als Positivkontrolle diente auf einem separaten Objektträger bei jeder Färbung *Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin* 1:100 in BSA/PBS 2%. Nach dem Entfernen überschüssigen Materials durch Waschschrte folgte die zweistündige Inkubation mit dem passenden, fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, Cy<sup>TM</sup>3-konjugiertem *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)* für die humanen Proben und *AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)* für die Positivkontrolle, in einer Verdünnung von 1:300 in BSA/PBS 2%. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 4.6.3.1 beschrieben. Bei der Auswertung von 20% der gesunden Kontrollen und 95% der MMN-Patienten fiel analog zur Einzelfärbung an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen (vergleiche Kapitel 4.6.3.1) bei 61% aller MMN-Patienten eine hohe Hintergrundfärbung auf, was die verblindete Auswertung erschwerte. Die Methode wurde daher nur bei Patienten mit Verdacht auf paranodale Antikörper durchgeführt.

#### 4.6.3.3 Einzelfärbungen an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen

Da Caspr ohne die Anwesenheit von Contactin-1 kaum an der Membran exprimiert wird (vergleiche Kapitel 3.2.3.2), wurde das in Kapitel 4.6.3 beschriebene Protokoll leicht abgewandelt, um den Transport der Primärantikörper nach intrazellulär zu erleichtern. Die Zellen wurden vor der Fixation wie oben beschrieben blockiert und mit dem Primärantikörper für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Als

Primärantikörper diente das Serum und PE-Material der Patienten mit Verdacht auf paranodale Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in BSA/PBS 2%. Zudem wurde das Serum 25 gesunder Kontrollen und 10 „erkrankter Kontrollen“ an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen und als Referenz an nicht transfizierten Zellen getestet. Als Positivkontrolle wurde *Anti-Caspr/paranodin/neurexin IV, NeuroMab Host: Mouse, IgG Isotype IgG1*-Antikörper 1:200 in BSA/PBS 2% verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS für je fünf Minuten erfolgte die Fixierung in PFA 4% wie oben beschrieben. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS wurde mit dem Protokoll wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben fortgefahren. Als Sekundärantikörper diente der Cy<sup>TM</sup>3-konjugierte *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)*-Antikörper für humanes Material und der Cy<sup>TM</sup>3-konjugierter *AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)*-Antikörper für die Positivkontrolle jeweils in einer Verdünnung von 1:300 in BSA/PBS 2%. Die Färbung wurde verblindet mit der Färbung an nicht-transfizierten Zellen als Referenz verglichen und in „positiv“ oder „negativ“ eingestuft. Bei Patient 5 wurde im klinischen Verlauf bei jedem stationären Aufenthalt eine Serumprobe entnommen und diese der Einzelfärbung an den Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen unterzogen. Die Intensität der Bindung wurde nicht-quantitativ durch einen verblindeten Vergleich der unterschiedlichen Serumproben beurteilt.

#### 4.6.3.4 Doppelfärbungen und Subklassenbestimmung

Als Primärantikörper wurde das Material von Patienten mit Verdacht auf paranodale Autoantikörper 1:500 in BSA/PBS 2% verdünnt und zusammen mit den kommerziell erworbenen Antikörpern *Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/rat/mouse* 1:200 in BSA/PBS 2%, *Anti-Caspr/paranodin/neurexin IV, NeuroMab Host: Mouse, IgG Isotype IgG1* 1:200 in BSA/PBS 2% oder *Human/Mouse/Rat Neurofascin Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Chicken IgY* 1:1000 in BSA/PBS 2% an jeweils Contactin-1-, Caspr- und Neurofascin-155-transfizierten HEK-293-Zellen koinkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils das Serum einer gesunden Kontrolle 1:500 in BSA/PBS 2% koinkubiert mit den kommerziell erworbenen Antikörpern. Bei den Caspr-transfizierten Zellen

wurde eine Doppelfärbung analog zu der für die Einzelfärbung beschriebenen Inkubation des Primärantikörpers vor Fixierung (siehe Kapitel 4.6.3.3) durchgeführt. Als Sekundärantikörper diente Cy<sup>TM</sup>2- konjugierter *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)* 1:200 koinkubiert mit jeweils Cy<sup>TM</sup>3-konjugiertem *AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)* 1:300 in BSA/PBS 2% für die Doppelfärbung an Contactin-1- und Caspr-transfizierten Zellen sowie Cy<sup>TM</sup>3-konjugierter *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)* 1:300 in BSA/PBS 2% mit AlexaFluor 488-konjugiertem *AffiniPure Donkey Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)* 1:300 in BSA/PBS 2%. Zur Bestimmung der Subklassen von Patient 1-6 mit paranodalen Antikörpern wurde die Doppelfärbung an Caspr- und Contactin-1-transfizierten Zellen zusätzlich mit subklassenspezifischen FITC-markierten *Mouse Monoclonal anti-human IgG1, 2, 3 und 4*-Sekundärantikörpern in BSA/PBS 2% und einem Cy<sup>TM</sup>3-konjugiertem Kontrollantikörper durchgeführt. Die Kolokalisation der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe wurde über *VisiView®* und *ImageJ* bestimmt.

#### 4.6.3.5 Färbungen unter Zugabe von IVIG

Zur Visualisierung der Ergebnisse des Contactin-1-ELISAs unter Zugabe von IVIG wurde der Effekt von IVIG auf die Bindung der Anti-Contactin-1-Antikörper an das Zielprotein auch mittels immunhistochemischer Färbung an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen untersucht. Auf die Untersuchung der Effekte von IVIG auf die Bindung von Autoantikörpern gegen Caspr bei Patient 5 und 6 wurde bei fehlender Möglichkeit der Quantifizierung im HEK-293-Zell-basierten Versuch verzichtet. Das Serum und PE-Material von Patient 1-4 wurde 1:100 in BSA/PBS 2% verdünnt und mit *Privigen® 100 mg/ml* IVIG 10% in Konzentrationen von 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml und 20 mg/ml koinkubiert. In einem separaten Versuch zur Untersuchung eines möglichen verdrängenden Effektes der Autoantikörper aus der Antigenbindung durch IVIG wurde IVIG erst nach der Inkubation mit dem Primärantikörper in einem zusätzlichen Schritt eine Stunde bei Raumtemperatur unter Agitation in obig genannten Verdünnungen inkubiert und anschließend ausgewaschen. Als Sekundärantikörper diente Cy<sup>TM</sup>3-konjugierter *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)* 1:300 in BSA/PBS 2%. Die Auswertung erfolgte durch

einen verblindeten Vergleich der Proben. Auf Doppelfärbungen wurde verzichtet um das Ergebnis nicht durch Interaktion von IVIG mit dem kommerziellen Anti-Contactin-1-Antikörper zu verfälschen.

#### 4.7 HEK-293-Zell-basierte Komplementbindungsversuche mit C1q

Zur Untersuchung des Komplementbindungsverhaltens von Anti-Contactin-1- und Anti-Caspr-Antikörpern wurde zusätzlich zum ELISA-basierten Verfahren ein zellbasiertes Verfahren mit immunhistochemischer Färbung etabliert. Das Prinzip ist in Abbildung 8 dargestellt. Die verwendeten Substanzen und Antikörper sind in Tabelle 10, Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 13 aufgelistet.

##### Legende

HEK-293-Zelle

Zielantigen

Primärantikörper

Komplement C1q 200µg/ml

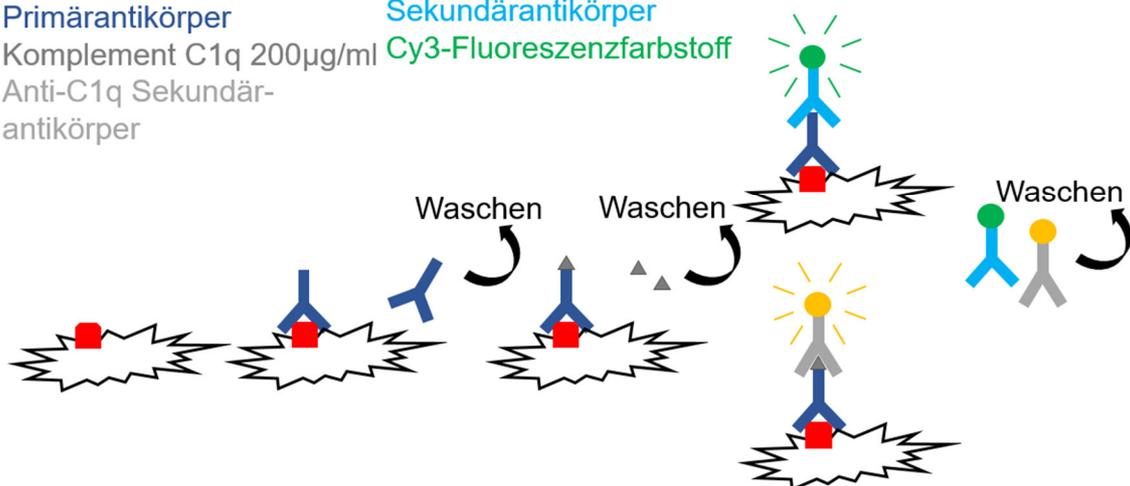
Anti-C1q Sekundärantikörper

FITC-Fluoreszenzfarbstoff

Anti-Human-IgG

Sekundärantikörper

Cy3-Fluoreszenzfarbstoff



##### Abbildung 8: Prinzip des HEK-293-Zell-basierten Komplementbindungsversuches

Nach Bindung des Primärantikörpers (Autoantikörper der Patienten, dunkelblau) an das Zielantigen (Caspr oder Contactin-1, rot) wird C1q (dunkelgrau) hinzugegeben, welches durch einen FITC-markierten spezifischen Sekundärantikörper (hellgrau) erkannt wird. In der Doppelfärbung mit dem Cy3-markierten Human-IgG-spezifischen Sekundärantikörper (hellblau) kann über Kollisionsstudien das Komplementbindungsverhalten des Primärantikörpers immunhistochemisch bestimmt werden.

Es wurden HEK-293-Zellen wie in Kapitel 4.6.1 und 4.6.2 beschrieben kultiviert, auf Deckgläser in 24-Well-Platten ausgesät und mit Contactin-1 und Caspr transfiziert. Die Caspr-transfizierten Zellen wurden nach fünfminütigem Waschen in DPBS mit Serum und PE-Material von Patient 5 und 6 in einer Verdünnung von

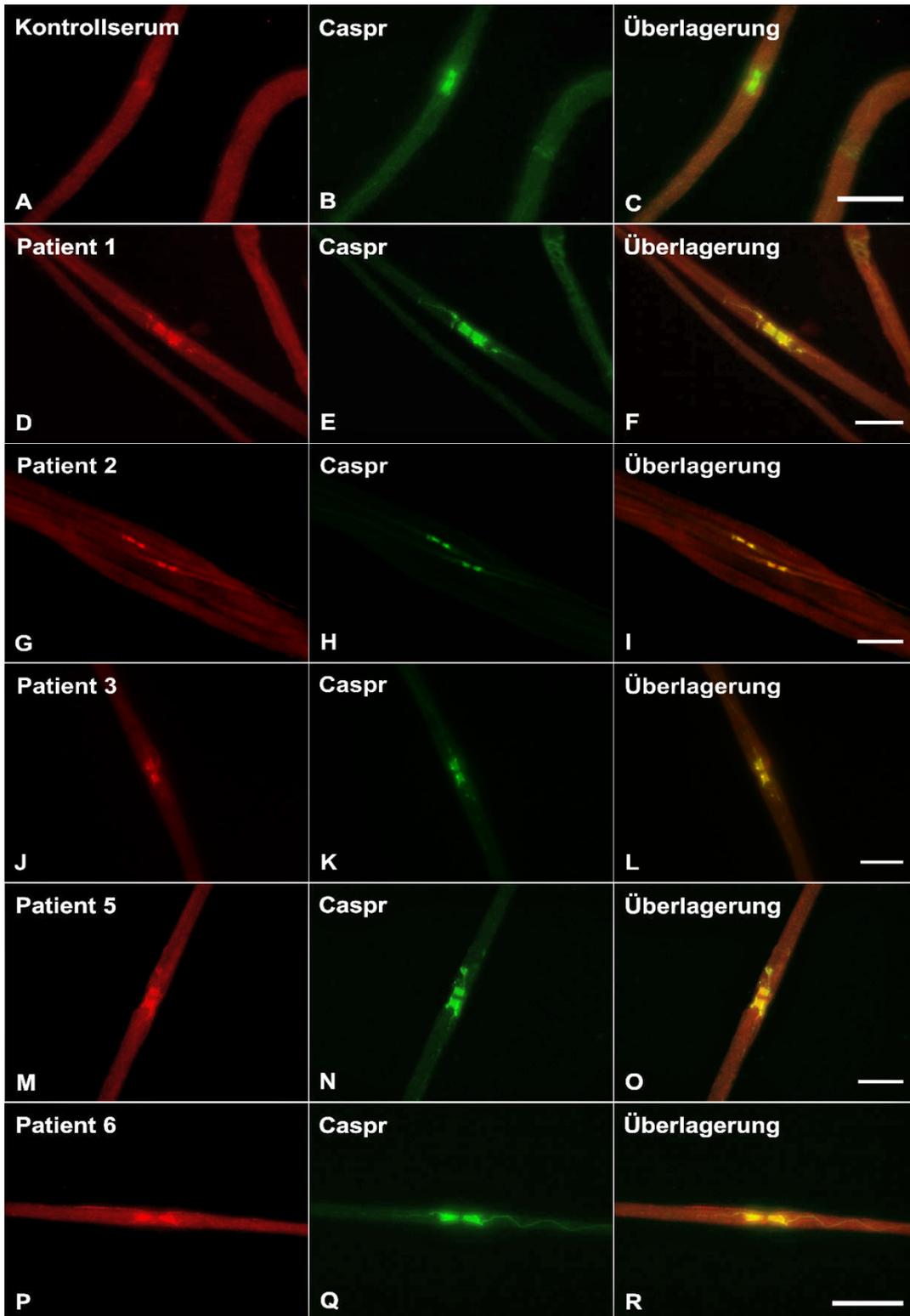
1:100 in BSA/PBS 2% eine Stunde bei 37°C inkubiert, dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit dem Komplementfaktor *Complement component C1q from human serum* > 95% in einer Konzentration von 200 µg/ml eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Nicht gebundenes Komplement wurde durch Waschschrte entfernt. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4% PFA für 20 Minuten. Contactin-1-transfizierte Zellen wurden nach fünfminütigen Waschen mit DPBS 20 Minuten in 4% PFA fixiert, dreimaligen Waschschrten mit PBS unterzogen und mit dem Serum und PE-Material von Patient 1-4 1:100 in BSA/PBS 2% für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Agitation inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit C1q 200 µg/ml eine Stunde lang bei Raumtemperatur, überschüssiges Komplement wurde dreimal mit PBS ausgewaschen. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Patienten separat mit Blockierungslösung inkubiert. Sowohl die Contactin-1- als auch die Caspr-transfizierten Zellen wurden nun eine Stunde lang mit FITC-markiertem *Anti-C1q antibody, Rabbit polyclonal to C1q (FITC)* und Cy<sup>TM</sup>3-konjugiertem *AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)* bei Raumtemperatur inkubiert und erneut drei Waschschrten in PBS unterzogen. Die Deckgläser wurden mit *Mowiol® 4-88 Calbiochem®* mit *DAPI* auf beschriftete Objektträger überführt, getrocknet und am *Axiomager.M2*-Mikroskop ausgewertet. Koloalisation wurde über *VisiView®* und *ImageJ* bestimmt.

## 5. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind teilweise bereits in Publikationen der neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikum Würzburg (Appeltshauser et al, 2017; Doppler et al, 2015a; Doppler et al, 2016; Doppler et al, 2015b), die während der Arbeit an der Promotion entstanden, veröffentlicht.

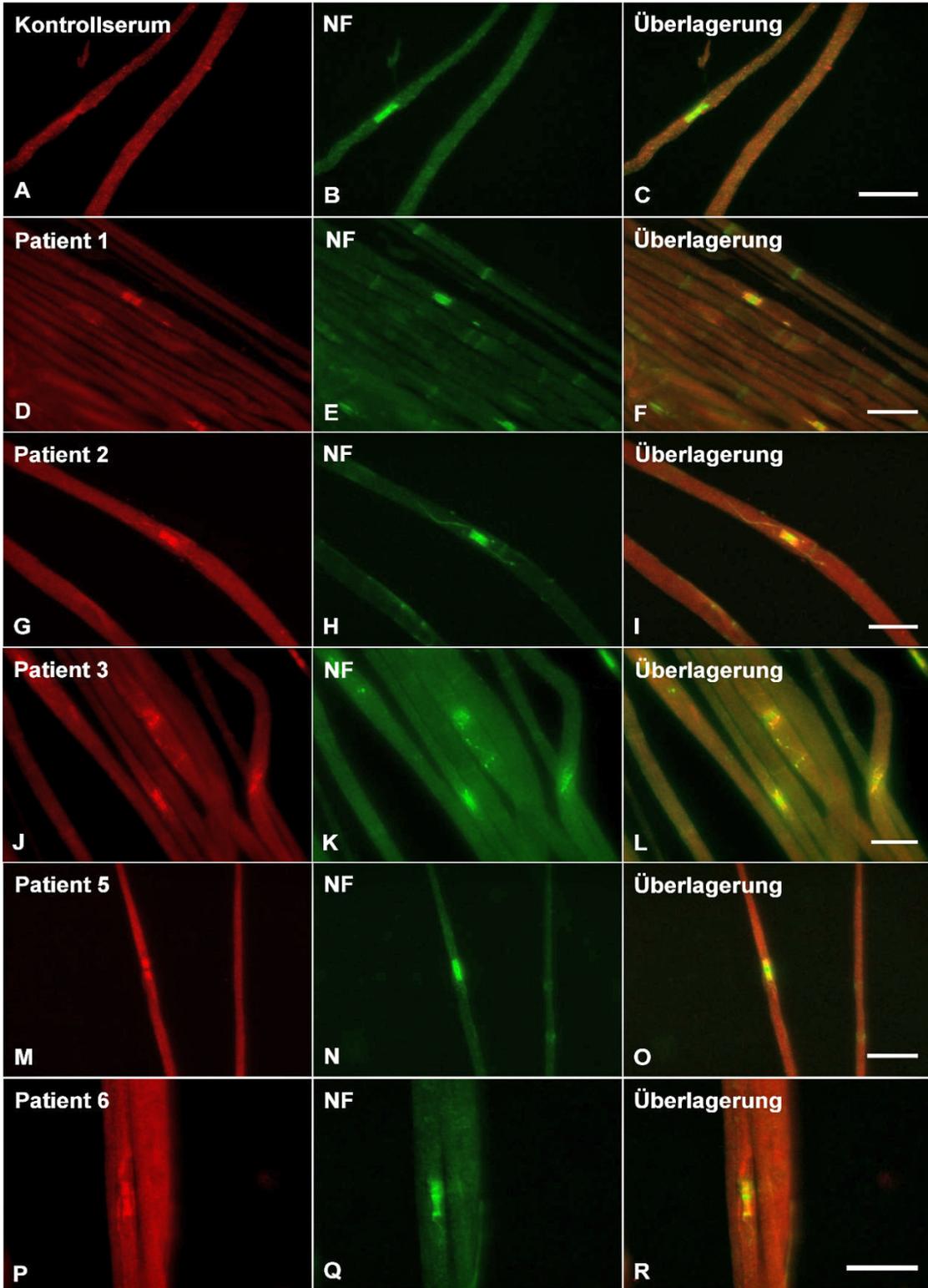
### 5.1 Detektion von paranodalen Autoantikörpern bei vier Patienten mit CIDP und einem Patienten mit GBS mittels Bindungsversuchen an Zupfnerven

Material aller Patienten und Kontrollen wurde in der Einzelfärbung an murinen Zupfnervenpräparaten auf eine Immunreaktivität gegen Strukturen des peripheren Nervens getestet. Dabei zeigten vier CIDP-Patienten (Patient 1, 2, 3 und 5) und eine GBS-Patientin (Patient 6) Bindung am paranodalen Axon mit Färbung des Mesaxons. Keine weiteren Patienten oder Kontrollen zeigten dieses spezifische Muster (die Daten werden nicht gezeigt). In der Doppelfärbung des obigen genannten Patientenmaterials zeigte sich eine Kolo-kalisation mit dem paranodalen Protein Caspr und mit der paranodalen Komponente des gegen Neurofascin-155 und Neurofascin-186 gerichteten Antikörpers. Es konnten somit Antikörper gegen Bestandteile des paranodalen Komplexes aus Contactin-1, Caspr und Neurofascin-155 nachgewiesen werden. Im Anschluss wurden diese näher spezifiziert. Abbildung 9 zeigt die Doppelfärbung mit Caspr, Abbildung 10 die Doppelfärbung mit Neurofascin bei einer Normalkontrolle sowie bei Patient 1, 2, 3, 5 und 6. Es ist jeweils die Probe des humanen Materials (A, D, G, J, M, P), des Kontrollantikörpers (B, E, H, K, N, Q, Neurofascin = NF) sowie das Überlagerungsbild (C, F, I, L, O, R), welches sich bei exakter Kolo-kalisation gelb darstellt, abgebildet. Die Belichtungszeit variiert von Aufnahme zu Aufnahme, da sonst bei starker Bindung übersättigte Bilder entstehen. Der Kontrast stellt sich daher auf den Bildern unterschiedlich dar, dies gilt im Folgenden für alle Bilder immunhistochemischer Färbungen.



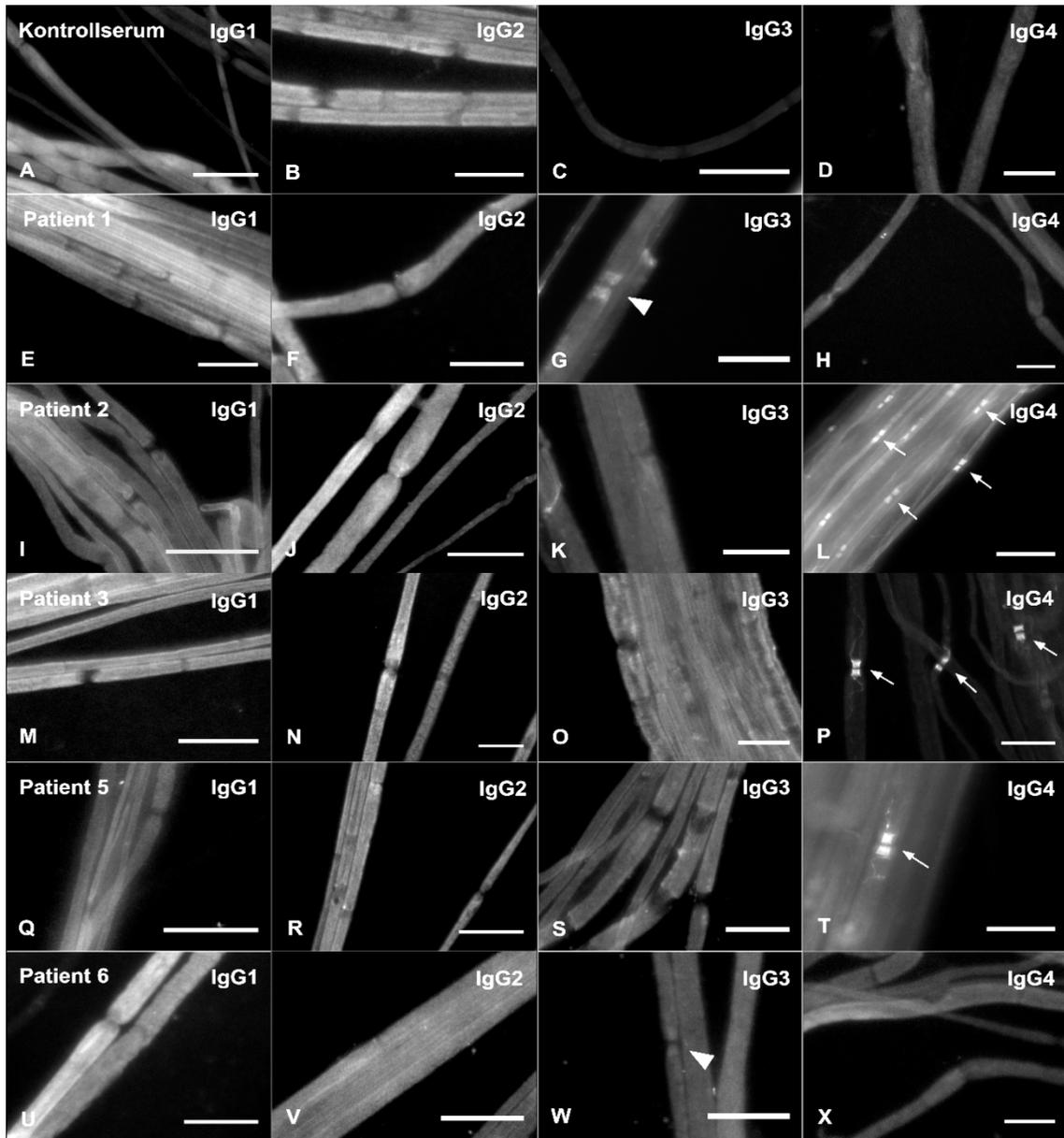
**Abbildung 9: Doppelfärbung mit Anti-Caspr an Zupfnervenpräparaten**

Färbung eines Kontrollserums (A-C) und des Materials von Patient 1, 2, 3, 5 und 6 (D-R). Humanes Material ist in rot, der Kontrollantikörper in grün dargestellt. Kolokalisation stellt sich im Überlagerungsbild gelb dar und spricht für das Vorliegen von paranodalen Autoantikörpern (F, I, L, O, R). Maßstab = 10  $\mu$ m.



**Abbildung 10: Doppelfärbung mit Anti-Neurofascin (NF) an Zupfnervenpräparaten**  
 Färbung eines Kontrollserums (A-C) und des Materials von Patient 1, 2, 3, 5 und 6 (D-R). Humanes Material ist in rot, der Kontrollantikörper in grün dargestellt. Kolokalisation stellt sich im Überlagerungsbild gelb dar und spricht für das Vorliegen von paranodalen Autoantikörpern (F, I, L, O, R). Maßstab = 10 µm.

Zur Analyse der Subklassen von Antikörpern gegen paranodale Proteine wurden Einzelfärbungen mit subklassenspezifischen Antikörpern an den Zupfnervenpräparaten bei Patient 1, 2, 3, 5 und 6 sowie einer gesunden Kontrolle durchgeführt. Letztere zeigte keine Immunreaktivität gegen Schnürringproteine bei Verwendung der Sekundärantikörper Anti-IgG1-4. Bei Patient 1 konnte eine leichte Immunreaktivität gegen IgG3 und IgG4 nachgewiesen werden (Abbildung 11, G und H), bei Patient 6 ausschließlich gegen IgG3 (Abbildung 11, W). Patient 2, 3 und 5 zeigten deutliche Immunreaktivität ausschließlich gegen IgG4 (Abbildung 11, L, P, T).



**Abbildung 11: Einzelfärbungen an Zupfnervenpräparaten mit IgG-subklassenspezifischen Sekundäntikörpern**

Färbung eines Kontrollserums (A-D) und des Materials von Patient 1, 2, 3, 5 und 6 (E-X) mit jeweils subklassenspezifischen Sekundäntikörpern Anti-IgG1 (A, E, I, M, O, Q), Anti-IgG2 (B, F, J, N, R, V), Anti-IgG3 (C, G, K, O, S, W) und Anti-IgG4 (D, H, L, P, T, X). Immunreaktivität an den Schnürringen gegen IgG3 ist mit Pfeilspitzen (G, W), gegen IgG4 mit Pfeilen (L, P, T) gekennzeichnet. Maßstab = 10  $\mu$ m.

## 5.2 Bestimmung des Gesamt-IgG-Gehalts mittels ELISA

Der Gesamt-IgG-Gehalt des Serums aller gesunden Kontrollen und des Serums von Patient 1, 3 und 6 sowie des verfügbaren PE-Materials aller in die Studie aufgenommenen Patienten, inklusive Patient 1, 2, 3, 4 und 6 (siehe Kapitel 4.4.3) wurde mittels ELISA bestimmt. Der Mittelwert des IgG-Gehalts im Serum gesunder Kontrollen betrug 15,83 mg/ml (Streubreite 8,84-28,76 mg/ml), im PE-Material aller untersuchten Patienten und Kontrollen 11,37 mg/ml (Streubreite 3,3-31,44 mg/ml). Die Werte der Patienten mit paranodalen Autoantikörpern, jeweils für Serum und PE-Material - soweit verfügbar - sind in Tabelle 23 festgehalten. Der IgG-Gehalt im Serum von Patient 1 und Patient 5 liegt über dem Mittelwert gesunder Kontrollen, im Rahmen einer bereits durchgeführten IVIG-Therapie jedoch innerhalb des IgG-Gehalts bei Patienten nach IVIG-Behandlung (siehe Kapitel 3.1.6.2.1).

<b>Patient</b>	<b>IgG-Gehalt Serum (mg/ml)</b>	<b>IgG-Gehalt PE-Material (mg/ml)</b>
Patient 1	23,46	3,30
Patient 2	nicht verfügbar	9,65
Patient 3	11,3	6,39
Patient 4	nicht verfügbar	18,26
Patient 5	22,32	nicht verfügbar
Patient 6	nicht verfügbar	19,18

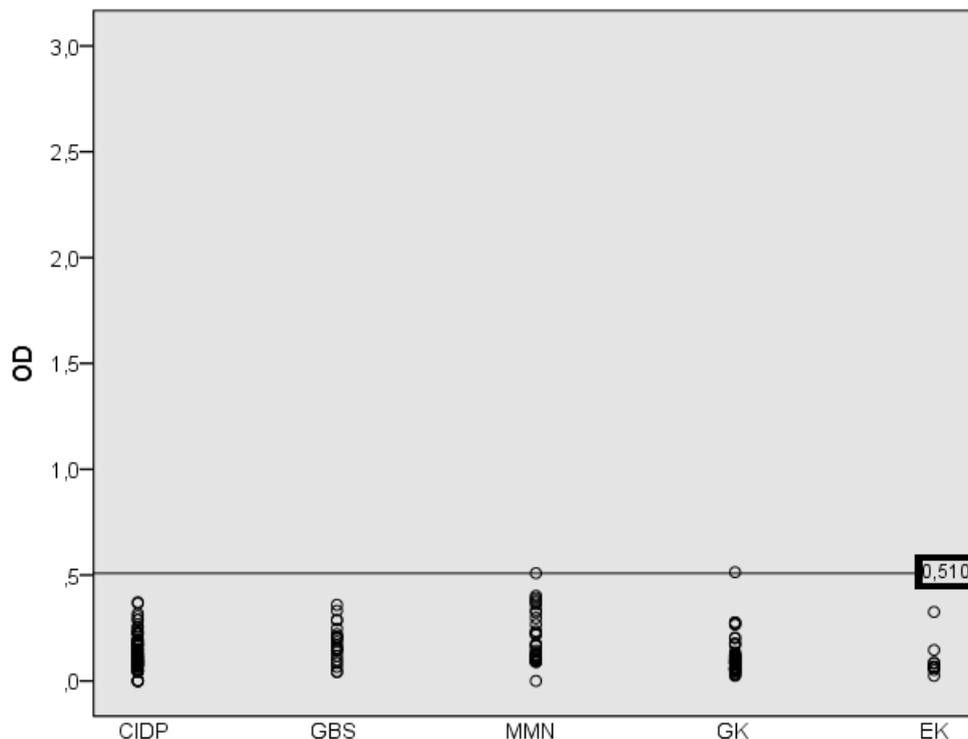
*Tabelle 23: Gesamt-IgG-Gehalt in Serum und PE-Material (Patient 1-6)*

## 5.3 Keine Detektion von Anti-Neurofascin-155-Autoantikörpern

Weder bei den getesteten Patienten noch bei den Kontrollen konnten unter Anwendung verschiedener Methoden (ELISA, Bindungsversuche an Neurofascin-155-transfizierten HEK-293-Zellen) Autoantikörper gegen Neurofascin-155 nachgewiesen werden.

### 5.3.1 Neurofascin-155-IgG-ELISA

Mittels ELISA wurden alle Patienten auf IgG-Autoantikörper gegen Neurofascin-155 getestet. Der Mittelwert der optischen Dichte der gesunden Kontrollen lag bei 0,109 (Streuung 0,025-0,514), der Mittelwert der „erkrankten Kontrollen“ bei 0,098 (Streuung 0,015-0,326). Der Schwellenwert von fünf Standardabweichungen über dem Mittelwert der gesunden Kontrollen lag somit bei OD = 0,510. Die optische Dichte der CIDP-Patienten lag im Mittel bei OD = 0,289 (Streuung 0-0,372), die der GBS-Patienten bei 0,180 (Streuung 0,042-0,360) und die der MMN-Patienten bei 0,196 (Streuung 0,090-0,509). Bei keinem Patienten lag die optische Dichte über dem Schwellenwert von 0,510. Es konnten somit keine IgG-Antikörper gegen Neurofascin-155 detektiert werden. Die Ergebnisse sind in einem Streudiagramm (Abbildung 12) illustriert.

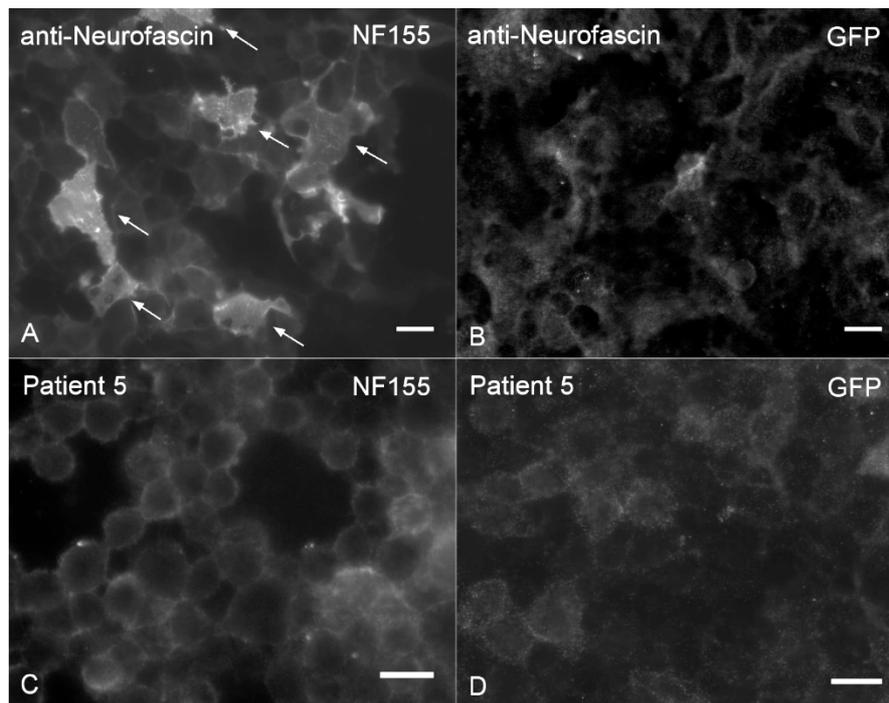


**Abbildung 12: Streudiagramm Neurofascin-155-IgG-ELISA**

Verteilung der optischen Dichte (y-Achse) in den einzelnen Patientengruppen (x-Achse). Die durchgezogene Linie markiert den Schwellenwert bei 0,510. Keine OD der Patienten liegt über dem angegebenen Schwellenwert. Abkürzungen: CIDP = chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, EK = „erkrankte Kontrollen“, GBS = Guillain-Barré-Syndrom, GK = gesunde Kontrollen, MMN = multifokale motorische Neuropathie, OD = optische Dichte.

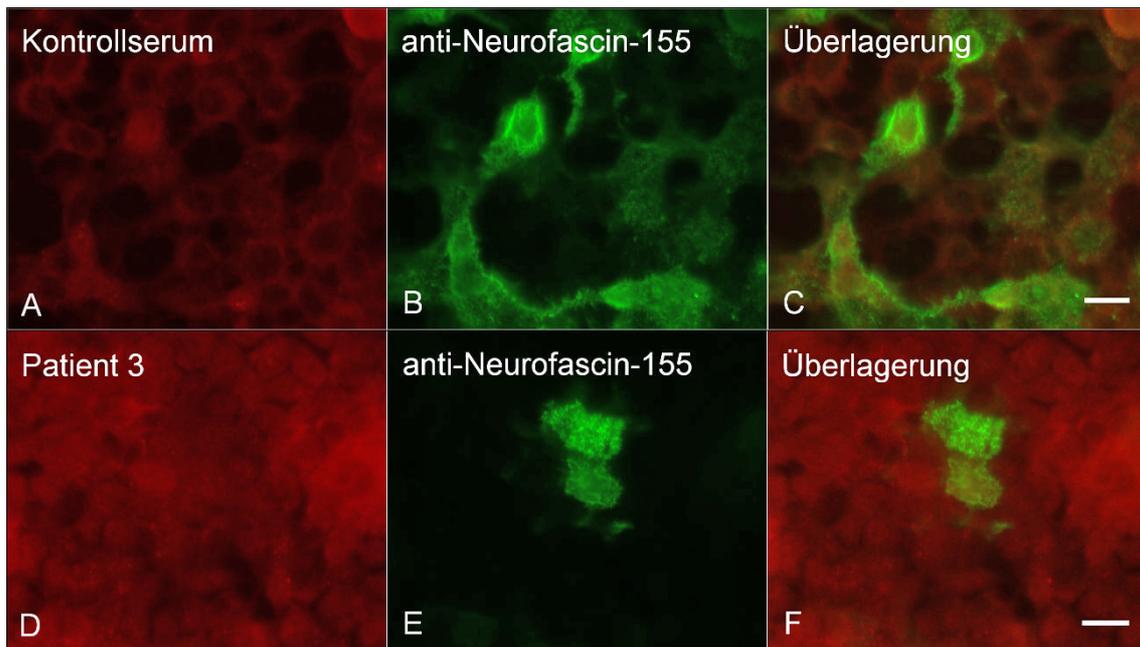
### 5.3.2 Bindungsversuche an Neurofascin-155-transfizierten HEK-293-Zellen

Das Serum oder PE-Material von Patient 1-6 sowie das Serum von 12 gesunden Kontrollen wurde einer Einzelfärbung an Neurofascin-155-transfizierten und GFP-transfizierten Zellen unterzogen. Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Transfektion diente die Färbung mit einem Anti-Neurofascin-Kontrollantikörper. Es wurde eine Transfektionsrate von circa 20% erreicht. Es zeigte sich insgesamt eine hohe Hintergrundfärbung, aber kein spezifisches Bindungsmuster an Neurofascin-155-transfizierten Zellen beim humanem Material, wohl aber beim Kontrollantikörper (Abbildung 13, A, Pfeile). Es ist exemplarisch die Färbung der Positivkontrolle und des Serums von Patient 5 je an Neurofascin-155-transfizierten (Abbildung 13, A und C) und GFP-transfizierten (Abbildung 13, B und D) HEK-293-Zellen dargestellt.



**Abbildung 13: Einzelfärbung an Neurofascin-transfizierten HEK-293-Zellen**  
Färbung der Positivkontrolle (A, B) und des Serums von Patient 5 (C, D) an Neurofascin-155 (NF155)-transfizierten (A, C) und GFP-transfizierten (B, D) HEK-293-Zellen. Transfizierte, angefärbte Zellen sind durch Pfeile markiert (A). Bei Patient 5 zeigt sich keine Bindung an Neurofascin-155-transfizierte Zellen (C). Maßstab = 10  $\mu$ m.

In der Doppelfärbung an Neurofascin-155-transfizierten Zellen zeigte sich bei Patient 1-6 und einer gesunden Kontrolle keine Kolokalisation zwischen humanem Material und Kontrollantikörper, exemplarisch dargestellt für das Serum einer Kontrolle (Abbildung 14, A-C) und das PE-Material von Patient 3 (Abbildung 14, D-F). Aufgrund intensiver Färbung des Kontrollantikörpers sind bei starkem Kontrast nicht transfizierte Zellen schwächer sichtbar als bei der Färbung mit humanem Serum (Abbildung 14, B und E).



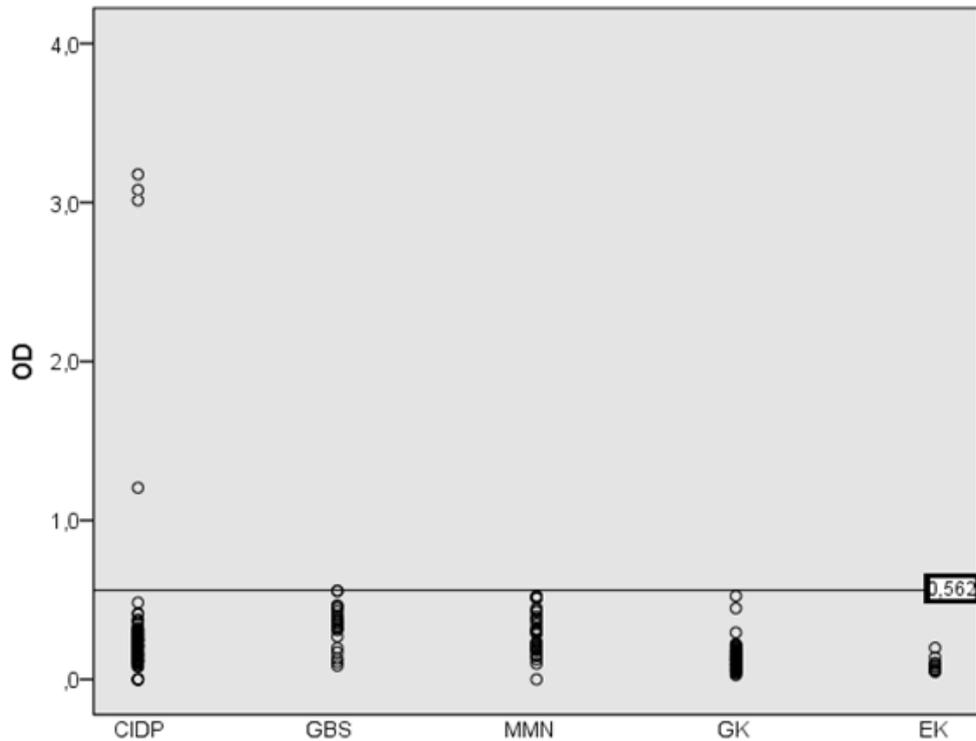
**Abbildung 14: Doppelfärbung and Neurofascin-transfizierten HEK-293-Zellen**  
 Färbung eines Kontrollserums (A-C) und des PE-Materials von Patient 3 (D-F) an Neurofascin-155-transfizierten HEK-293-Zellen. Humanes Material ist in rot (A, D), der Kontrollantikörper in grün (B, E) dargestellt. Kolokalisation stellt sich im Überlagerungsbild (C, F) gelb dar, liegt allerdings weder bei der Kontrolle (C) noch bei Patient 3 (F) vor. Maßstab = 10 µm.

## 5.4 Detektion und Analyse von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern

Mit unterschiedlichen Methoden konnten bei vier Patienten mit CIDP, jedoch weder bei den GBS- oder MMN-Patienten noch bei den Kontrollen Anti-Contactin-1-Autoantikörper nachgewiesen werden. Die Prävalenz der Anti-Contactin-1-Antikörper in der CIDP-Kohorte beträgt 3,8% (vier von 105 Patienten). Die Antikörper wurden im Anschluss näher charakterisiert.

### 5.4.1 Detektion von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern mittels ELISA bei vier Patienten mit CIDP

Im Contactin-1-IgG-ELISA wurden alle Patienten auf IgG-Autoantikörper gegen Contactin-1 getestet. Der Mittelwert der optischen Dichte der gesunden Kontrollen lag bei 0,137 (Streubreite 0,027-0,525), der Schwellenwert für ein positives Ergebnis, definiert als fünf Standardabweichungen über dem Mittelwert, somit bei 0,562. Der Mittelwert der „erkrankten Kontrollen“ lag bei 0,093 (Streubreite 0,028-0,199), der CIDP-Patienten bei 0,300 (Streubreite 0-3,146), der GBS-Patienten bei 0,335 (Streubreite 0,086-0,557) und der MMN-Patienten bei 0,278 (Streubreite 0,099-0,514). Bei vier Patienten mit CIDP lag die OD über dem Schwellenwert, nämlich bei 3,146 (Patient 1), 3,051 (Patient 2), 3,034 (Patient 3) und 1,206 (Patient 4). In der Gruppe der GBS-Patienten und MMN-Patienten lag keine OD über dem Schwellenwert. Die Ergebnisse sind in einem Streudiagramm (Abbildung 15) dargestellt.



**Abbildung 15: Streudiagramm Contactin-1-IgG-ELISA**

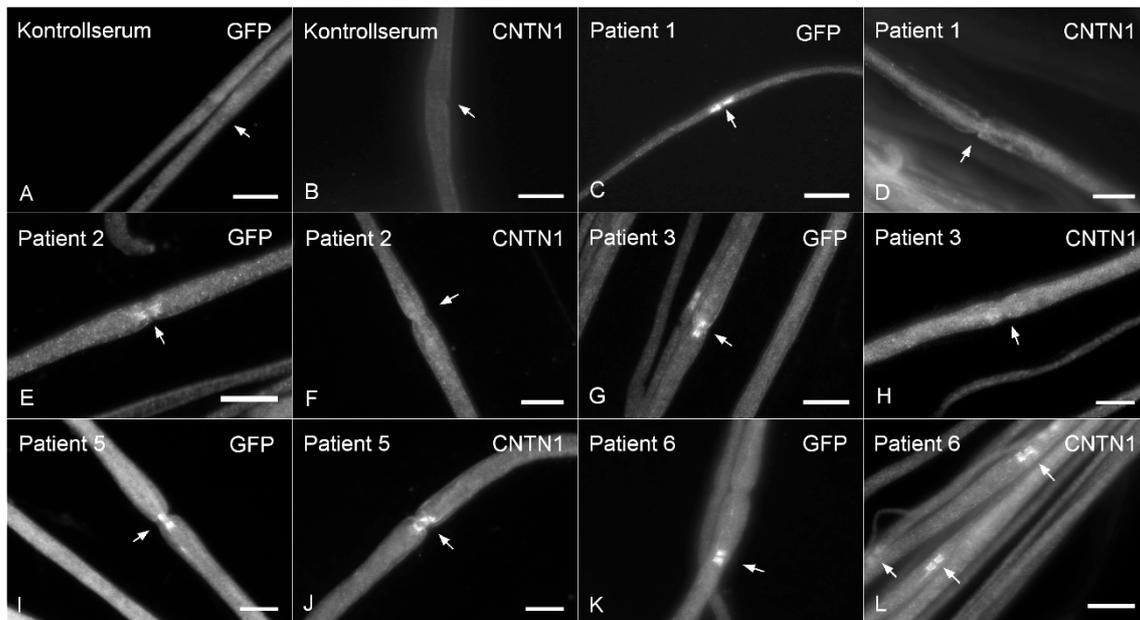
Verteilung der optischen Dichte (y-Achse) in den einzelnen Patientengruppen (x-Achse). Der Schwellenwert für ein positives Ergebnis liegt bei einer OD von 0,562 (durchgezogene Linie). Die OD von vier Patienten der CIDP-Gruppe liegt über dem Schwellenwert. Abkürzungen: CIDP = chronisch inflammatorische demyelisierende Polyneuropathie, EK = „erkrankte Kontrollen“, GBS = Guillain-Barré-Syndrom, GK = gesunde Kontrollen, MMN = multifokale motorische Neuropathie, OD = optische Dichte.

Somit konnten bei Patient 1-4 IgG-Antikörper gegen Contactin-1 nachgewiesen werden. Die drei positiven Patienten (Patient 1-3) zeigten ebenfalls paranodale Bindung an den Zupfnervenpräparaten (vergleiche 5.1); Patient 4 zeigte in der Einzelfärbung an den Zupfnervenpräparaten kein paranodales Bindungsmuster.

#### 5.4.2 Bestätigung der Spezifität über HEK-293-Zell-Präinkubations- und -bindungsversuche

Die Spezifität der Antikörper konnte bei Patient 1-4 über Färbungen von Zupfnervenpräparaten nach Präinkubation mit Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen sowie durch immunhistochemische Färbungen an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen bestätigt werden.

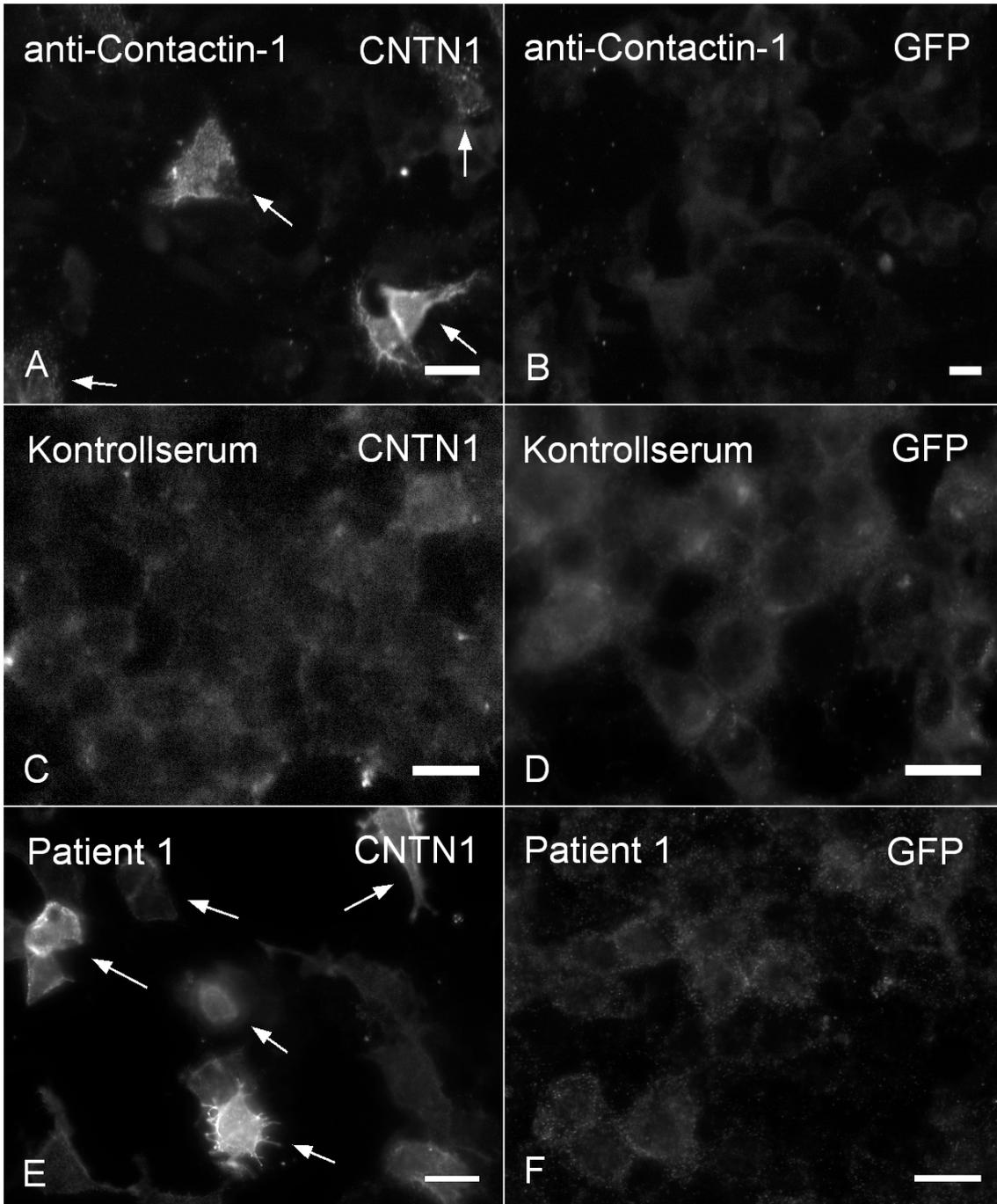
In der Färbung an murinen Zupfnerven zeigte sich ein Verlust des paranodalen Bindungsmusters nach Inkubation mit Contactin-1-transfizierten Zellen (Abbildung 16, D, F, H), nicht aber nach Inkubation mit GFP-transfizierten Zellen (Abbildung 16, C, E, G) bei Patient 1, 2 und 3. Bei Patient 5 und 6 blieb das paranodale Bindungsmuster sowohl nach Inkubation mit Contactin-1- als auch nach Inkubation mit GFP-transfizierten Zellen erhalten (Abbildung 16, I-L).



**Abbildung 16: Zupfnervenfärbung nach Präinkubation mit Contactin-1**

Färbung einer Kontrolle (A, B) und des Materials von Patient 1, 2, 3, 5 und 6 (C-L) nach Präinkubation mit GFP-transfizierten (A, C, E, G, I, K) und Contactin-1 (CNTN1)-transfizierten (B, D, F, H, J, L) HEK-293-Zellen. Es kommt zum Verlust der paranodalen Bindung nach Contactin-1-Präinkubation bei Patient 1-3 (D, F, H), nicht aber bei Patient 5 und 6 (J, L). Die Schnürringe sind mit Pfeilen markiert. Maßstab = 10  $\mu$ m.

In Einzelfärbungen an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen, nicht aber an GFP-transfizierten HEK-293-Zellen, zeigten Patient 1-4 ein spezifisches Bindungsmuster, vergleichbar mit der Färbung des Anti-Contactin-1-Kontrollantikörpers (Abbildung 17, A). Keine weitere Probe der getesteten 60 Kontrollen, 24 MMN-Patienten, 17 GBS-Patienten oder weiteren 74 CIDP-Patienten zeigte dieses Muster. Es ist exemplarisch die Färbung der Positivkontrolle, einer Negativkontrolle und des Serums von Patient 1 jeweils an Contactin-1-transfizierten (Abbildung 17, A, C, E) und GFP-transfizierten (Abbildung 17, B, D, E) HEK-293-Zellen dargestellt.

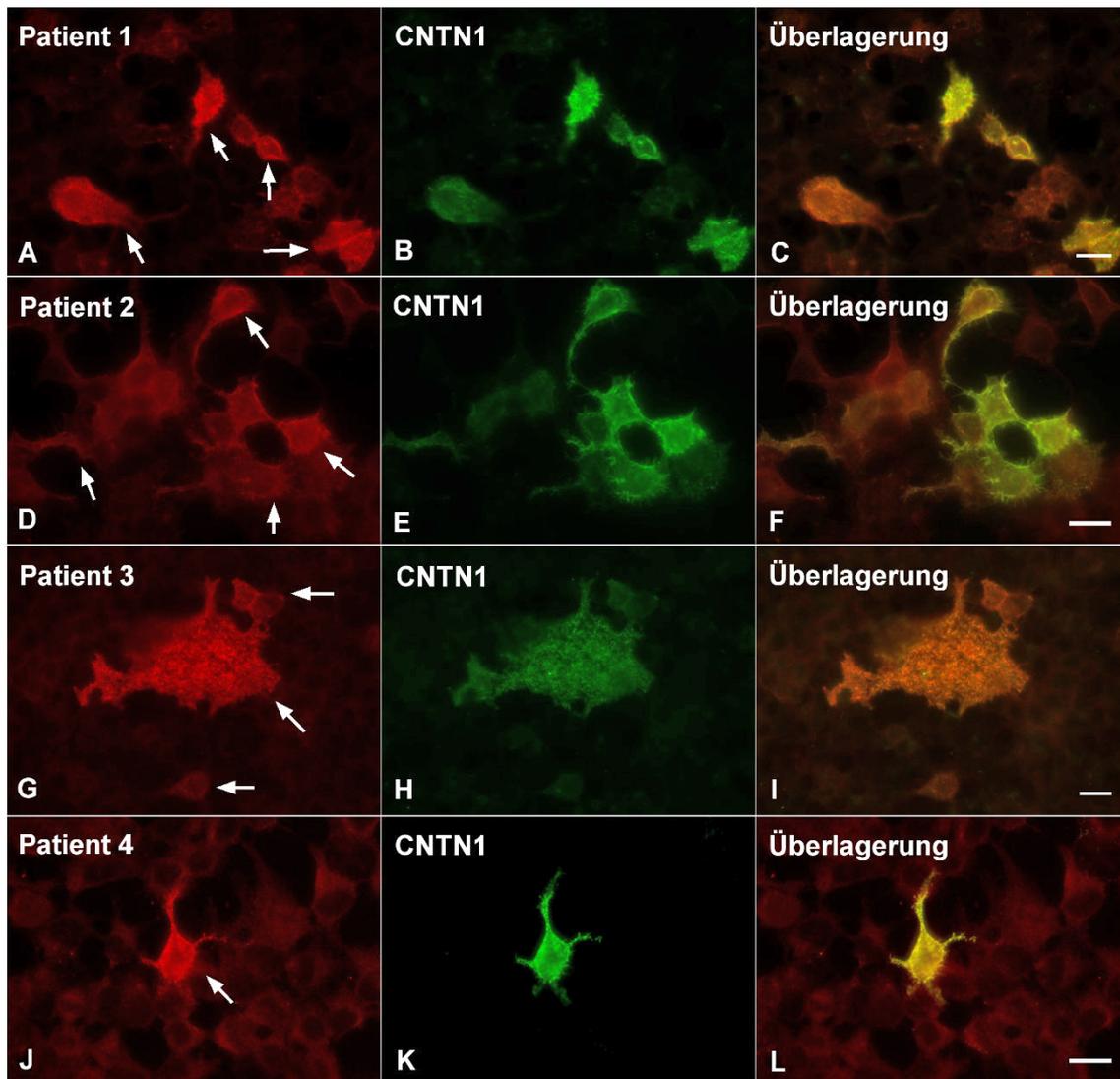


**Abbildung 17: Einzelfärbung an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen**

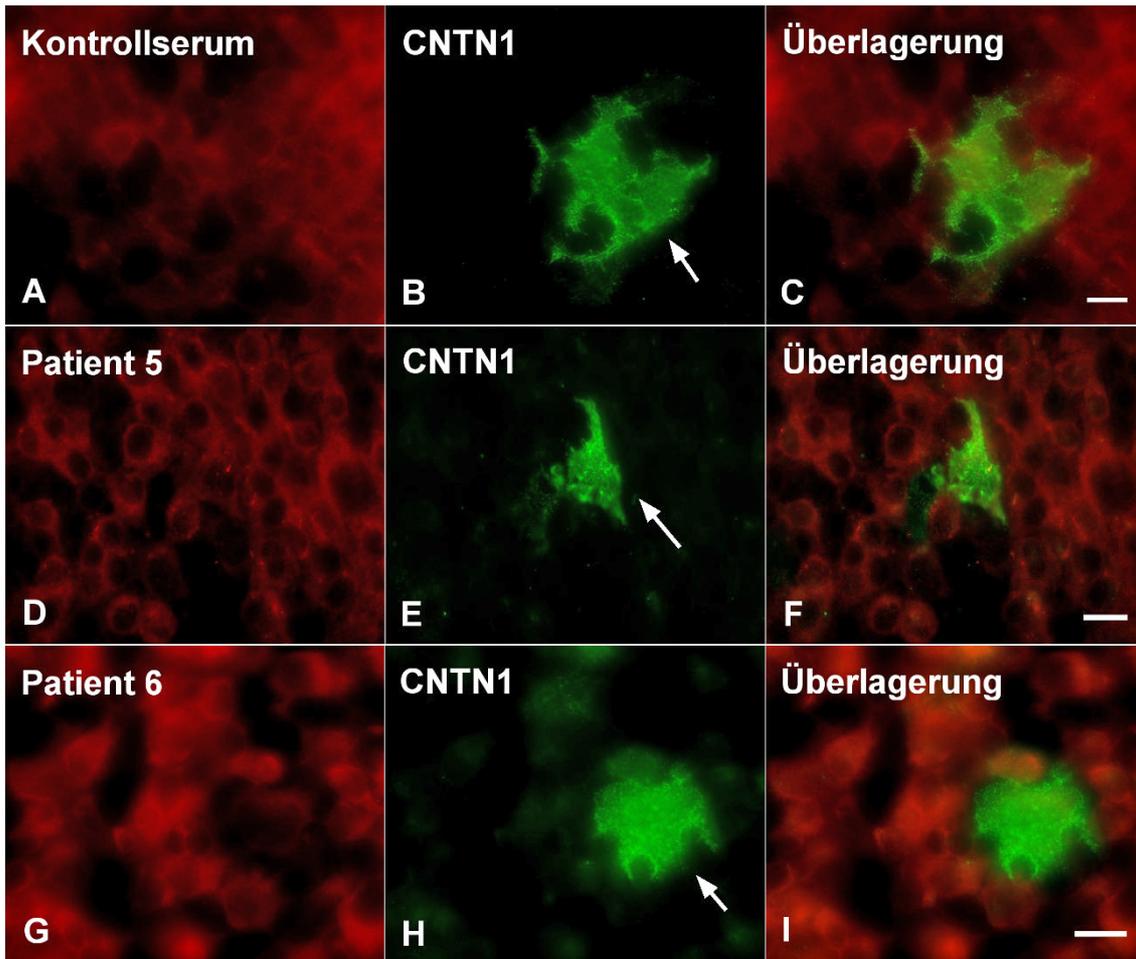
Färbung der Positivkontrolle (A, B) und des Materials einer Kontrolle (C, D) und von Patient 1 (E, F) an Contactin-1 (CNTN1)-transfizierten (A, C, E) und GFP-transfizierten (B, D, F) HEK-293-Zellen. Transfizierte, angefärbte Zellen sind mit Pfeilen markiert (A, E) und indizieren Immunreaktivität gegen Contactin-1 bei der Positivkontrolle (A) und bei Patient 1 (E), nicht aber beim Kontrollserum (C) oder den GFP-transfizierten Zellen (B, D, F). Maßstab = 10 µm.

In der Doppelfärbung mit Anti-Contactin-1 an Contactin-1-transfizierten HEK-Zellen zeigte sich eine Kolokalisation (Abbildung 18, C, F, I, L, gelb) des Serums von

Patient 1 und des PE-Materials von Patient 2, 3 und 4 (Abbildung 18, A, D, G, J, rot) mit dem Kontrollantikörper (Abbildung 18, B, E, H, K, grün), jedoch keine Kolokalisation (Abbildung 19, C, F, I, gelb) des Serums einer Kontrolle, des Serums von Patient 5 und des PE-Materials von Patient 6 (Abbildung 19, A, D, G, rot) mit dem Kontrollantikörper (Abbildung 19, B, E, H, grün) an den Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen (Abbildung 18 und Abbildung 19, Pfeile).



**Abbildung 18: Doppelfärbung mit Anti-Contactin und humanem Material (Patient 1-4) an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen**  
 Färbung von Anti-Contactin-1 (grün), Serum von Patient 1 und PE-Material von Patient 2,3, und 4 (rot) an Contactin-1 (CNTN1)-transfizierten HEK-293-Zellen. Kolokalisation stellt sich in der Überlagerung gelb dar und spricht für das Vorliegen von Antikörpern gegen Contactin-1 (C, F, I, L). Transfizierte Zellen sind mit Pfeilen markiert. Maßstab =10  $\mu$ m.



**Abbildung 19: Doppelfärbung mit Anti-Contactin und humanem Material (Patient 5-6, Kontrolle) an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen**

Färbung von Anti-Contactin-1 (grün), des Serums einer Kontrolle, des Serums von Patient 5 und des PE-Materials von Patient 6 (rot) an Contactin-1 (CNTN1)-transfizierten HEK-293-Zellen. Kolokalisation stellt sich in der Überlagerung gelb dar, liegt allerdings weder bei der Kontrolle (C) noch bei Patient 5 und 6 (F, I) vor. Transfizierte Zellen sind mit Pfeilen markiert. Maßstab = 10  $\mu$ m.

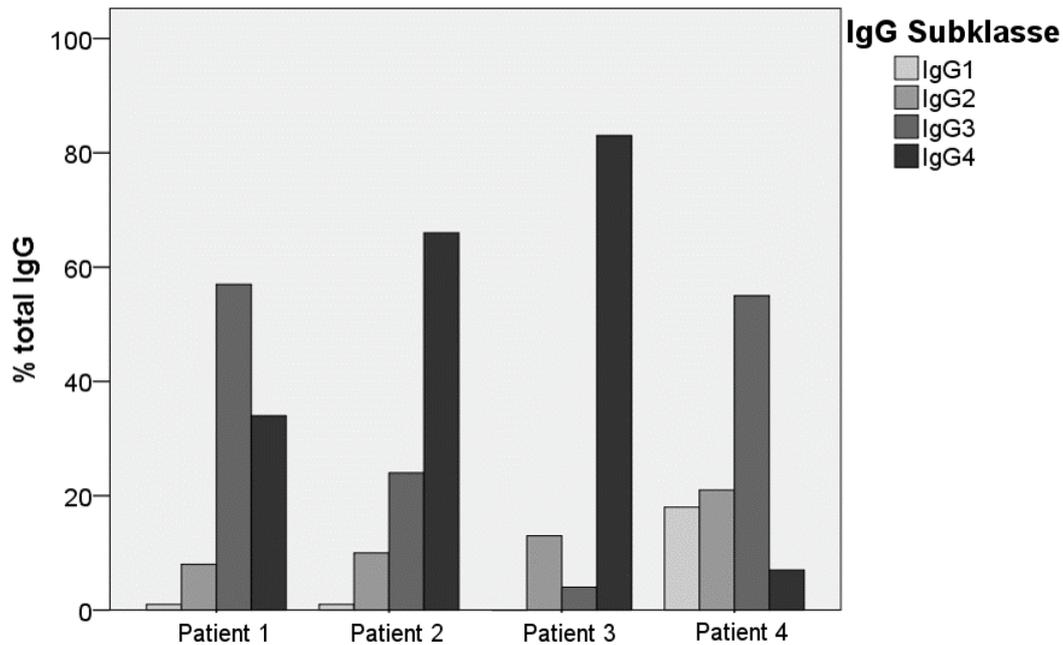
### 5.4.3 Titerbestimmung und IgG-Subklassenanalyse Anti-Contactin-1-positiver Proben mittels ELISA

Die Titer für Anti-Contactin-1-IgG-Antikörper wurden mittels ELISA bei Patient 1 und 3 im Serum sowie im PE-Material, bei Patient 2 und 4, von denen keine Serumprobe verfügbar war, nur im PE-Material über eine Verdünnungsreihe bestimmt und sind in Tabelle 24 festgehalten.

<b>Patient</b>	<b>Serum</b>	<b>PE-Material</b>
Patient 1	1:7500	1:6500
Patient 2	nicht verfügbar	1:2000
Patient 3	1:10.000	1:7000
Patient 4	nicht verfügbar	1:200

*Tabelle 24: Anti-Contactin-1-IgG-Titer im Serum und PE-Material (Patient 1-4)*

Die Anti-Contactin-1-Subklassen bei Patient 1-4 wurden in der Verdünnung für den Contactin-1-ELISA (1:100) mittels subklassenspezifischen Sekundärantikörpern bestimmt. Die Darstellung der jeweiligen OD erfolgte als Prozentwert der OD bei Verwendung des gegen alle IgG-Subklassen gerichteten Sekundärantikörpers (Abbildung 20). Insgesamt fiel bei Patient 1 und 4 eine Prädominanz der Subklasse IgG3 auf, bei Patient 2 und 3 eine Prädominanz der Subklasse IgG4. Die Ergebnisse sind kongruent zur Subklassenanalyse an Zupfnervenpräparaten: hier zeigte Patient 1 Immunreaktivität gegen IgG3 und IgG4, Patient 2 und 3 nur Immunreaktivität gegen IgG4 (vergleiche Kapitel 5.1).



**Abbildung 20: IgG-Subklassen der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4), Verdünnung 1:100**

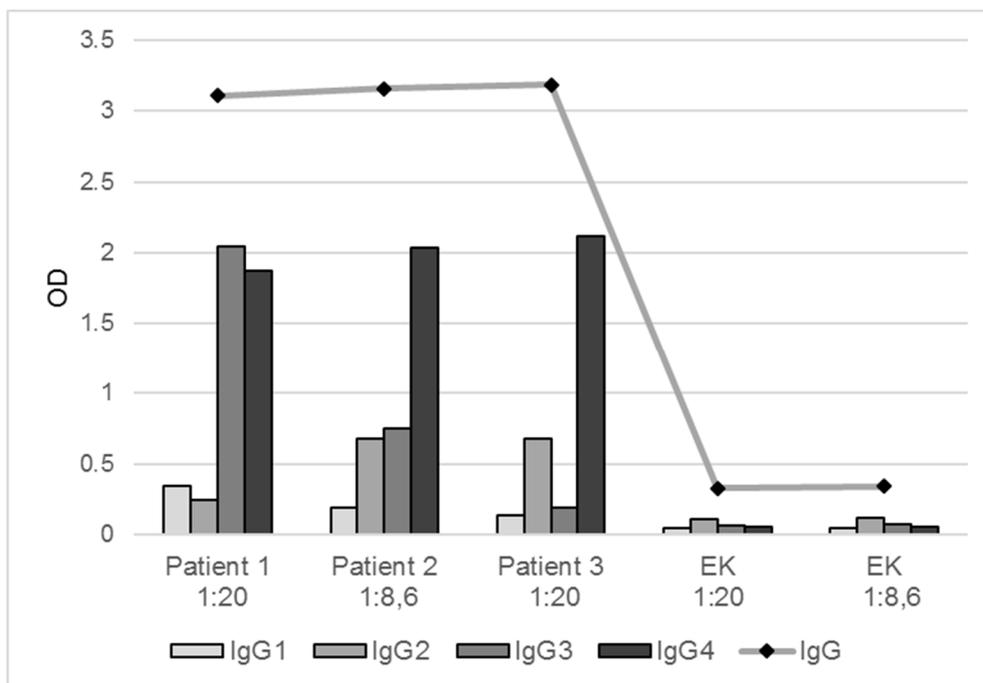
Die OD bei Verwendung des jeweiligen subklassenspezifischen Sekundärantikörpers ist als Prozentwert der OD bei Verwendung des gegen alle IgG-Subklassen gerichteten Sekundärantikörpers (% total IgG) aufgetragen. Patient 1 und 4 zeigen Prädominanz der Subklasse IgG3, Patient 2 und 3 der Subklasse IgG4. Abkürzungen: IgG = Immunglobulin G, OD = optische Dichte, total IgG = Gesamt-IgG-Gehalt.

Bei Patient 1-3 wurde die Subklassenbestimmung zusätzlich nur unter Verwendung von PE-Material in der Verdünnung für die Komplementbindungsversuche -angepasst an den Anti-Contactin-1-Gehalt des PE-Materials (1:20 und 1:8,6)- durchgeführt um so einen direkten Vergleich zwischen den einzelnen Patienten zu ermöglichen. Bei Patient 4 war die Anpassung aufgrund des niedrigen Titers nicht möglich. Als Kontrolle wurde das PE-Material einer „erkrankten Kontrolle“ (Patient mit MS) je in einer Verdünnung von 1:20 und 1:8,6 verwendet. Die OD des gegen alle IgG-Subklassen gerichteten Sekundärantikörpers war bei Patient 1-3 etwa gleich hoch. Im PE-Material von Patient 1-3 zeigten sich im quantitativen Vergleich ähnlich hohe ODs für IgG4, für IgG3 allerdings bei Patient 1 eine deutlich höhere OD als bei Patient 2 und 3. Es lagen ebenfalls IgG-Antikörper der anderen Subklassen bei allen Patienten vor, allerdings in geringerer Menge. Die OD-Werte sind in Tabelle 25 festgehalten; illustriert werden die Ergebnisse in Abbildung 21.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG
Patient 1	0,345	0,247	2,040	1,870	3,107
Patient 2	0,190	0,681	0,755	2,036	3,159
Patient 3	0,140	0,682	0,190	2,121	3,187

**Tabelle 25: IgG-Subklassen der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4), angepasst an den Anti-Contactin-1-Gehalt**

OD von Patient 1-3 in einer an den Anti-Contactin-1-Gehalt angepassten Verdünnung bei Verwendung subklassenspezifischer Sekundärantikörper (IgG1-4) und eines gegen alle IgG-Subklassen IgG1-4 gerichteten Sekundärantikörpers (IgG) im Anti-Contactin-1-IgG-ELISA.

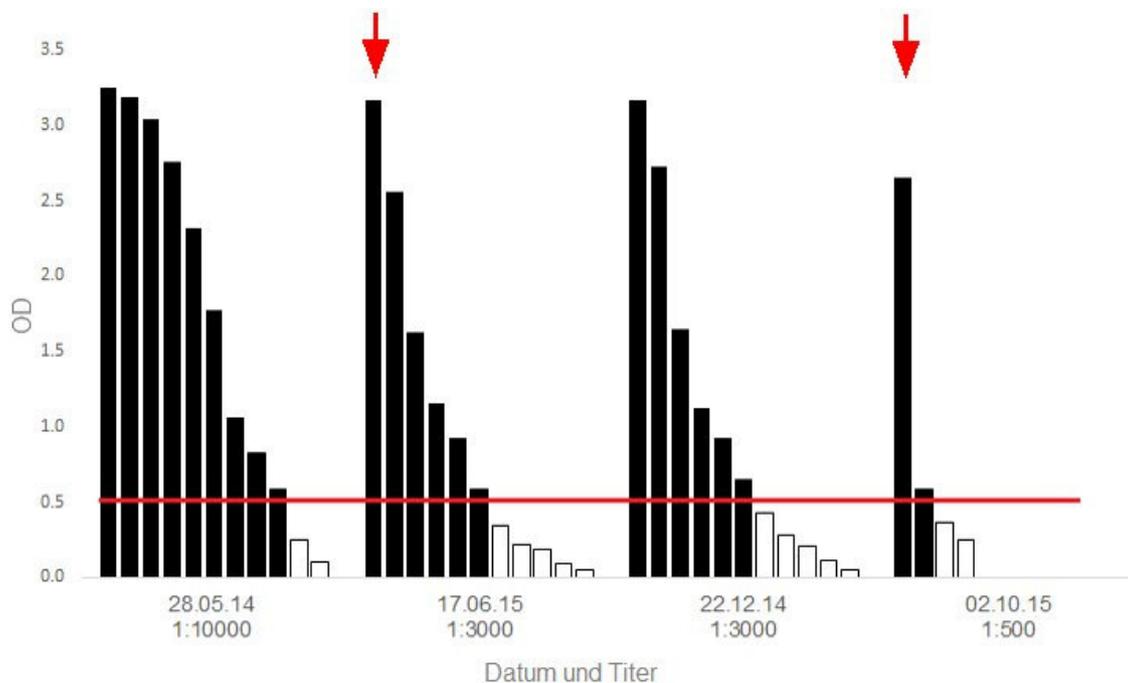


**Abbildung 21: IgG-Subklassen der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-3) angepasst an den Anti-Contactin-1-Gehalt**

OD der IgG-Subklassen im PE-Material von Patient 1-3 bei einer Verdünnung angepasst an den Anti-Contactin-1-Gehalt. y-Achse: optische Dichte (OD), x-Achse: Patient 1-3 und Kontrolle (EK) in einer Verdünnung 1:20 und/oder 1:8,6. Die OD unter Verwendung eines gegen alle IgG-Subklassen gerichteten Sekundärantikörpers (IgG) ist als durchgezogene Linie aufgetragen. Abkürzungen: EK = „erkrankte Kontrolle“, IgG = Immunglobulin G, OD = optische Dichte. Modifiziert nach (Appeltshauer et al, 2017), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

#### 5.4.4 Reduktion der Anti-Contactin-1-Antikörper bei einer Patientin (Patient 3) im Therapieverlauf

Bei einer Patientin (Patient 3) wurde bei jedem stationären Aufenthalt eine Serumprobe entnommen und der Titer mittels einer Verdünnungsreihe im ELISA bestimmt. Unter Therapie mit Rituximab kam es zu einer Reduktion des Anti-Contactin-1-Titers von initial 1:10.000 (Mai 2014) auf 1:500 (Oktober 2015) (Abbildung 22). Der parallele klinische Verlauf unter Therapie ist in Kapitel 5.6.4 detailliert beschrieben.



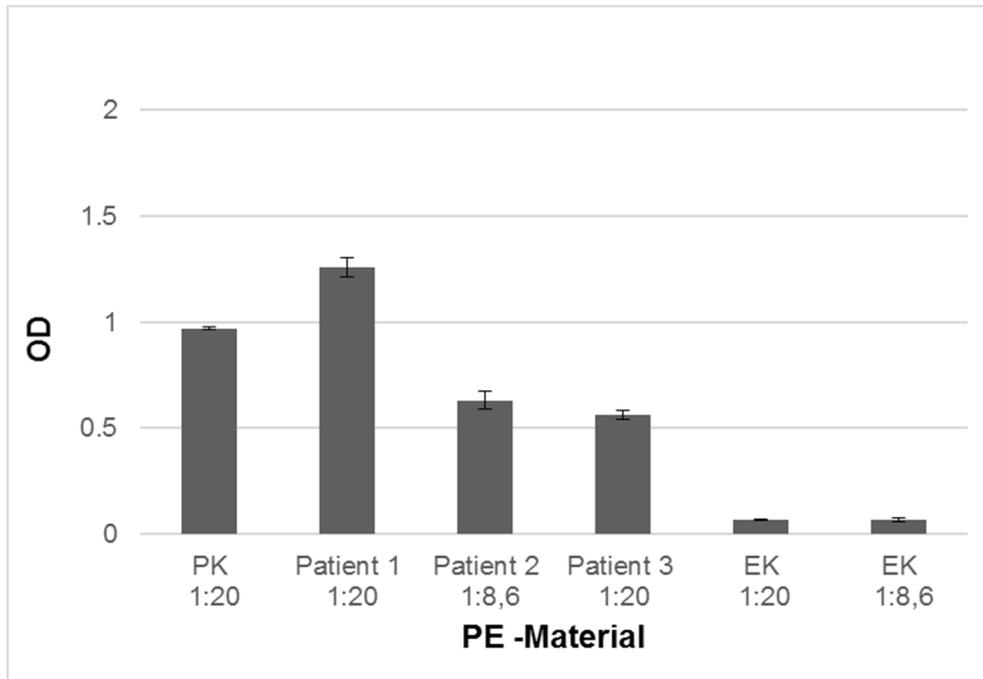
**Abbildung 22: ELISA-Verdünnungsreihen zur Bestimmung des Anti-Contactin-1-IgG-Titer zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Patient 3)**

Es ist die optische Dichte (OD) einer Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:50.000 von unterschiedlichen Serumproben (Abnahmedatum auf der x-Achse, darunter jeweiliger Titer) als Balkendiagramm dargestellt. Positive Werte über dem Schwellenwert (durchgezogene rote Linie) sind schwarz, negative weiß eingezeichnet. Die Zeitpunkte der Rituximab-Gabe sind mit roten Pfeilen markiert.

#### 5.4.5 Komplementbindung und -aktivierung durch Anti-Contactin-1-Autoantikörper

Bei den Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-3) wurde das Komplementbindungsverhalten über ELISA- und HEK-293-Zell-basierte Versuche analysiert. Die Verdünnungen wurden über Berechnung angepasst. Bei allen verwendeten Patientenproben lag so der gleiche Gehalt an Anti-Contactin-1-Autoantikörpern vor; dies wurde über einen ELISA mit Proben in der berechneten Verdünnung verifiziert. Das Verhältnis der OD der einzelnen Patienten zueinander lag hierbei zwischen 0,98 und 1,01 bei einem optimalen Verhältnis von 1,00 (vergleiche Kapitel 4.4.2.3). Folglich war ein quantitativer Vergleich bei Patient 1-3 möglich. Bei Patient 4 war die Anpassung der Verdünnung aufgrund des niedrigen Anti-Contactin-1-Titers (1:200) methodisch nicht durchführbar, daher wurde dieser von den folgenden Versuchen ausgeschlossen.

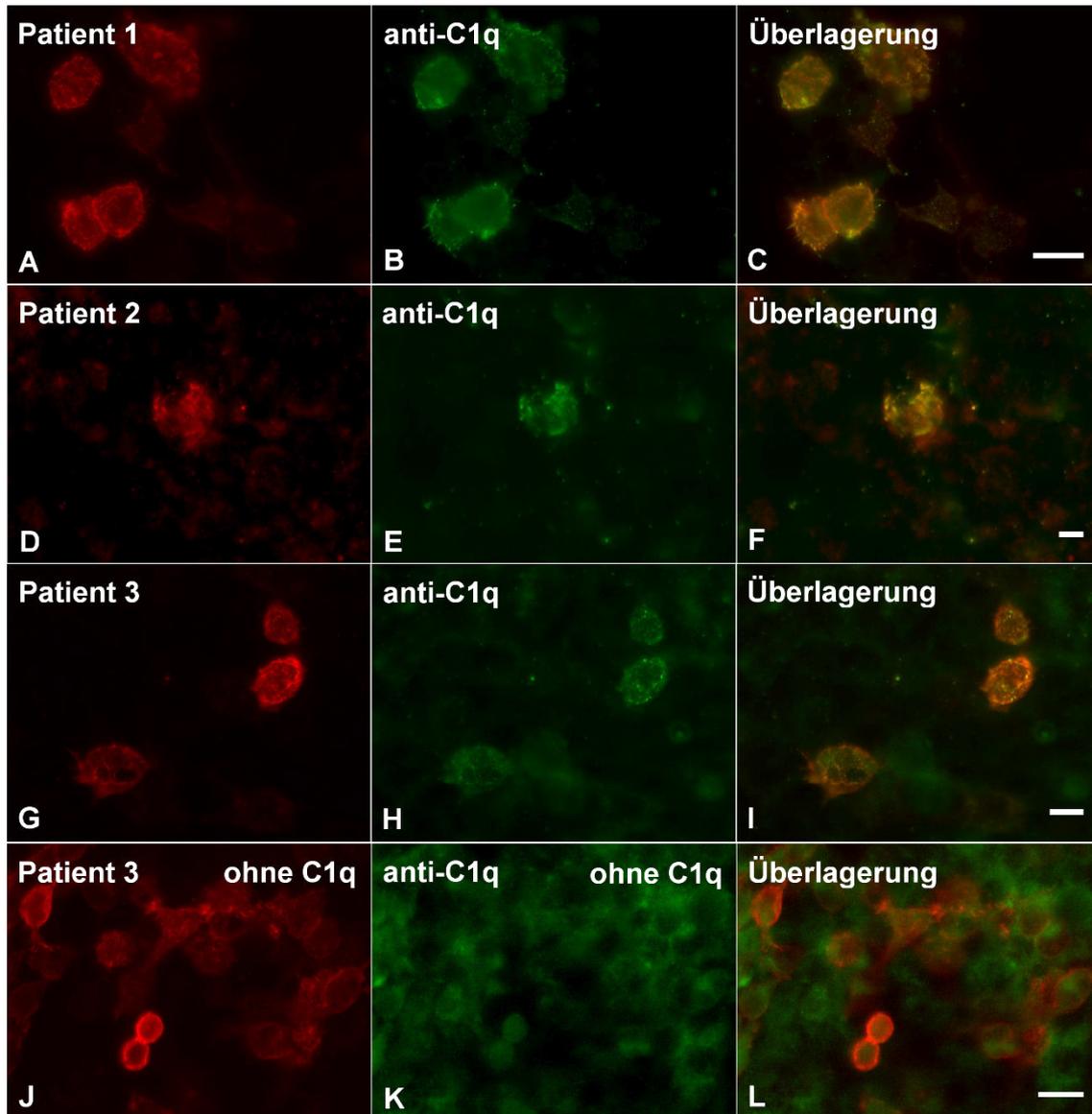
Im ELISA-basierten Komplementbindungsversuch mit C1q (siehe Abbildung 23) zeigte sich bei Patient 1 die höchste Komplementbindung (OD = 1,260), gefolgt von Patient 2 (OD= 0,629) und Patient 3 (OD= 0,562). Die Positivkontrolle eines kommerziellen Anti-Contactin-1-IgG1-Antikörpers zeigte ebenfalls C1q-Bindung (OD = 0,971); jedoch diente dies zum qualitativen, nicht quantitativen Vergleich, da es sich um einen nicht-humanen Antikörper mit unbekanntem Anti-Contactin-1-Gehalt handelte. Das PE-Material der „erkrankten Kontrollen“ wies je in der Verdünnung 1:20 und 1:8,6 keine C1q-Bindung auf (Mittelwert der OD 0,066 für 1:20 und 0,067 für 1:8,6).



**Abbildung 23: ELISA-basierter C1q-KBV**

Darstellung der Positivkontrolle (PK) sowie des PE-Materials von Patient 1-3 und vier „erkrankter Kontrollen“ (EK) in den an den Anti-Contactin-1-Gehalt angepassten Verdünnungen 1:20 bzw. 1:8,6. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert der optischen Dichte (OD) mit Standardabweichung als Fehlerbalken (y-Achse) bei den einzelnen Patienten und Kontrollen (x-Achse). Modifiziert nach (Appeltshauser et al, 2017), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

An Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen wurde ebenfalls die Bindung von Komplement unter Verwendung von Serum (Patient 1, 3) und PE-Material (Patient 2) untersucht. Eine quantitative Auswertung konnte nicht erfolgen, da in den HEK-293-Zell-basierten Versuchen die Verdünnung nicht an den Anti-Contactin-1-Gehalt der Patientenproben angepasst wurde, um eine unterschiedlich starke Anfärbung des Hintergrunds zu vermeiden. Bei Patient 1-3 kam es nach Bindung der Anti-Contactin-1-Antikörper an Contactin-1-transfizierte HEK-293-Zellen (Abbildung 24, A, D, G) zur Ablagerung von C1q, illustriert durch einen fluoreszenzmarkierten Anti-C1q-Sekundärantikörper (Abbildung 24, B, E, H), welcher mit den IgG-spezifischen Sekundärantikörpern kolokalisierte (Abbildung 24, C, F, I, gelb). Wurde statt mit C1q mit Blockierungslösung inkubiert (exemplarisch dargestellt für Patient 3, Abbildung 24, J-L), kam es zu keiner Kolokalisation der beiden Sekundärantikörper.

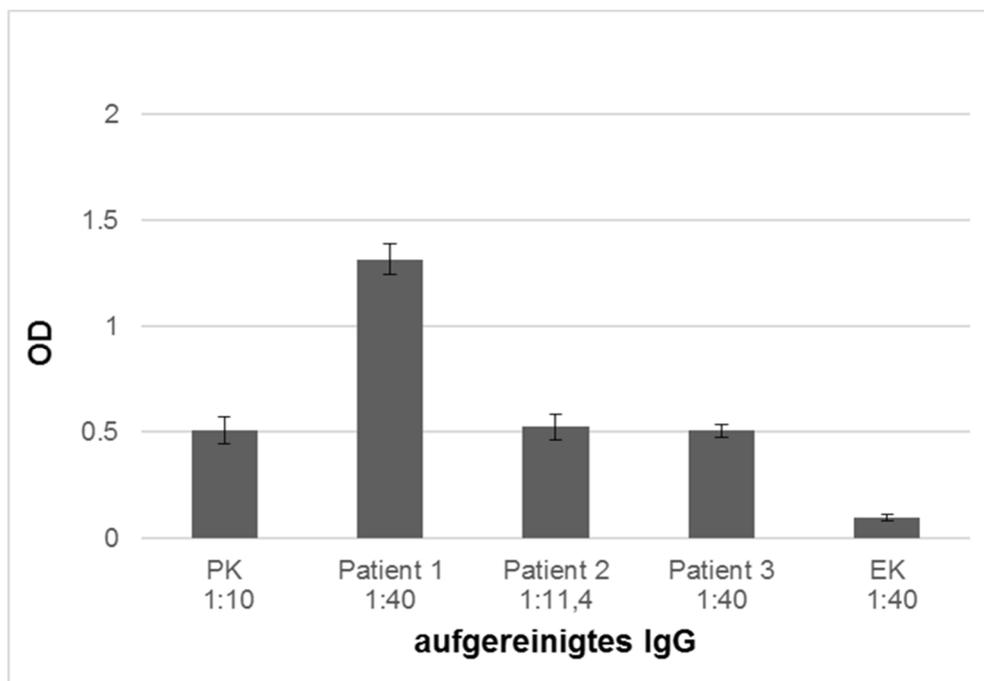


**Abbildung 24: HEK-293-Zell-basierter C1q-KBV (Patient 1-3)**

Darstellung der Bindung des Serums von Patient 1 und 3 und des PE-Materials von Patient 2 (rot) an Contactin-1-transfizierte HEK-293-Zellen und Bindung von C1q an die Antikörper (grün, B, E, H). Kolokalisation stellt sich in der Überlagerung gelb dar und ist bei Patient 1-3 nachweisbar (C, F, I), nicht jedoch in Abwesenheit von C1q (L). Maßstab = 10  $\mu$ m.

Die Anti-Contactin-1-Autoantikörper bei Patient 1-3 bewirkten *in vitro* nicht nur eine Bindung, sondern auch eine Aktivierung von Komplement, nachweisbar durch die Ablagerung von C3c im ELISA-basierten Komplementaktivierungsversuch unter Verwendung von aufgereinigtem IgG-Material von Patient 1-3 und einer „erkrankten Kontrolle“ (Patient mit inflammatorischer Polyneuropathie ohne

Autoantikörper) je in den an den Anti-Contactin-1-Gehalt angepassten Verdünnungen 1:40 und 1:11,4 (Abbildung 25). Der kommerziell erworbene Anti-Contactin-1-IgG1-Antikörper führte zur Bindung von C3c (OD = 0,504), nicht jedoch das aufgereinigte IgG der Kontrolle (OD = 0,097). Analog zur Menge des gebundenen Komplements konnte bei Patient 1 die größte Menge an C3c nachgewiesen werden (OD = 1,315), gefolgt von Patient 2 (OD = 0,522) und Patient 3 (0,503). Somit bewirkten die Anti-Contactin-1-Autoantikörper bei Patient 1 die stärkste Komplementaktivierung unter den getesteten Patienten (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25: C3c-KAV (Patient 1-3)**

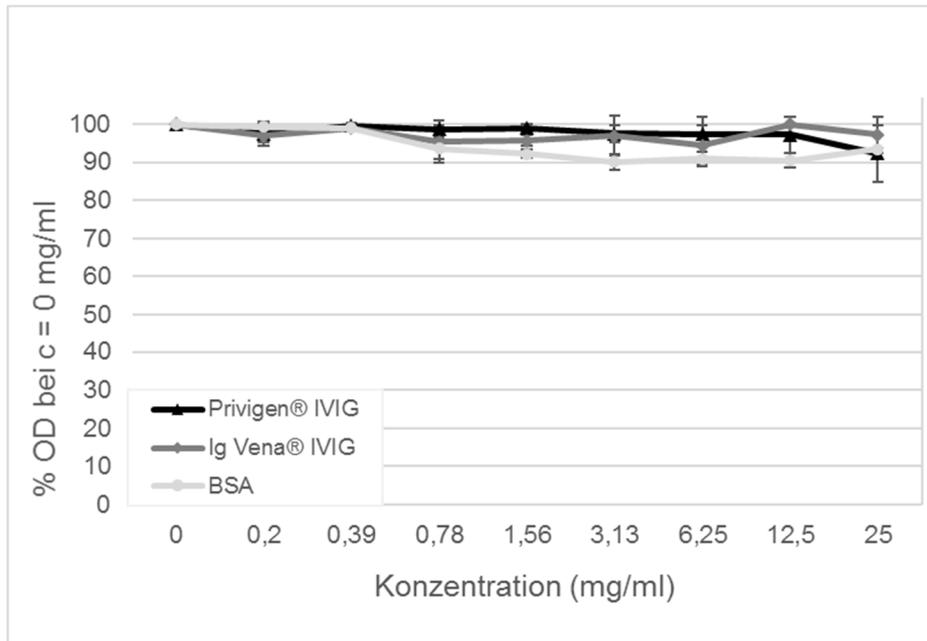
Darstellung der Positivkontrolle (PK) in einer Verdünnung von 1:10 sowie des PE-Materials von Patient 1-3 und vier „erkrankter Kontrollen“ (EK) in den an den Anti-Contactin-1-Gehalt angepassten Verdünnungen 1:40 bzw. 1:11,4. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert der optischen Dichte (OD) mit Standardabweichung als Fehlerbalken (y-Achse) bei den einzelnen Patienten und Kontrollen (x-Achse). Modifiziert nach (Appeltshauer et al, 2017), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

## 5.4.6 Effekte von IVIG

Beim PE-Material von Patient 1-3 wurde der Einfluss von IVIG auf die Anti-Contactin-1-Bindung an das Zielantigen sowie auf die Komplementbindung durch Anti-Contactin-1-Antikörper mittels ELISA- und HEK-293-Zell-basierten Methoden untersucht. Dabei zeigte sich kein Einfluss auf die Antikörperbindung, wohl aber ein hemmender Effekt auf die Komplementbindung und -aktivierung.

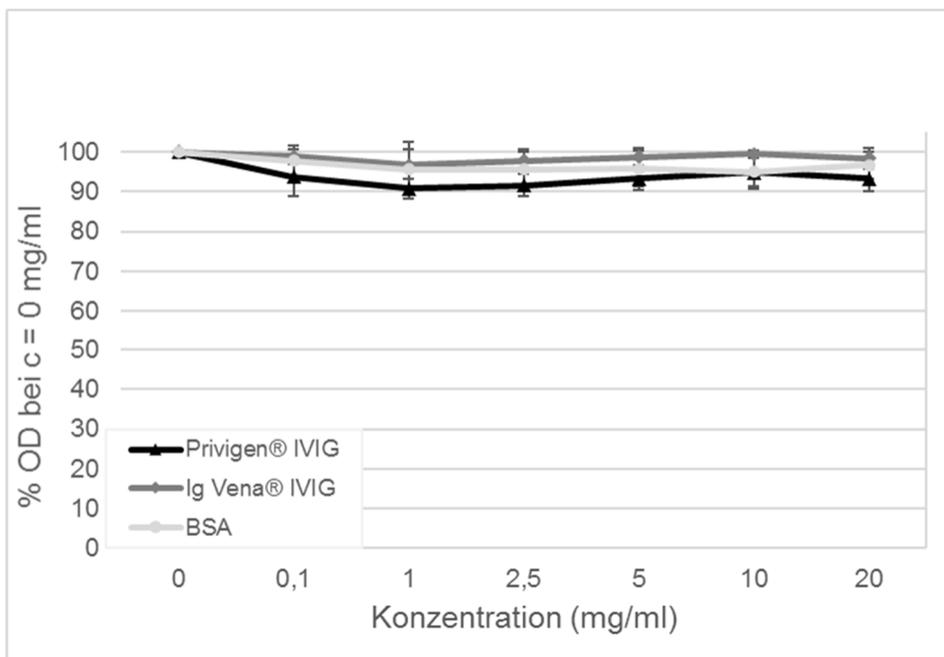
### 5.4.6.1 Keine Inhibierung oder Destabilisierung der Anti-Contactin-1-Antikörperbindung durch Zugabe von IVIG im ELISA und HEK-293-Zell-gestützten Versuch

Bei Koinkubation von IVIG und BSA mit dem Patientenmaterial (Abbildung 26) sowie bei einer Zugabe von IVIG und BSA nach Inkubation mit dem Patienten- oder Kontrollmaterial (Abbildung 27) im Anti-Contactin-1-ELISA zeigte sich konzentrationsunabhängig eine stabile OD und somit keine Inhibierung oder Destabilisierung der Bindung von Anti-Contactin-1 durch die Zugabe von IVIG.



**Abbildung 26: ELISA unter Inkubation von IVIG mit dem Primärantikörper**

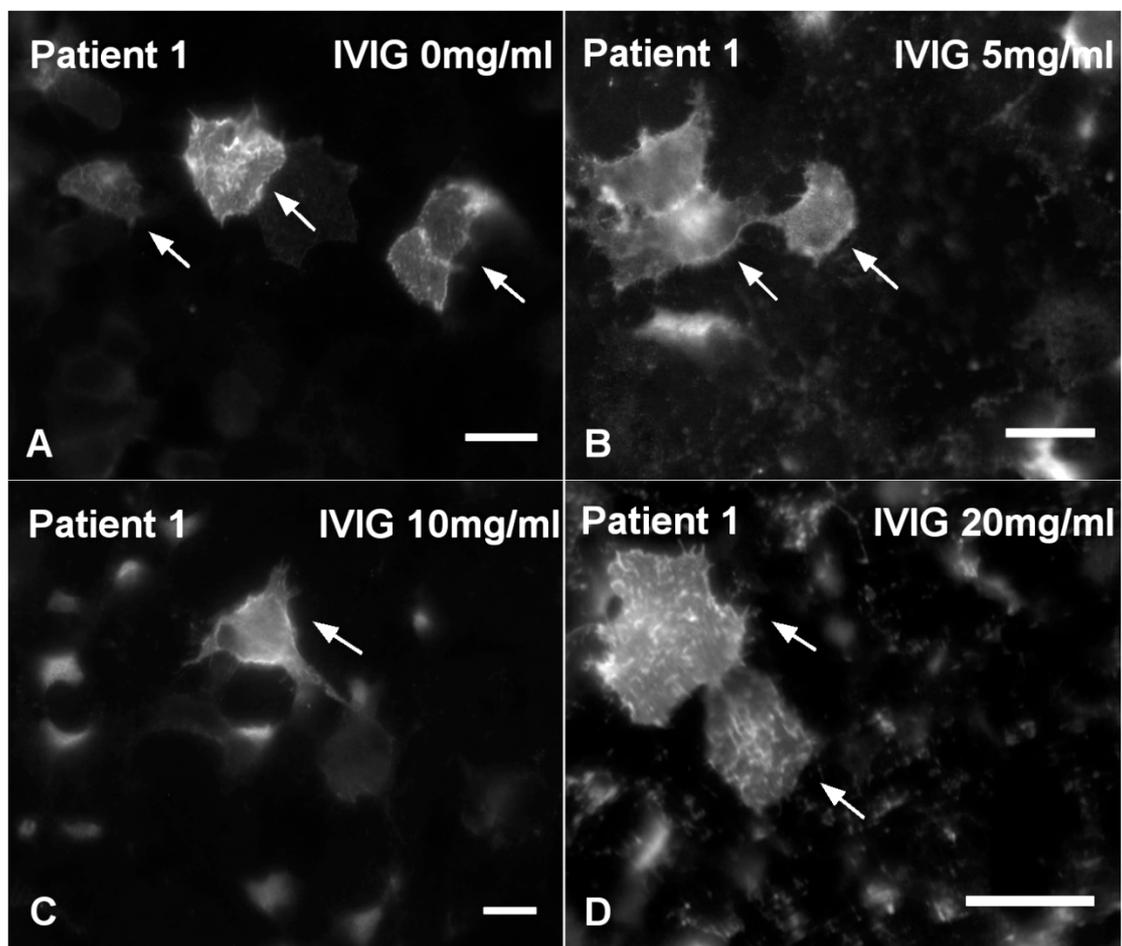
Es ist jeweils das Verhältnis der OD bei einer Zugabe von IVIG/BSA in unterschiedlichen Verdünnungen (x-Achse) zur OD ohne Zugabe von IVIG/BSA als Mittelwert aller drei Patienten mit Standardabweichung (Fehlerbalken) jeweils für Privigen® IVIG, Ig Vena® und BSA abgebildet. Modifiziert nach (Appeltshauser et al, 2017), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.



**Abbildung 27: ELISA unter Inkubation von IVIG nach dem Primärantikörper**

Es ist jeweils das Verhältnis der OD bei einer Zugabe von IVIG/BSA in unterschiedlichen Verdünnungen (x-Achse) zur OD ohne Zugabe von IVIG/BSA als Mittelwert aller drei Patienten mit Standardabweichung (Fehlerbalken) jeweils für Privigen® IVIG, Ig Vena® und BSA abgebildet. Modifiziert nach (Appeltshauser et al, 2017), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

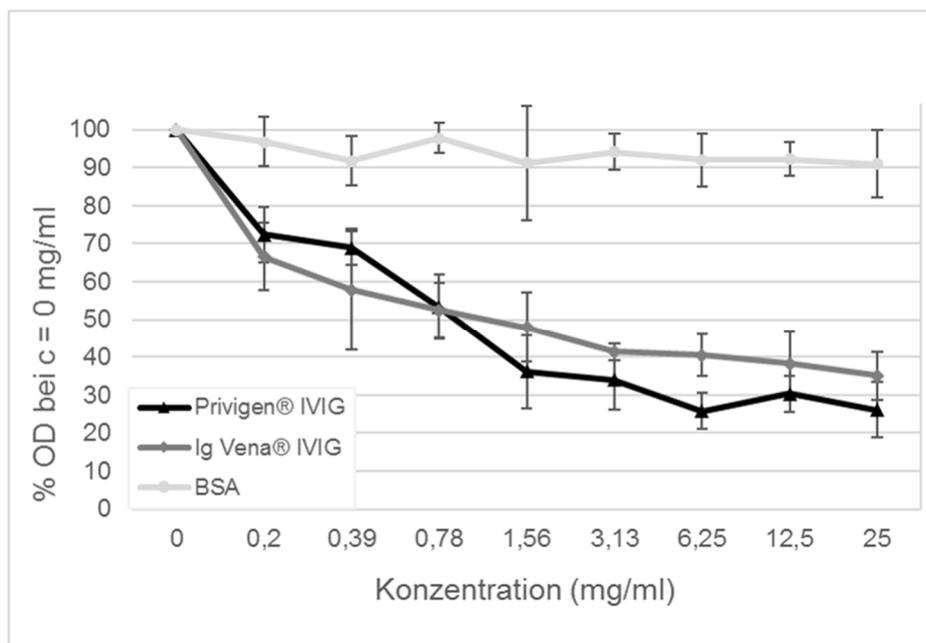
Auch an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen führte die Zugabe von IVIG in unterschiedlichen Konzentrationen mit und nach Inkubation mit dem Patientenmaterial nicht zur Intensitätsminderung in der Einzelfärbung. Exemplarisch ist dies für Patient 1 ohne Zugabe von Privigen® IVIG (Abbildung 28, A) sowie unter Koinkubation des Patientenmaterials mit Privigen® IVIG 5 mg/ml, 10 mg/ml und 20 mg/ml (Abbildung 28, B-C) dargestellt. Es ist zu beachten, dass die Zugabe von IVIG in höheren Konzentrationen die unspezifische Hintergrundfärbung erhöhte, daher die Belichtungszeit bei den Aufnahmen automatisch angepasst wurde und so die Intensität der transfizierten Zellen nicht dem Original entspricht.



**Abbildung 28: Bindung an Contactin-1-transfizierte HEK-293-Zellen unter Zugabe von IVIG (Patient 1)**  
 Bindung des Serums von Patient 1 an Contactin-1-transfizierte HEK-Zellen ohne Zugabe (A) und mit Zugabe von IVIG 5 mg/ml (B), 10 mg/ml (C) und 20 mg/ml (D). Transfizierte, angefärbte Zellen sind mit Pfeilen markiert. Maßstab = 10 µm.

#### 5.4.6.2 Dosisabhängige Inhibierung der Komplementbindung durch Anti-Contactin-1-Autoantikörper unter Zugabe von IVIG im ELISA

Bei Koinkubation von IVIG in Konzentrationen von 0,2-25 mg/ml zusammen mit C1q im ELISA-basierten Komplementbindungsversuch kam es bei allen drei Patienten zur starken, konzentrationsabhängigen Abnahme der OD im Vergleich zum Ausgangswert ohne IVIG-Zugabe (Mittelwert 26% des Ausgangswertes für Privigen® IVIG und 35% für Ig Vena® bei 25 mg/ml), nicht aber bei Koinkubation mit BSA in gleichen Konzentrationen (Abbildung 29).

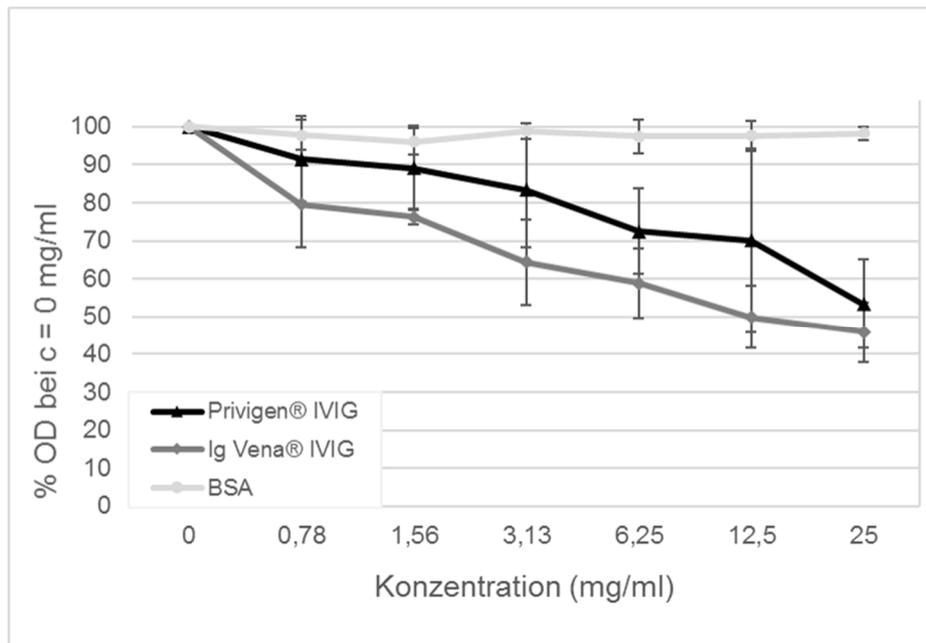


**Abbildung 29: C1q-KBV unter Inkubation von IVIG/BSA mit C1q**

Es ist jeweils das Verhältnis der OD bei einer Zugabe von IVIG/BSA in unterschiedlichen Verdünnungen (x-Achse) zur OD ohne Zugabe von IVIG/BSA als Mittelwert aller drei Patienten mit Standardabweichung (Fehlerbalken) jeweils für Privigen®, Ig Vena® und BSA abgebildet. Modifiziert nach (Appeltshauer et al, 2017), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Bei einer Inkubation von IVIG in gleichen Konzentrationen nach Zugabe von C1q kam es bei allen drei Patienten zu einer weniger starken, dosisabhängigen Abnahme der OD im Vergleich zum Ausgangswert ohne IVIG-Zugabe (Mittelwert 53% des Ausgangswertes für Privigen® IVIG und 46% für Ig Vena® bei 25 mg/ml). Bei einer Inkubation von BSA in gleichen Konzentrationen nach Zugabe von C1q zeigte sich keine deutliche Änderung der OD (Abbildung 30).

Im HEK-293-Zell-basierten Versuch wurde der Einfluss von IVIG auf die Komple-  
mentbindung nicht untersucht, weil durch die hohe Hintergrundfärbung nach  
IVIG-Zugabe eine sichere Auswertung nicht möglich war.

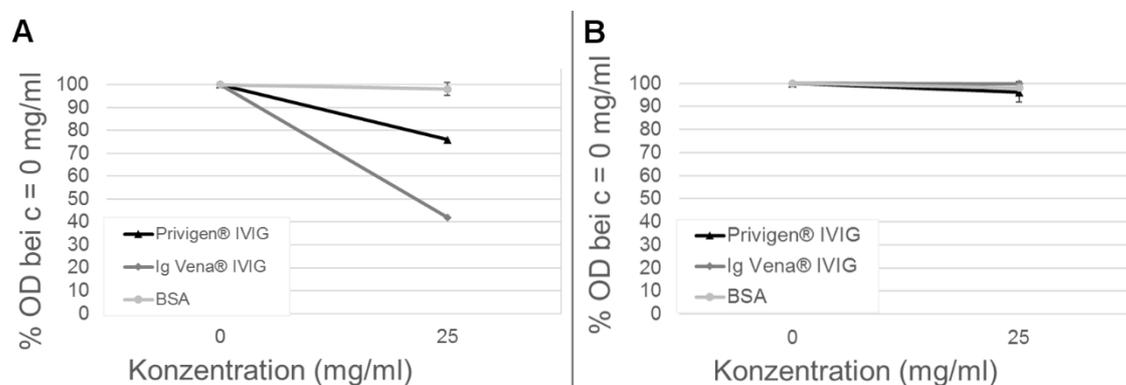


**Abbildung 30: C1q-KBV unter Inkubation von IVIG/BSA nach C1q**

Es ist jeweils das Verhältnis der OD bei einer Zugabe von IVIG/BSA in unterschiedlichen Verdünnungen (x-Achse) zur OD ohne Zugabe von IVIG/BSA als Mittelwert aller drei Patienten mit Standardabweichung (Fehlerbalken) jeweils für Privigen®, Ig Vena® und BSA abgebildet. Modifiziert nach (Appeltshauser et al, 2017), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Immunglobuline haben also einen hemmenden Einfluss auf die Komplementbin-  
dung durch Anti-Contactin-1-Antikörper *in vitro*.

Im Komplementaktivierungsversuch (KAV) mit aufgereinigtem IgG unter Zugabe von IVIG/BSA wurde nur bei Patient 1 unter Zugabe von IVIG in einer Konzentration von 25 mg/ml eine Reduktion der OD auf 76% (Privigen® IVIG) beziehungsweise 42% (Ig Vena®) im Vergleich zum KAV ohne IVIG-Zugabe beobachtet, jedoch keine Reduktion unter Zugabe von BSA 25 mg/ml (Abbildung 31, A). Bei Patient 2 und 3 hatte die Zugabe von IVIG/BSA 25 mg/ml keinen Einfluss auf die OD (Mittelwert 96% des Ausgangswertes für Privigen® IVIG und 99% für Ig Vena®) und somit auf die Komplementaktivierung durch Anti-Contactin-1-Autoantikörper (Abbildung 31, B). Bei Verwendung von IVIG/BSA in niedrigeren Konzentrationen zeigte sich bei keinem Patienten eine OD-Änderung im Vergleich zum Ausgangswert (die Daten werden nicht gezeigt).



**Abbildung 31: C3c-KAV unter Inkubation von IVIG/BSA**

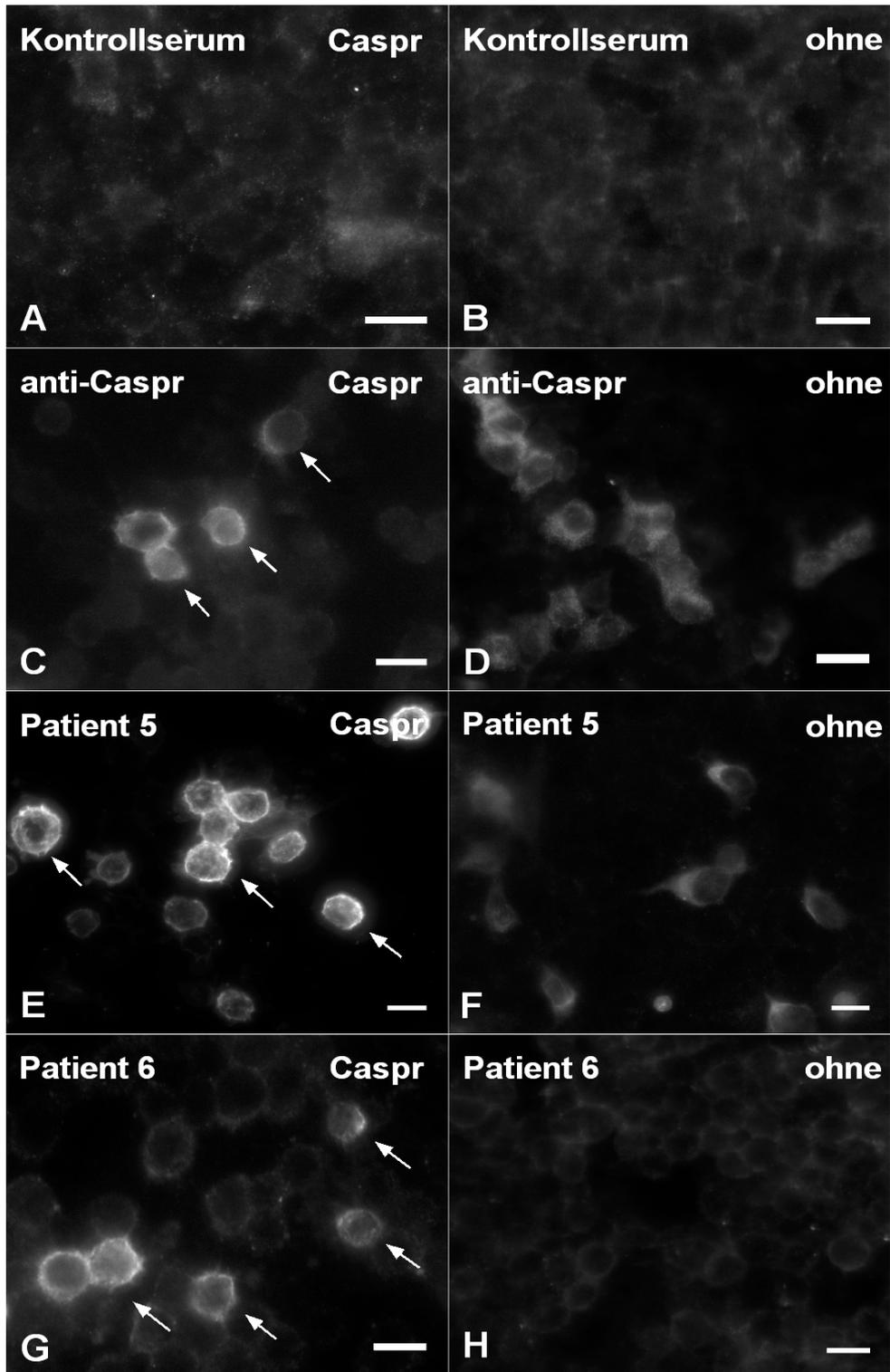
Es ist jeweils das Verhältnis der OD bei einer Zugabe von IVIG/BSA 25 mg/ml zur OD ohne Zugabe von IVIG/BSA bei Patient 1 (A) und als Mittelwert mit Standardabweichung (Fehlerbalken) bei Patient 2 und 3 (B) jeweils für Privigen®, Ig Vena® und BSA abgebildet. Modifiziert nach (Appeltshauser et al, 2017), mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

## 5.5 Detektion und Analyse von Anti-Caspr-Autoantikörpern

Bei Patient 5 und 6, welche ebenfalls eine paranodale Bindung an den Zupfnerven zeigten, jedoch negativ für Anti-Contactin-1 und Anti-Neurofascin-155 waren, konnten Anti-Caspr-Antikörper im HEK-293-Zell-basierten Versuch nachgewiesen werden. Diese wurden über Präinkubationsversuche bestätigt und näher charakterisiert.

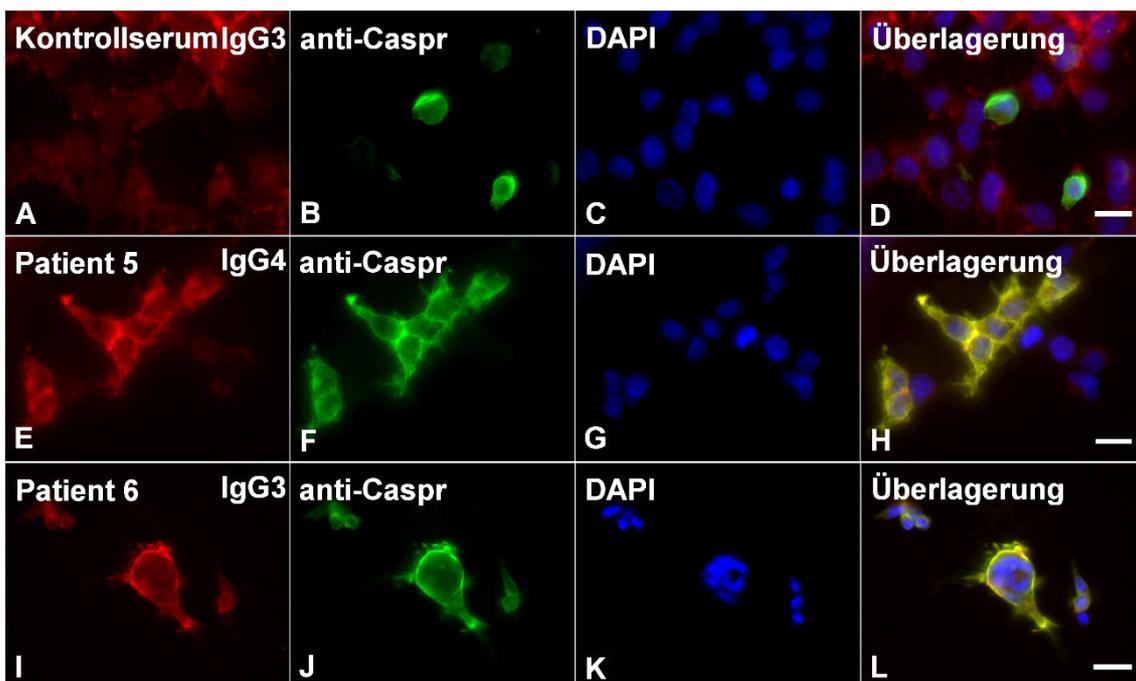
### 5.5.1 HEK-293-Zell-basierte Detektion von Anti-Caspr-IgG4-Autoantikörpern bei einem Patienten mit CIDP (Patient 5) und Anti-Caspr-IgG3-Autoantikörpern bei einer Patientin mit GBS (Patient 6)

In der Einzelfärbung an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen konnte im Serum von Patient 5 mit CIDP und im PE-Material von Patient 6 mit GBS eine hohe Immunreaktivität an Caspr-transfizierten Zellen, nicht jedoch an nicht-transfizierten, Neurofascin-155- oder Contactin-1-transfizierten Zellen detektiert werden. Die Färbung an Caspr-transfizierten Zellen zeigte sich weder bei den anderen Patienten (Patient 1-4) mit einem paranodalen Bindungsmuster an Zupfnerven noch bei den 25 getesteten Normalkontrollen oder den 10 „erkrankten Kontrollen“. Exemplarisch ist dies für ein Kontrollserum, die Positivkontrolle sowie für Patient 5 und 6 jeweils an Caspr-transfizierten (Abbildung 32, A, C, E, G) und nicht transfizierten Zellen (Abbildung 32, B, D, F, H) dargestellt.



**Abbildung 32: Einzelfärbung an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen**  
 Färbung eines Kontrollserums (A, B), der Positivkontrolle (C, D) sowie Serum von Patient 5 (E, F) und PE-Material von Patient 6 (G, H) an Caspr- (A, C, E, G) und nicht transfizierten (B, D, F, H) HEK-293-Zellen. Transfizierte, angefärbte Zellen sind mit Pfeilen markiert und zeigen Immunreaktivität gegen Caspr bei der Positivkontrolle (C) sowie bei Patient 5 (E) und 6 (G). Maßstab = 10  $\mu$ m.

Doppelfärbungen waren aufgrund einer Kreuzreaktion der Sekundärantikörper nicht möglich: beim Kontrollserum zeigte sich ebenfalls eine Kolokalisation bei allerdings unauffälliger Einzelfärbung (die Daten werden nicht gezeigt). Die Doppelfärbung wurde daher ausschließlich mit subklassenspezifischen Sekundärantikörpern durchgeführt (vergleiche 5.5.2). Hier zeigte sich eine exakte Kolokalisation (Abbildung 33, H und L) des Anti-IgG4-markierten Serums von Patient 5 (Abbildung 33, E) und des Anti-IgG3-markierten PE-Materials von Patient 6 (Abbildung 33, I) mit dem Kontrollantikörper (Abbildung 33, B, F, J) an Caspr-transfizierten Zellen, nicht jedoch an nicht transfizierten Zellen, sichtbar durch die Zellkernfärbung mit DAPI (Abbildung 33, C, G, K). Beim je Anti-IgG1-4 markierten Kontrollserum zeigte sich keine Kolokalisation (exemplarisch dargestellt für Anti-IgG3, Abbildung 33, A-D).

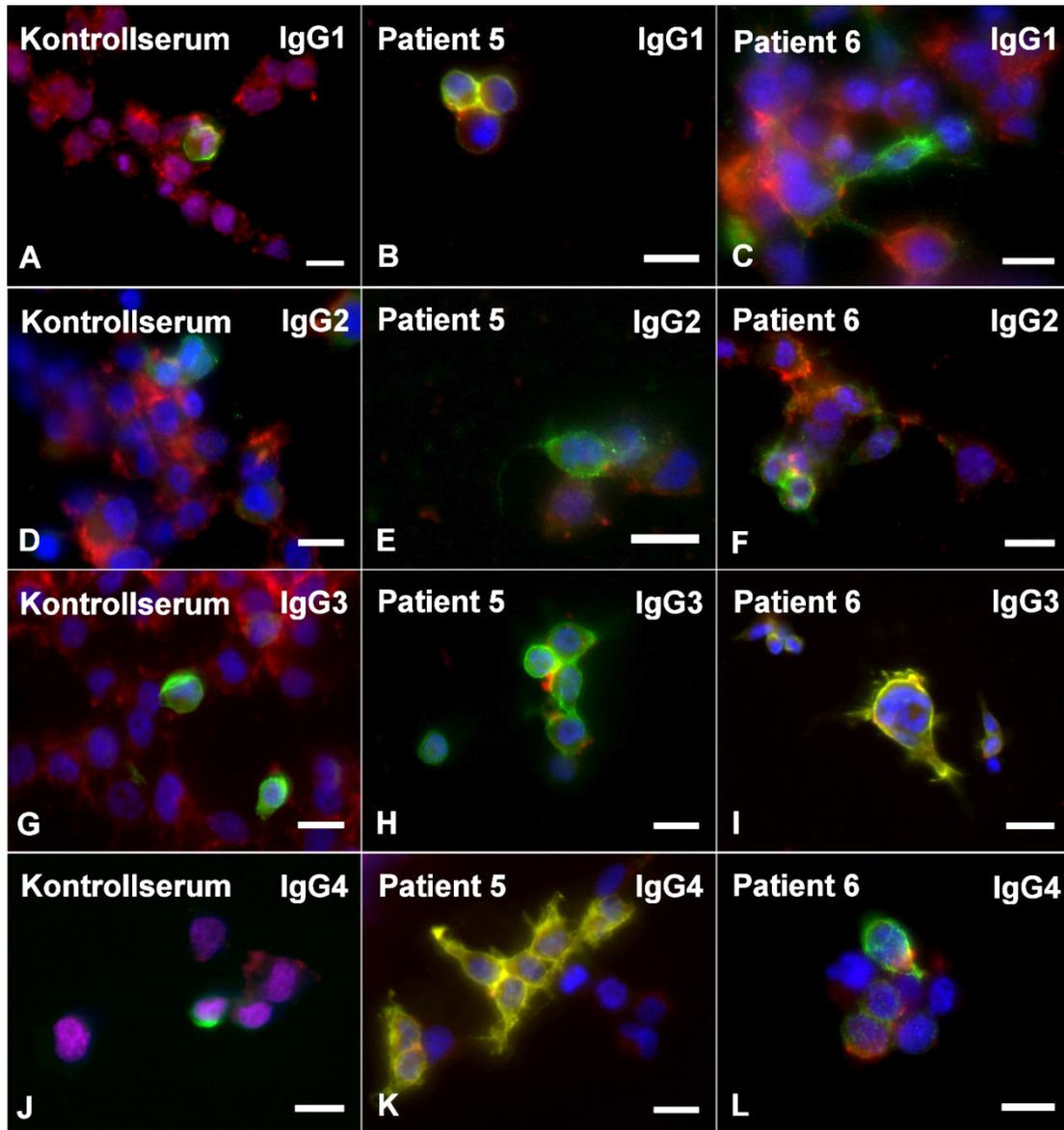


**Abbildung 33: Doppelfärbung an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen**

Doppelfärbung von Anti-Caspr (grün) und des Serums einer Kontrolle (A-D) und von Patient 5 (E-H) und PE-Material von Patient 6 (I-L) mit subklassenspezifischen Sekundärantikörpern (rot). Kolokalisation stellt sich in der Überlagerung gelb dar und liegt nur bei Patient 5 und 6 vor (H, L). Die Zellkerne werden mit DAPI in blau dargestellt (C, G, K). Maßstab = 10  $\mu$ m.

### 5.5.2 Subklassenanalyse Anti-Caspr-positiver Proben

Zur Analyse der Subklassen bei Patient 5 und 6 wurden Doppelfärbungen an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen mit subklassenspezifischen Sekundärantikörpern durchgeführt. Hierbei zeigte sich bei Patient 5 eine Bindung bei Verwendung von Anti-IgG1 und Anti-IgG4 (Abbildung 34, B und K), bei Patient 6 eine Bindung ausschließlich bei Verwendung von Anti-IgG3 (Abbildung 34, I) an Caspr-transfizierten Zellen, welche mit dem Kontrollantikörper Anti-Caspr kolo-kalisierte (Abbildung 34, gelb). Die Negativkontrolle zeigte bei keiner Subklasse eine Immunreaktivität oder eine Kolo-kalisation mit dem Kontrollantikörper (Abbildung 34, A, D, G, J). Somit lagen bei Patient 5 IgG1- und IgG4-Autoantikörper, bei Patient IgG3-Autoantikörper vor.



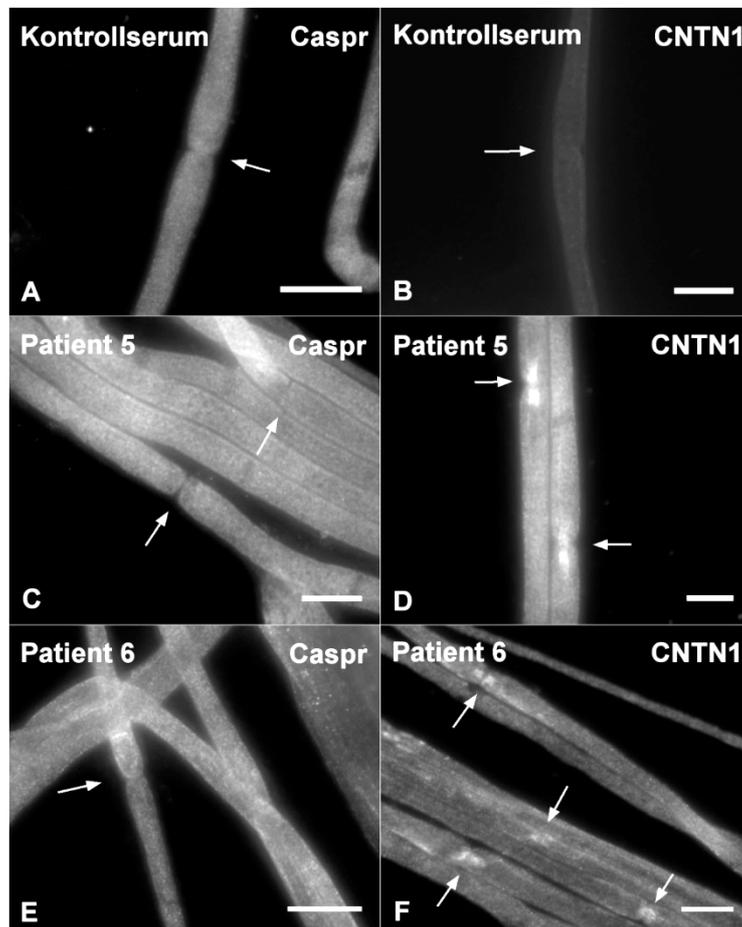
**Abbildung 34: Subklassenbestimmung an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen.**

Überlagerungsbilder vom Serum einer Kontrolle (A, D, G, J) und von Patient 5 (B, E, H, K) sowie PE-Material von Patient 6 (C, F, I, L) (rot), mit dem Kontrollantikörper Anti-Caspr (grün) und DAPI (blau) in der Färbung Caspr-transfizierter HEK-293-Zellen mit Verwendung subklassenspezifischer Sekundärantikörper. Kolokalisation von Patientenmaterial und Anti-Caspr stellt sich gelb dar und markiert das Vorliegen der jeweiligen Subklasse, nämlich IgG1 und IgG4 bei Patient 5 (B, K) und IgG3 bei Patient 6 (I). Im Kontrollserum zeigt sich keine Kolokalisation. Maßstab = 10  $\mu$ m.

Die Ergebnisse decken sich mit der Subklassenanalyse an den Zupfnervenpräparaten. Hier konnte bei Patient 5 IgG4- und bei Patient 6 IgG3-Antikörper nachgewiesen werden (vergleiche 5.1).

### 5.5.3 Bestätigung der Spezifität durch Präinkubationsversuche

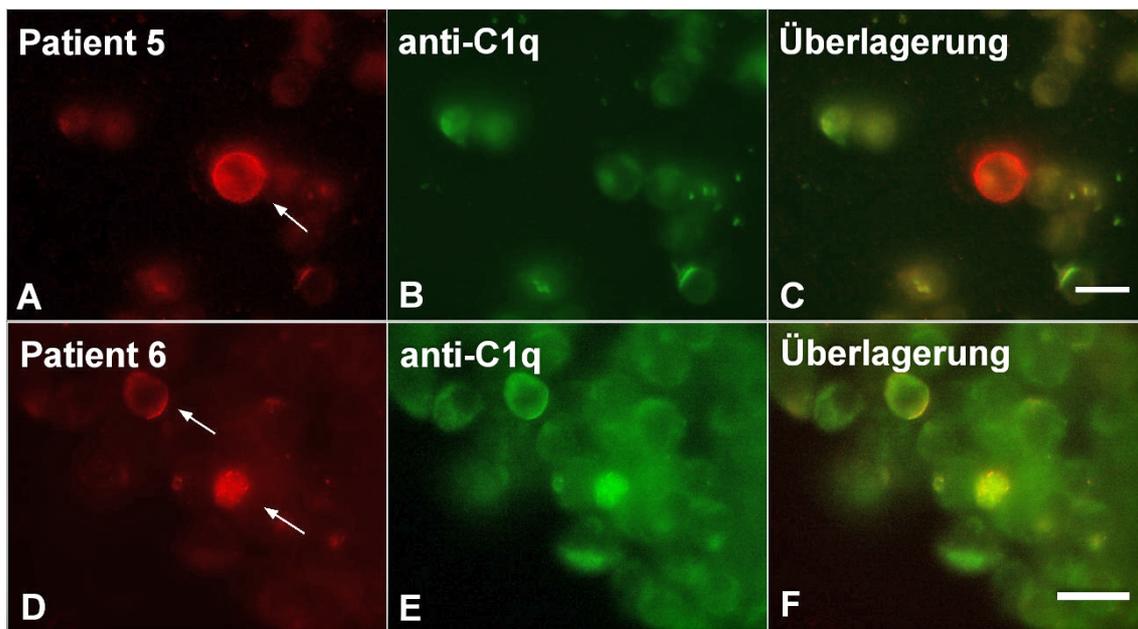
In Präinkubationsversuchen mit Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen konnte die Spezifität der Antikörper bei Patient 5 und 6 bewiesen werden und somit das Ergebnis der Färbung an HEK-293-Zellen verifiziert werden. An murinen Zupfnerven zeigte sich bei Patient 5 und 6 ein Verlust des paranodalen Bindungsmusters nach Inkubation mit Caspr-transfizierten Zellen (Abbildung 35, C und E), nicht aber nach Inkubation mit Contactin-1-transfizierten Zellen (Abbildung 35, D und F). Das Serum einer Normalkontrolle diente jeweils als Negativkontrolle (Abbildung 35, A-B).



**Abbildung 35: Zupfnervenfärbung nach Präinkubation mit Caspr**  
Färbung einer Kontrolle (A, B) und Serum von Patient 5 (C, D) und PE-Material von Patient 6 (E, F) nach Präinkubation mit Caspr- (A, C, E) und Contactin-1 (CNTN1)-transfizierten (B, D, F) HEK-293-Zellen. Die Schnürringe sind mit Pfeilen markiert. Es kommt zum Verlust der paranodalen Bindung nach Caspr-Präinkubation bei Patient 5 (C) und 6 (E). Maßstab = 10  $\mu$ m.

#### 5.5.4 Komplementbindung bei IgG3-Antikörpern

Das Komplementbindungsverhalten der Anti-Caspr-IgG3- bei Patient 6 und IgG1/4-Antikörper bei Patient 5 wurde im HEK-293-Zell-basierten Versuch über eine Analyse der C1q-Bindung untersucht. Die Darstellung erfolgte durch einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gegen C1q (Abbildung 36, B und E), welcher mit dem IgG-spezifischen Sekundärantikörper (Abbildung 36, A und D) nur bei Patient 6 kolokalisierte (Abbildung 36, F), nicht jedoch bei Patient 5 (Abbildung 36, C). Somit kam es nur beim Vorliegen von IgG3-Antikörpern zur Komplementbindung. Der Einfluss von IVIG auf die Bindung von Caspr-Antikörpern konnte aufgrund von methodischen Limitationen nicht untersucht werden (siehe 5.4.6.2).



**Abbildung 36: HEK-293-Zell-basierter C1q-KBV (Patient 5-6)**

Darstellung der Bindung des Serums von Patient 5 und des PE-Materials von Patient 6 (rot) an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen (Pfeile) und der Bindung von C1q an die Antikörper (grün, E). Kolokalisation stellt sich in der Überlagerung gelb dar, liegt allerdings nur bei Patient 6 (F), nicht bei Patient 5 (C) vor. Maßstab = 10  $\mu\text{m}$ .

## 5.6 Klinische Merkmale der Patienten mit Autoantikörpern gegen paranodale Proteine

Der detaillierte klinische Verlauf jedes einzelnen Patienten mit paranodalen Autoantikörpern ist in Kapitel 5.6.1 dargestellt, ein zusammenfassender Vergleich erfolgt in Kapitel 5.6.2 und 5.6.3.

Die Befunde bei Erstmanifestation der Erkrankung von Patient 1-6 sind in Tabelle 26, die Komplementierung der Diagnostik bei der Rekrutierung im Universitätsklinikum Würzburg von Patient 1-4 in Tabelle 27 und von Patient 5-6 in Tabelle 28 aufgeführt. Das Therapieansprechen ist in Tabelle 29 zusammengefasst.

### 5.6.1 Klinische Daten, Verlauf und Therapieansprechen der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4) und Anti-Caspr-positiven Patienten (Patient 5 und 6)

Bei Patient 1 handelt es sich um einen zum Zeitpunkt der Rekrutierung 76-jährigen, männlichen Patienten mit der Diagnose CIDP mit einem GBS-artigen Beginn. Er wurde 35 Tage nach der Erstmanifestation und der auswärts gestellten Erstdiagnose stationär in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg aufgenommen. Als neurologische Vorerkrankungen waren eine transitorische ischämische Attacke rechts im Jahr 2006, ein lakunärer Infarkt parieto-okzipital rechts im Jahr 2013, eine rezidivierende depressive Störung sowie ein chronisches Nervus-ulnaris-Syndrom links bekannt. Autoimmunvermittelte Vorerkrankungen oder ein vorangegangener Infekt lagen nicht vor. Im Juni 2013 manifestierte sich die Erkrankung erstmals mit einer rechts- und beinbetonten, rasch progredienten, an der oberen Extremität distal- und an der unteren Extremität proximal-betonten schlaffen Tetraparese. In der formalen Kraftprüfung zeigten sich Kraftgrade mit einem MRC-Summscore (Kleyweg et al, 1991; Medical Research Council, 1943) von initial 53/60 und Hyporeflexie an der oberen, Areflexie an der unteren Extremität, sensible Symptome lagen bei Erkrankungsbe-

ginn nicht vor. Ein Tremor wurde nicht beschrieben. Elektrophysiologisch dominierten Zeichen einer axonalen Schädigung (deutliche Amplitudenreduktion in motorischen und sensiblen Neurographien, im Verlauf Denervierungszeichen in der Elektromyographie), einige Merkmale passten jedoch auch in das Bild einer demyelinisierenden Erkrankung (zu Beginn verlängerte distal motorische Latenzen und F-Wellen-Latenzen, im Verlauf auch reduzierte Nervenleitungsgeschwindigkeiten in der Elektroneurographie). In mehrmals durchgeführten Liquorpunktionen zeigte sich eine für autoimmunvermittelte periphere Neuropathien typische zytoalbuminäre Dissoziation (initial 1 Zelle/ $\mu$ l und 90 mg/dl Gesamtprotein mit Zunahme auf 5 Zellen/ $\mu$ l und 304,8 mg/dl Gesamtprotein im Verlauf), die bei Polyneuropathie diagnostisch ergänzend durchgeführte Serologie ergab keinen wegweisenden pathologischen Befund (Anti-GM1-Antikörper negativ, kein Hinweis auf eine infektiöse oder rheumatische Ursache). Auch die spinale und kraniale Bildgebung offenbarte keine wegweisenden Pathologien. Diagnostische Biopsien wurden nicht entnommen. Eine dreitägige Methylprednisolonpulsstherapie in der Akutphase der Erkrankung bewirkte keinen Therapieerfolg, eine anschließende Behandlung mit IVIG (kumulative Dosis 150g) erbrachte eine kurzzeitige Besserung der Symptomatik. Innerhalb einiger Wochen kam es zu einer Hirnnervenbeteiligung mit einer fazialen Parese links, einer Okulomotoriusparese mit Doppelbildern, einer Dysarthrie und einer progredienten Dysphagie. Zusätzlich entwickelte sich im Verlauf eine distal-betonte Hypästhesie sowie eine Pallhypästhesie an der unteren Extremität mit einer Pallanästhesie am Großzehengrundgelenk. Eine weitere motorische Verschlechterung (MRC-Summenscore 45/60 und im Verlauf 41/60) in der Rehabilitationsphase, eine Abnahme der Vitalkapazität und eine vegetative Beteiligung mit rezidivierenden hypertensiven Entgleisungen acht Wochen nach Erstmanifestation machten eine intensivmedizinische Betreuung mit einer Beatmung unter Analgosedierung notwendig. Unter fünfmalig durchgeführten Plasmapheresen und einer erneuten intravenösen Methylprednisolonpulsstherapie (kumulative Dosis 2500 mg Methylprednisolon) konnte eine kurzfristige Stabilisierung erreicht werden, eine dauerhafte Extubation war

jedoch nicht möglich. In einer zweiten Rehabilitationsphase kam es zu einer weiteren motorischen Verschlechterung (MRC-Summenscore 26/60), viereinhalb Monate nach Erkrankungsbeginn verstarb der Patient bedauernswerterweise nach zahlreichen Komplikationen wie Aspirationspneumonien, Panzytopenien und Komplikationen der künstlichen Ernährung bei neurogener Dysphagie unter einem palliativen Therapieregime während der Rehabilitationsbehandlung. Die Detektion der Anti-Contactin-1-Autoantikörper erfolgte im April 2014 post mortem aus konserviertem Serum und PE-Material aus dem Jahr 2013 und hatte keinen Einfluss auf das therapeutische Prozedere.

Bei Patient 2 handelt es sich um einen zum Zeitpunkt der Rekrutierung 68-jährigen, männlichen Patienten mit der Diagnose CIDP mit einem GBS-artigen Beginn. Die Erkrankung manifestierte sich im Jahr 1991 erstmals mit brennenden Dys- und Hypästhesien an den Fußsohlen, gefolgt von einer schweren, sensorischen Tetraparese mit intubationspflichtiger respiratorischer Insuffizienz. Ein Infekt war der Symptomatik nicht vorausgegangen, jedoch trat im Jahr der Erstmanifestation ebenfalls eine membranöse Glomerulonephritis mit einem nephrotischen Syndrom auf. Die initiale Diagnostik und Therapie erfolgte auswärts. Innerhalb von einigen Wochen entwickelte sich eine autonome Neuropathie mit Herzrhythmusstörungen, welche eine Schrittmacherimplantation erforderte. Zudem wurde eine Hirnnervenbeteiligung mit einer peripheren Fazialis-, Accessorius- und Hypoglossusparesse beschrieben. In der Liquorpunktion zeigte sich eine zytoalbuminäre Dissoziation ( $<1$  Zelle/ $\mu$ l und 204 mg/dl Gesamtprotein). Nach einer sechsmonatigen oralen Glukokortikoidtherapie sowie einer Azathioprintherapie mit allerdings nur geringem Erfolg und einer langen Rehabilitationsphase besserten sich die Beschwerden und stabilisierten sich auf dem Niveau einer noch eingeschränkten Gehfähigkeit, welche die Zuhilfenahme einer Gehstütze erforderte, und Sensibilitätsstörungen in Form von nach distal zunehmenden Hypästhesien und Dysästhesien. Im Anschluss kam es zu einem schubförmig leicht progredienten Verlauf. Es entwickelte sich ein Halte- und Intentionstremor, in der Bildgebung mittels CCT fiel eine mögliche Kleinhirnatrophie

ohne diagnostizierbare Ursache auf. In einer auswärts im Jahr 2010 durchgeführten Suralisbiopsie wurde eine vorrangig axonale, entzündliche Neuropathie mit T-Zell-Infiltration und fehlenden Regenerationszeichen (keine Zwiebelschalen) diagnostiziert, ebenfalls wurde im Jahr 2010 laborchemisch eine Schrankenstörung im Reiber-Schema mit nun 3 Zellen/ $\mu$ l und 720 mg/dl Gesamtprotein im Liquor festgestellt. Eine daraufhin im Jahr 2010 und 2011 durchgeführte zweimalige Therapie mit IVIG erbrachte kaum eine Besserung der Symptomatik. Nach einem Stammganglieninfarkt rechts mit einer residuellen zentralen, fazialen Parese links im Jahr 2011 kam es im Verlauf auch zur erneuten Progression der Neuropathie und daher zur erstmaligen stationären Vorstellung in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg. Hier zeigte sich in der neurologischen Untersuchung das Bild einer symmetrischen, distal-betonten, beinbetonten schlaffen Tetraparese mit symmetrischer Plegie der distalen Fußmuskulatur und einem MRC-Summscore von 40/60 und ein Steppergang, eine generelle Areflexie, multimodale Sensibilitätsstörungen an der oberen und unteren Extremität mit distalem Gradienten und Dysästhesien der Hände und Füße sowie eine sensible Ataxie und zusätzlich ein Ruhe-, Halte- und Aktionstremor. Elektrophysiologisch zeigten sich in den sensiblen Neurographien keine Reizantworten, in den motorischen Neurographien war das Bild einer gemischt axonal und demyelinisierenden Erkrankung mit einer Amplitudenreduktion sowie reduzierten Nervenleitungsgeschwindigkeiten, verlängerten distalen motorischen Latenzen und leicht verlängerten F-Wellen-Latenzen zu erkennen. In der Elektromyographie zeigte sich an zahlreichen Muskeln ein chronisch neurogener Umbau mit gleicheten Interferenzmustern, teilweise einem kompletten Verlust der Willküraktivität und zusätzlich florider Spontanaktivität. Unter zweimalig fünf Zyklen Plasmapherese im März und April 2012 konnte eine klinische Besserung mit Anstieg des MRC-Summscores auf 44/60 bei einem gleichbleibenden elektrophysiologischen Befund erreicht werden. Die Detektion der Anti-Contactin-1-Autoantikörper erfolgte im Mai 2014 aus konserviertem PE-Material. Zur erneuten stationären Vorstellung kam es erst im Jahr 2016 bei subjektiver Verschlechterung, einem MRC-Summscore von 42/60 und sensibel gleichgebliebenen Beschwerden.

Elektrophysiologisch zeigte sich zu diesem Zeitpunkt allerdings eine geringfügige Befundbesserung. Es erfolgte eine Therapie mit Plasmapherese und probatorisch bei Verdacht auf eine antikörpervermittelte Erkrankung die Initiationstherapie mit Rituximab 1000mg intravenös zweimalig im Abstand von einem Monat. Zu diesem Zeitpunkt waren experimentell keine Anti-Contactin-1-Antikörper mittels ELISA nachweisbar (OD = 0,187 im PE-Material und OD = 0,245 im Serum bei einem Schwellenwert von 0,562 für ein positives Ergebnis). Das Serum zeigte ebenfalls keine Bindung an das Paranodium der Zupfnerven in der immunhistochemischen Färbung. Diese Befunde konnten allerdings erst nach Initiierung der Therapie erhoben werden. Subjektiv kam es zu einem dreimonatigen Therapieansprechen mit verminderten Sensibilitätsstörungen und Besserung der Kraft, aufgrund einer fehlenden Wiedervorstellung war dies allerdings nicht objektiv nachvollziehbar (MRC-Summenscore bei der nächsten stationären Aufnahme gleichbleibend bei 42/60, siehe Tabelle 30). Während der Verabreichung des zweiten Zyklus Rituximab kam es nach der intravenösen Gabe von 300mg zu einem Zytokin-Release-Syndrom, auf weitere Gaben wurde daher verzichtet und eine Einstellung auf ein Immunsuppressivum empfohlen. Beim letzten Aufenthalt im Februar 2017 waren ebenfalls keine Autoantikörper im Serum des Patienten mittels Bindungsversuchen und ELISA (OD = 0,233) nachweisbar. Im Anschluss erfolgte keine erneute stationäre oder ambulante Vorstellung.

Bei Patient 3 handelt es sich um eine bei der Rekrutierung 62-jährige, weibliche Patientin mit der Diagnose CIDP mit einem GBS-artigen Beginn, die sich im Jahr 2008 18 Monate nach der ersten Manifestation stationär in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg vorstellte. Weitere neurologische Vorerkrankungen waren - bis auf einen asymptomatischen medio-lateralen Bandscheibenprolaps L5/S1 links mit einem kleinen Sequester - nicht bekannt. Andere autoimmunvermittelte Erkrankungen oder ein der Erstmanifestation vorangegangener Infekt lagen nicht vor. Im April 2006 war es zu einem subakuten Beginn der Erkrankung mit einer Entwicklung von distalen Kribbelparästhesien und einer sensiblen Ataxie gekommen, gefolgt von einer hochgradigen, distal-betonten schlaffen Tetraparese sowie einer Hirnnervenbeteiligung mit einer Fazialis- und einer inkompletten Okulomotoriusparese mit Doppelbildern über mehrere Wochen. Auswärts wurde, bei einer für ein GBS typischen zytoalbuminären Dissoziation (3 Zellen/ $\mu$ l und 416 mg/dl Gesamtprotein) im Liquorbefund sowie dem elektrophysiologischen Bild einer Demyelinisierung mit multiplen Leitungsblöcken, ein GBS diagnostiziert und eine Therapie mit IVIG eingeleitet. Unter dieser bildete sich die Tetraparese im Rahmen einer zweimaligen Rehabilitationsphase zurück. Im Verlauf kam es jedoch zu einer erneuten, langsam kontinuierlichen Progression der Erkrankung, was eine immunsuppressive Therapie mit Azathioprin nötig machte. Diese wurde jedoch trotz eines Therapieerfolges nach sieben Monaten aufgrund einer Unverträglichkeit abgesetzt und eine orale Glukokortikoidtherapie eingeleitet. Diese führte ebenfalls zur subjektiven und objektiven Besserung der Symptomatik, wurde aber bei unerwünschten Nebenwirkungen wie einem iatrogenen Cushingssyndrom und einem steroidinduzierten Diabetes mellitus beendet. Bei der Rekrutierung im März 2008 zeigte die Patientin im neurologischen Untersuchungsbefund eine distal-, rechts- und armbetonte schlaffe Tetraparese mit einem MRC-Summenscore von 48/60 und einer eingeschränkten Gehfähigkeit, welche die Zuhilfenahme eines Rollators erforderte, Atrophien der Thenar- und Hypothenarmuskulatur und eine generalisierte Areflexie sowie eine multimodale sensible Beteiligung mit einer zusätzlichen sensiblen Ataxie. Eine Hirnnervenbeteiligung oder eine vegetative Beteiligung lagen zu diesem

Zeitpunkt nicht mehr vor. Laborchemisch zeigte sich weiterhin eine zytoalbuminäre Dissoziation im Liquorbefund, zusätzliche serologische Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine rheumatische oder infektiöse Ursache der Erkrankung; eine Anti-MAG-Neuropathie konnte ausgeschlossen werden. Eine kraniale Bildgebung ergab keinen wegweisenden pathologischen Befund. Elektrophysiologisch zeigte sich das Bild einer gemischt axonalen und demyelinisierenden Erkrankung mit einer starken Reduktion von Amplituden und Nervenleitungsgeschwindigkeiten sowie verlängerten distal motorischen Latenzen in den motorischen Neurographien, mit nicht ableitbaren Reizantworten in den sensiblen Neurographien und mit florider Spontanaktivität und einem chronisch-neurogen veränderten Muster in der Elektromyographie. In den im Verlauf (2008 und 2015) mehrfach durchgeführten Hautbiopsien war eine Reduktion der distalen Hautinnervation ohne Entzündungszeichen auffällig. Eine im Jahr 2008 durchgeführte Suralisbiopsie ergab Hinweise auf eine aggressive, axonale Neuropathie mit Axonuntergängen, mit einer T-Zell- und Makrophagenaktivität und einem aktiven Myelinabbau ohne Anzeichen einer Regeneration (Zwiebelschalen, Regenerationsgruppen). Im Jahr 2008 wurden vier Zyklen mit je fünf Plasmapheresen durchgeführt, darunter kam es jeweils kurzfristig zu einer motorischen Verbesserung mit einer verlängerten Gehstrecke und einem Anstieg des MRC-Summenscores auf bis zu 52/60 sowie zu einem Rückgang der Kribbelparästhesien, im Verlauf jedoch elektrophysiologisch zu einer Befundverschlechterung und zu neu auftretenden Dysästhesien, weswegen auf eine immunsuppressive Therapie mit Cyclophosphamid eskaliert wurde. Diese wurde zwischen Dezember 2008 und Juni 2010 in zehn Zyklen mit einer kumulativen Gesamtdosis von 10.047,4 mg verabreicht. Darunter kam es weitestgehend zu einer Stabilisierung der Erkrankung mit einem MRC-Summenscore von 50/60 beim ersten Zyklus und 51/60 beim letzten Zyklus sowie einer Besserung des elektrophysiologischen Befundes mit Zunahme der Amplituden und Nervenleitungsgeschwindigkeiten. Allerdings verschlechterte sich im Verlauf die Feinmotorik zunehmend, es entwickelte sich ab dem Jahr 2009 ein Haltetremor, ab Juni 2010 auch ein linksbetonter Inten-

tionstremor, der zur deutlichen Einschränkung im Alltag führte. Eine Tremoranalyse zeigte einen längenunabhängigen Intentionstremor mit einer Frequenz von 3,7Hz bei einem gleichzeitigen Haltetremor mit einer Frequenz von 2Hz. Es wurde nach einem Therapieversuch mit Azathioprin, welcher erneut wegen Unverträglichkeit abgebrochen wurde, auf Ciclosporin A deeskaliert. Darunter verbesserte sich initial das Gangbild, die Kraft (MRC-Summenscore von 58/60 im Januar 2012), die Feinmotorik und die Sensibilitätsstörungen, der Tremor wurde aber therapeutisch nicht beeinflusst und führte bei einer Progredienz zu einer starken Einschränkung in Alltag mit einem ODSS-Score (Merkies et al, 2002; Merkies et al, 2000) von 7/12. Elektrophysiologisch war nach einer initialen, minimalen Befundbesserung wieder ein kontinuierlicher Progress der Erkrankung nachweisbar. Im Verlauf kam es konsekutiv auch erneut zur Progression der motorischen und sensiblen Symptome (MRC-Summenscore von 54/60 im Mai 2014). Nach der Detektion der Anti-Contactin-1-Antikörper im Mai 2014 wurde, nach einem erneuten fünfmaligen Plasmapheresezyklus mit einem sehr guten Therapieansprechen, im Juni 2014 eine Therapie mit Rituximab in einem Induktionszyklus mit 630 mg begonnen und aktuell in vier Erhaltungszyklen zu je 1000 mg fortgeführt. Darunter sank der Titer der Autoantikörper von 1:10.000 auf zwischenzeitlich 1:500 (vergleiche Kapitel 5.4.4) und es zeigte sich ein deutlicher klinischer Therapieerfolg (siehe Kapitel 5.6.4). Beim letzten stationären Aufenthalt zeigte sich vor der Gabe des vierten Zyklus mit einem Abstand von elf Monaten zum vorherigen Zyklus ein erneuter Titeranstieg auf 1:3000 bei einem jedoch stabilen klinischen Befund.

Bei Patient 4 handelt es sich um einen zum Zeitpunkt der Rekrutierung 72-jährigen, männlichen Patienten mit der Diagnose CIDP mit einem GBS-artigen Beginn. Er wurde fünf Wochen nach der Erstmanifestation im Februar 2007 stationär in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg aufgenommen. Als neurologische Vorerkrankungen waren ein dementielles Syndrom sowie ein fragliches Neuroleptika-induziertes Parkinsonoid bekannt. Autoimmunvermittelte Vorerkrankungen oder ein der Symptomatik vorangegangener Infekt lagen

nicht vor. Nach initialen lumbalen Schmerzen und Extremitätenschmerzen entwickelte sich eine rasch progrediente, hochgradige, symmetrische, distal- und beinbetonte schlaffe Tetraparese mit einer generalisierten Areflexie, die ein Stehen oder Gehen unmöglich machte. Es kam weder zu einer Hirnnervenbeteiligung und vegetativen Beteiligung noch zu sensiblen Symptomen. Auswärts wurde bei einem typischen Liquorbefund mit einer zytoalbuminären Dissoziation (3 Zellen/ $\mu$ l und 92 mg/dl Gesamtprotein) die Verdachtsdiagnose eines GBS gestellt und eine Therapie mit IVIG begonnen, woraufhin es initial zu einer klinischen Besserung kam. Im Verlauf waren die Symptome erneut progredient, was die Vorstellung am Universitätsklinikum Würzburg bedingte. In der neurologischen Untersuchung fielen hier zusätzlich Faszikulationen und Myokymien, eine diskrete sensible Beteiligung mit einer Pallanästhesie am Großzehengrundgelenk sowie ein linksbetonter Ruhetremor und eine Ataxie auf. Elektrophysiologisch zeigten sich im Verlauf vorrangig Hinweise auf eine axonale Schädigung (eine deutliche Amplitudenreduktion in den motorischen und sensiblen Neurographien; Faszikulationen und im Verlauf eine zunehmende Spontanaktivität und das Muster einer chronisch-neurogenen Schädigung in der Elektromyographie), aber auch Hinweise auf eine demyelinisierende Komponente (leicht reduzierte Nervenleitungsgeschwindigkeiten und verlängerte distal motorische Latenzen in der motorischen und sensiblen Neurographie). Im Liquorbefund lag nun eine generalisierte Schrankenstörung (10 Zellen/ $\mu$ l bei 100mg/dl Gesamtprotein) vor. Die bei Polyneuropathie diagnostisch ergänzend durchgeführte Serologie ergab keinen Hinweis auf eine rheumatische oder infektiöse Genese; Antikörper gegen GM1, GQ1B, Kaliumkanäle, Kleinhirnantigene sowie IgM-Antikörper gegen Strukturen des peripheren Nervens konnten nicht nachgewiesen werden. Auch die spinale und kraniale Bildgebung offenbarten bei einer nebenbefundlichen Mikroangiopathie und einer generalisierten Hirnatrophie keine wegweisenden Pathologien. Eine im Februar 2007 entnommene Hautbiopsie zeigte eine Reduktion der distalen Hautinnervation, in der Suralisbiopsie waren eine axonale Beteiligung mit Axonuntergängen und eine gesteigerte Makrophagenaktivität sowie nur geringe Zeichen von Regeneration (Regenerationsgruppen, Zwiebelschalen) erkennbar.

Nach einer intravenösen Methylprednisolonpulsstherapie in einer Dosis von insgesamt 2500 mg kam es zu einer klinischen Besserung, eine Sepsis sowie ein steroidinduziertes Delir unter Therapie machten jedoch eine kurzfristige intensivmedizinische Betreuung notwendig. Nach einem Zyklus von fünf Plasmapheresen mit einer nur leichtgradigen Befundbesserung wurde auf die immunsuppressive Therapie mit Cyclophosphamid in fünf Zyklen und einer kumulativen Gesamtdosis von 1240 mg eskaliert. Darunter kam es zu einer deutlichen motorischen Besserung mit einer Steigerung des MRC-Summscores von 39/60 (März 2007) auf 58/60 (April 2008) sowie einer deutlichen Besserung des elektrophysiologischen Befundes mit einer überwiegenden Normalisierung der Neurographien. Weitere Follow-Up-Untersuchungen fanden bei einer fortschreitenden Demenz nicht statt, fremdanamnestisch wurde eine Immobilität berichtet, die kausalen Zusammenhänge waren jedoch nicht eruierbar. Die Detektion der Anti-Contactin-1-Autoantikörper aus dem Plasmapheresematerial von Februar 2007 erfolgte im Juni 2014 und blieb ohne eine therapeutische Konsequenz.

Bei Patient 5 handelt es sich um einen bei der Rekrutierung 30-jährigen, männlichen Patienten mit der Diagnose CIDP mit einem GBS-artigen Beginn. Er wurde 15 Monate nach der Erstmanifestation erstmals zu einer Reevaluation stationär in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg aufgenommen. Bei dem Patienten war ein autoimmun-vermittelter Morbus Basedow mit einer beginnenden Orbitopathie bekannt, neurologische Vorerkrankungen bestanden nicht. Im Januar 2013 manifestierte sich die Erkrankung erstmals kurz nach einer Infektion des Respirationstraktes mit von distal nach proximal aufsteigenden Kribbelparästhesien und Hypästhesien aller Extremitäten sowie Dysästhesien und starken neuropathischen Schmerzen am Rücken und an den Extremitäten. Den sensiblen Symptomen folgte eine rasch progrediente, symmetrische, hochgradige, distal- und beinbetonte schlaffe Tetraparese, welche ihr Maximum acht Wochen nach dem Symptombeginn erreichte und zu einer Rollstuhlpflichtigkeit des Patienten führte. Bei einer leichten Zell- und Eiweißerhöhung im Liquorbefund (8 Zellen/ $\mu$ l und 52 mg/dl Gesamtprotein) und „Demyelinisierungszeichen“

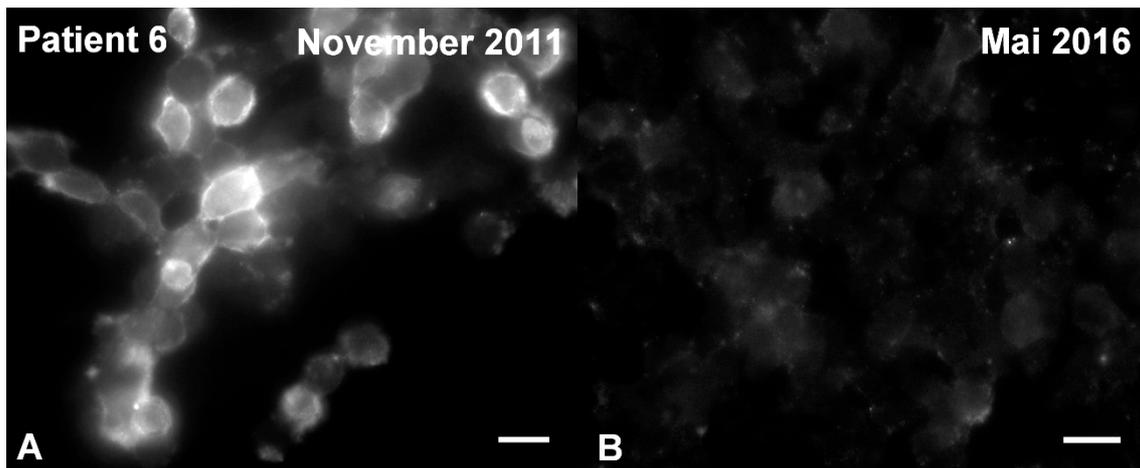
sowie starken Amplitudenreduktionen und verlängerten distal motorischen Latenzen in der Elektrophysiologie wurden im März und April 2013 auswärts zwei Zyklen IVIG verabreicht, jedoch führten diese nicht zu einer Symptombesserung. Eine fünftägige intravenöse Methylprednisolonpulsstherapie in der Dosis von 1 g pro Tag erbrachte eine deutliche Symptombesserung. Nach einigen Wochen kam es aber erneut zu einer Progression mit einer Entwicklung von schleichend zunehmenden Paresen und vor allem mit einer Entwicklung eines neuropathischen Dauerschmerzes einer Stärke von 4-5/10 auf der numerischen Rating-Skala (NRS) (Childs et al, 2005; Jensen & McFarland, 1993) mit Schmerzspitzen von 10/10 NRS bei einem minimalen Schmerz von 2/10 NRS und mit einem Bedarf von bis zu 500 mg Tilidin/Naloxon und 600 mg Pregabalin täglich. Bei der Rekrutierung im April 2014 zeigten sich in der neurologischen Untersuchung ein MRC-Summscore von 44/60 mit einer distalen Plegie in der formalen Kraftprüfung, eine generalisierte Areflexie und Muskelatrophien, ein Steppergang mit einer eingeschränkten Gehfähigkeit am Rollator und mit einem ODSS von 7/12, weiterhin hochgradige neuropathische Schmerzen und multimodale Sensibilitätsstörungen mit einer Hirnnervenbeteiligung in Form einer trigeminalen Hypästhesie sowie eine sensible Ataxie. Vegetative Störungen lagen zu keinem Zeitpunkt der Erkrankung vor. Elektrophysiologisch waren bei der Rekrutierung bereits in den sensiblen Neurographien keine Reizantworten mehr erhältlich, auch in den motorischen Neurographien zeigte sich nur noch ein am Nervus axillaris ableitbares Potential mit einer deutlichen Amplitudenreduktion und einer Verlängerung der distal motorischen Latenz bei einer gleichzeitig teilweise nicht ableitbaren, teilweise neurogen veränderten Willküraktivität und floriden Spontanaktivität als Zeichen einer axonalen Schädigung in der Elektromyographie. Im Liquor war eine deutliche generalisierte Schrankenstörung mit einem Albuminquotienten von 28,6 (Normwert < 7), 46 Zellen/ $\mu$ l und 168,2 mg/dl Gesamtprotein auffällig, serologisch zeigte sich ein hoher ANA-Titer (1/320); es gab keinen Hinweis auf ein infektiöses, spezifisches rheumatisches oder paraneoplastisches Geschehen. In der kraniellen Bildgebung ergab sich neben einer endokrinen Orbitopathie kein

pathologischer Befund. Spinal zeigten sich mittels MRT beidseitige T2-Signalanhebungen passend zu einer Plexusneuritis oder einer Denervierung des Plexus lumbosacralis. Auch zu Beginn der Erkrankung hatte auswärts eine Beteiligung des Plexus mit Kontrastmittelaufnahme in den Spinalganglien vorgelegen. In einer im April 2014 entnommenen Hautbiopsie zeigte sich zwar keine Reduktion der distalen Hautinnervation, allerdings deutliche Entmarkungszeichen und eine pathologische Schnürringarchitektur mit einem Verlust der Immunreaktivität gegen Caspr und pathologisch verlängerten Schnürringen (Doppler et al, 2016). Eine Suralisbiopsie offenbarte das Bild einer aggressiven, axonalen Neuropathie mit Axonuntergängen, einer Makrophagen- und T-Zell-Aktivität und eines aktiven Myelinabbaus ohne Anzeichen einer Regeneration (Zwiebelschalen, Regenerationsgruppen) sowie im Zupfnervenpräparat eine Destruktion der Schnürringarchitektur (Doppler et al, 2016). Nach der Detektion der Autoantikörper gegen paranodale Strukturen des peripheren Nervens mittels Bindungsversuchen an Zupfnerven (siehe Kapitel 5.1) im April 2014 wurde der Patient mit zwei Zyklen von je fünf Plasmapheresen und einer dreimaligen Immunadsorption mittels einer Tryptophansäule behandelt. Aufgrund einer fehlenden Befundbesserung wurde auf Rituximab mit zwei Initiierungszyklen in einer Dosis von je 1000 mg intravenös eskaliert. Die Therapie war klinisch erfolgreich, auch elektrophysiologisch zeigte sich eine kontinuierliche Besserung und experimentell waren die Autoantikörper nicht mehr nachweisbar (siehe 5.6.4), weswegen Erhaltungszyklen mit je 1000 mg Rituximab im Abstand von sechs Monaten durchgeführt wurden. Der Patient sprach bei einer vorübergehenden, infektgetriggerten Verschlechterung im Dezember 2014 auf eine fünfmalige Plasmapherese und eine intravenöse Methylprednisolonpulsstherapie mit 5 g über fünf Tage gut an. Beim letzten stationären Aufenthalt wurde der vierte Zyklus der Erhaltungstherapie mit Rituximab verabreicht.

Bei Patient 6 handelt es sich um eine zum Zeitpunkt der Rekrutierung 69-jährige, weibliche Patientin mit der Diagnose GBS (AIDP), die sich eine Woche nach der Erstmanifestation im November 2011 stationär in der Neurologischen Klinik des

Universitätsklinikums Würzburg vorstellte. Neurologische oder autoimmunvermittelte Vorerkrankungen waren bei der Patientin nicht bekannt. Die Erstsymptome der Erkrankung waren schwere neuropathische lumbale Schmerzen und Extremitätenschmerzen zehn Tage nach einer Infektion des oberen Respirationstraktes. In Folge entwickelten sich rasch von distal nach proximal aufsteigende, multimodale Sensibilitätsstörungen sowie eine Gangunsicherheit und eine rechtsbetonte, an der oberen Extremität distal- und an der unteren Extremität proximalbetonte schlaffe Tetraparese mit einem MRC-Summenscore von 56/60 in der formalen Kraftprüfung und eine generalisierte Areflexie. Eine vegetative Beteiligung oder Hirnnervenbeteiligung lag nicht vor. Im Liquor zeigte sich eine zytoalbuminäre Dissoziation (2 Zellen/ $\mu$ l und 167 mg/dl Gesamtprotein) ohne einen Hinweis auf ein infektiöses Geschehen. Anti-Gangliosid-Antikörper konnten nicht nachgewiesen werden. Bildgebende Verfahren oder diagnostische Biopsien wurden nicht durchgeführt. Elektrophysiologisch zeigten sich initial in der motorischen Neurographie eine Amplitudenreduktion an einem Nerven und verlängerte F-Wellen-Latenzen an zwei Nerven; im Verlauf kam es auch zur Amplitudenreduktion in der sensiblen Neurographie ohne einen pathologischen Befund in der Elektromyographie. Im weiteren Progress der Erkrankung dominierte das Bild einer Demyelinisierung in Form von verlängerten Nervenleitungsgeschwindigkeiten mit einem Leitungsblock und verlängerten distal motorischen Latenzen in den motorischen Neurographien. Symptomatisch wurde mit 200 mg Pregabalin täglich behandelt, unter fünf Plasmapheresebehandlungen kam es vier Wochen nach Erstmanifestation zu einer Besserung der klinischen Symptomatik. Nach einer Rehabilitationsphase zeigten sich vier Monate nach dem Erkrankungsbeginn - bis auf eine persistierende Dysästhesie an der linken distalen unteren Extremität und eine leichte Ataxie - keine klinischen neurologischen Residuen und analog dazu elektrophysiologisch eine deutliche Befundbesserung mit einer rückläufig verlängerten F-Wellen-Latenz eines motorischen Nerven bei ansonsten normwertigen sensiblen und motorischen Neurographien und Elektromyographien. Die Detektion der Anti-Caspr-Antikörper erfolgte im Dezember 2015 aus konserviertem PE-Material und hatte keine therapeutische Relevanz. In einer

Follow-Up-Untersuchung im Jahr 2016 präsentierte sich die Patientin weiterhin ohne Residuen, es war also bei einem monophasischen, klassischen Verlauf eines GBS geblieben. Auch eine zu diesem Zeitpunkt abgenommene Serumprobe zeigte keine Immunreaktivität gegen Caspr (Abbildung 37, B) im Gegensatz zum PE-Material während der Akutphase der Erkrankung (Abbildung 37, A).



**Abbildung 37: Bindung an Caspr-transfizierte HEK-293-Zellen im Verlauf (Patient 6)**  
Einzelfärbungen an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen von PE-Material zum Zeitpunkt der Rekrutierung (A: November 2011) und von Serum im Rahmen einer Follow-Up-Untersuchung nach Remission (B: Mai 2016) bei Patient 6. Maßstab = 10 µm.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
vorangegangener Infekt	nein	nein	nein	k.A.	ja	ja
Lokalisation der motorischen Symptome	proximal > distal Bein > Arm rechts > links	distal > proximal Bein > Arm rechts = links	distal > proximal Arm > Bein rechts > links	distal > proximal Bein > Arm links > rechts	distal > proximal Bein > Arm rechts = links	distal = proximal Arm = Bein rechts > links
MRC-Summenscore	53	22	44	39	58	56
Atemmuskulatur	betroffen	betroffen	nicht betroffen	nicht betroffen	nicht betroffen	nicht betroffen
sensible Beteiligung	∅	distale Dysästhesien Hypästhesien	Kribbel- parästhesien	Dysästhesien	Kribbel- parästhesien Dysästhesien Hypästhesien Schmerz	Kribbel- parästhesien Dysästhesien Hypästhesien Schmerz
vegetative Beteiligung	RR-Schwankungen, HRS	HRS, Sinusarrest	∅	∅	∅	∅
betroffene Hirnnerven	III, VII	VII, XI, XII	III, VII	∅	∅	∅
Muskeleigenreflexe	Hypo- und Areflexie	Areflexie	Areflexie	Areflexie	Hyporeflexie	Areflexie
Liquorbefund (Zellzahl pro µl/ Gesamteiweiß)	1/ 90 mg/dl	0/ 204 mg/dl	3/ 416 mg/dl	3/ 92 mg/dl	8/ 52 mg/dl	2/ 167 mg/dl
<i>Elektrophysiologie</i>						
sensible Amplitude	↓	↓	↓	↔	∅ RA	↔
sensible NLG	↓	↓	↓↓	↔	∅ RA	↔
motorische Amplitude	↓↓	↓	↓	↔	↓↓	↓
motorische NLG	↔	↓	↓↓	↓	↓↓↓	↓
dmL	↑	↑	↑↑	↑	↑↑↑	↑↑
Dispersion	nein	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	nein
Leitungsblock	partiell	nein	multipel	nein	nein	nein
F-Wellen-Latenz	↑	↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑
EMG	n.d.	k.A.	k.A.	∅ SpA	k.A.	∅ SpA

**Tabelle 26: klinische Daten bei der Erstmanifestation der Erkrankung (Patient 1-6)**

Abkürzungen: ∅ = keine, ↑ = erhöht/verlängert, ↓ = erniedrigt/verkürzt, ↔ = normwertig, dmL = distal motorische Latenz, EMG = Elektromyographie, HRS = Herzrhythmusstörungen, k.A. = Keine Angabe, n.d. = nicht durchgeführt, NLG = Nervenleitungsgeschwindigkeit, RA = Reizantwort, RR = Blutdruck, SpA = Spontanaktivität.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Krankheitsdauer bis zur Rekrutierung	5 Wochen	21 Jahre	18 Monate	5 Wochen
Lokalisation der motorischen Symptome	proximal > distal Bein > Arm links > rechts	distal > proximal Bein > Arm rechts = links	distal > proximal Arm > Bein rechts > links	distal > proximal Bein > Arm links > rechts
MRC-Summenscore	45	40	48	39
Muskeleigenreflexe	Areflexie	Areflexie	Areflexie	Areflexie
distale sensible Beteiligung	Hypästhesie Pallhypästhesie	Hypästhesie Dysästhesie Pallanästhesie Lagesinn eingeschränkt Thermanästhesie	Kribbel-parästhesien Pallanästhesie Thermanästhesie	Pallanästhesie
vegetative Beteiligung	RR-Schwankung	Ø	Ø	Ø
betroffene Hirnnerven	III, VII, IX, X, XI	Ø	VII	Ø
weitere neurologische Symptome	nein	Halte- und Aktionstremor sensible Ataxie	Halte- und Aktionstremor Ruhetremor sensible Ataxie	Ruhetremor Ataxie
<i>Liquorbefund (Jahr)</i>	2013	2010	<i>n.d.</i>	2007
Zellzahl pro µl	5	3		10
Gesamteiweiß	304,8 mg/dl	720 mg/dl		100 mg/dl
Albuminquotient (Altersgrenzwert)	79,1 (<9)	12,9 (<8)		21,3 (<9)
<i>Elektrophysiologie</i>				
sensible Amplitude	↓↓, z.T. Ø RA	Ø RA	Ø RA	↓
sensible NLG	↓, z.T. Ø RA	Ø RA	Ø RA	↓
motorische Amplitude	↓↓	↓, z.T. Ø RA	↓↓↓	↓↓
motorische NLG	↓	↓, z.T. Ø RA	↓↓	↓
dmL	↑	↑↑, z.T. Ø RA	↑↑	↑
Dispersion	nein	nein	nein	nein
Leitungsblock	partiell N, tibialis	nein	nein	nein
F-Wellen-Latenz	Ø RA	Ø RA	Ø RA	Ø RA
EMG	chron. neurogene Veränderungen SpA	z.T. Ø Potential chron. neurogene Veränderungen SpA	chron. neurogene Veränderungen SpA	chron. neurogene Veränderungen Ø SpA
Hautbiopsie	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	Denervierung nodale Architekturstörung Ø Entzündung	Denervierung nodale Architekturstörung
Suralisbiopsie	<i>n.d.</i>	starker Axonverlust > Demyelinisierung	starker Axonverlust > aktive Demyelinisierung	Axonverlust = aktive Demyelinisierung

		Entzündung  Ø Regeneration	Entzündung mit Makrophageninfiltrat  Ø Regeneration	Entzündung mit Makrophagen- und T-Zell-Infiltrat  Regeneration
pathologische Zusatzserologie	Ø	Ø	Ø	Anti-ANA schwach positiv
Anti-Gangliosid-AK	Anti-GM1 negativ	Anti-GM1, Anti-GM2, Anti-GM3, Anti-GQ1b, Anti-GD1a negativ	Anti-MAG negativ	Anti-GM1, Anti-GQ1b negativ
paranodale AK	Anti-Contactin-1	Anti-Contactin-1	Anti-Contactin-1	Anti-Contactin-1
wegweisende pathologische Bildgebung	nein (cCT, MRT HWS, BWS, LWS)	cCT (2010): infratentoriell erweiterte Liquorräume, ggf. Kleinhirnatrophie	nein (cCT, CT LWS)	nein (cCT, cMRT, MRT HWS)

**Tabelle 27: diagnostische Komplementierung der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4) bei der Rekrutierung an der Neurologischen Klinik des UKW**

Abkürzungen: Ø = keine, ↑ = erhöht/verlängert, ↓ = erniedrigt/verkürzt, ↔ = normwertig, AK = Antikörper, BWS = Brustwirbelsäule, chron. = chronisch, cCT = craniale Computertomographie, cMRT = craniale Magnetresonanztomographie, CT = Computertomographie, dmL = distal motorische Latenz, EMG = Elektromyographie, HWS = Halswirbelsäule, LWS = Lendenwirbelsäule, MRT = Magnetresonanztomographie, N. = Nervus, n.d. = nicht durchgeführt, NG = Neurographie, NLG = Nervenleitungsgeschwindigkeit, RA = Reizantwort, RR = Blutdruck, SpA = Spontanaktivität, UKW = Universitätsklinikum Würzburg, z.T. = zum Teil.

	Patient 5	Patient 6
Krankheitsdauer bis zur Datenerhebung	15 Monate	3 Wochen
Lokalisation der motorischen Symptome	distal > proximal Bein > Arm rechts = links	distal = proximal Arm = Bein rechts > links
MRC-Summenscore	44	56
Muskeleigenreflexe	Areflexie	Areflexie
distale sensible Beteiligung	Kribbelparästhesien Dysästhesien Hypästhesien Pallhypästhesie Hypalgesie Hypthermästhesie Lagesinn aufgehoben	Kribbelparästhesien Dysästhesien Hypästhesien Pallhyp-/ -anästhesie Normalgesie Normothermästhesie Lagesinn intakt
vegetative Beteiligung	Ø	Ø
betroffene Hirnnerven	V	Ø
weitere neurologische Symptome	neuropathischer Schmerz	neuropathischer Schmerz

Liquorbefund (Jahr)	2014	2011
Zellzahl pro µl	46	3
Gesamteiweiß	168,2 mg/dl	167 mg/dl
Albuminquotient (Altersgrenzwert)	28,6 (<7)	28,1 (<9)
<i>Elektrophysiologie</i> sensible Amplitude sensible NLG motorische Amplitude motorische NLG dmL Dispersion Leitungsblock F-Wellen-Latenz EMG	Ø RA Ø RA ↓↓↓, z.T. Ø RA ↓↓, z.T. Ø RA ↑↑, z.T. Ø RA ja nein Ø RA z.T. Ø Potential chron. neurogene Veränderungen, SpA	↓ ↔ ↓↓ ↓ ↑↑ ja ja, N. tibialis ↑↑ Normalbefund
Hautbiopsie	Ø Denervierung Ø Entzündung nodale Architekturstörung	n.d.
Suralisbiopsie	starker, aktiver Axonverlust > Demyelinisierung  Entzündung mit Makrophagen- und T-Zell-Infiltrat  Ø Regeneration  nodale Architekturstörung	n.d.
pathologische Zusatzserologie	Anti-ANA positiv	n.d.
Anti-Gangliosid-AK	Anti-GM1, Anti-GM2, Anti-GQ1b, Anti-GD1b, Anti-MAG negativ	Anti-GM1, Anti-GM2, Anti-GQ1b, Anti-GD1b, Anti-MAG negativ
paranodale AK	Anti-Caspr	Anti-Caspr
wegweisende pathologische Bildgebung	sMRT: Hyperintensität im Plexus lumbosacralis,  KM-Aufnahme in den Spinalganglien  cMRT und Ganzkörper-FDG-PET unauffällig.	n.d.

**Tabelle 28: diagnostische Komplementierung der Anti-Caspr-positiven Patienten bei der Rekrutierung am UKW (Patient 5) und drei Wochen nach Erkrankungsbeginn (Patient 6)**

Abkürzungen: Ø = keine, ↑ = erhöht/verlängert, ↓ = erniedrigt/verkürzt, ↔ = normwertig, AK = Antikörper, cMRT = craniale Magnetresonanztomographie, dmL = distal motorische Latenz, EMG = Elektromyographie, FDG-PET = Fluordesoxyglukose-Positronenemissionstomographie, KM = Kontrastmittel, N. = Nervus, n.d. = nicht durchgeführt, NG = Neurographie, NLG = Nervenleitungsgeschwindigkeit, sMRT = spinale Magnetresonanztomographie, RA = Reizantwort, SpA = Spontanaktivität, z.T. = zum Teil.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
IVIG	initiale Besserung (Akutphase)	Ø Besserung (chronische Phase)	initiale Besserung (Akutphase)	initiale Besserung (Akutphase)	Ø Besserung	n.d.
PE	leichte Besserung	gute Besserung	gute Besserung	leichte Besserung	keine Besserung	gute Besserung
Glukokortikoide	keine Besserung	keine Besserung	gute Besserung Therapieabbruch (Nebenwirkungen)	keine Besserung	kurzfristige Besserung	n.d.
Immunsuppressiva						
<i>Azathioprin</i>	n.d.	Ø Besserung	klinische Besserung Therapieabbruch (Nebenwirkungen)	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ciclosporin A</i>	n.d.	n.d.	kurzfristige Besserung	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Cyclophosphamid</i>	n.d.	n.d.	klinische Stabilisierung, elektrophysiologisch Progress	klinisch und elektrophysiologisch gute Besserung	n.d.	n.d.
Rituximab	n.d.	leichte Besserung Therapieabbruch (Nebenwirkungen)	klinisch und elektrophysiologisch gute Besserung	n.d.	klinisch und elektrophysiologisch gute Besserung	n.d.

**Tabelle 29: Therapieansprechen (Patient 1-6)**

Abkürzungen: Ø = keine, IVIG = Intravenöse Immunglobuline, n.d. = nicht durchgeführt, PE = Plasmapherese.

### 5.6.2 GBS-artiger Beginn, Ataxie, Tremor sowie histopathologisch vorwiegend chronisch-axonale Schädigung als gemeinsame Merkmale Anti-Contactin-1-positiver Patienten

Bei den Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4) fällt ein gemeinsamer klinischer Phänotyp mit einem GBS-artigen Beginn der Erkrankung auf. Dieser ist insgesamt bei zehn der 105 CIDP-Patienten (9,5%) beschrieben. Der Anteil von Patienten mit Anti-Contactin-1-Antikörpern liegt somit in dieser Subgruppe bei 40% (4/10) im Vergleich zu 3,8% (4/105) in der Gesamtkohorte der CIDP-Patienten. Bei keinem Patienten gab es einen Hinweis auf eine infektgetriggerte Immunreaktion. Es kam bei allen Patienten zu einer rasch progredienten, hochgradigen, distal-betonten, motorischen schlaffen Tetraparese, zu einer Beteiligung der Atemmuskulatur und zu einer vegetativen Beteiligung bei zwei, zu einer Hirnnervenbeteiligung bei drei der vier Patienten. Alle Patienten zeigten initial nur eine geringe sensible Beteiligung. Zu Erkrankungsbeginn überwogen elektrophysiologisch Zeichen der Demyelinisierung mit einem zusätzlichen Vorkommen von Leitungsblöcken bei zwei der vier Patienten. Nach einer anfänglichen Besserung der Symptomatik kam es zu einem chronisch-progredienten Verlauf mit nun ebenfalls zunehmenden sensiblen Symptomen bei allen Patienten und zur Entwicklung einer sensiblen Ataxie bei drei Patienten (Patient 2-4). Bei Patient 2 war der Verlauf schubförmig mit Phasen der Stabilisierung und Verschlechterung, bei Patient 3 schleichend progredient, bei Patient 1 und 4 ohne langjähriges Follow-Up nicht ausreichend beurteilbar. Es zeigten sich bei allen Patienten im Verlauf vorwiegend Zeichen einer axonalen Schädigung in der Elektrophysiologie mit hochgradigen, motorischen und sensiblen Amplitudenreduktionen ohne Leitungsblöcke bei nur mittelgradig verringerten Nervenleitungsgeschwindigkeiten sowie verlängerten distal motorischen Latenzen. Elektromyographisch konnte bei allen Patienten ein chronisch-neurogener Umbau nachgewiesen werden, bei drei der vier Patienten einhergehend mit pathologischer Spontanaktivität. Histopathologisch offenbarte sich bei den drei untersuchten Patienten in der Suralisbiopsie das Bild einer schweren, eher axonalen als demyelinisierenden Neuropathie

ohne (Patient 2 und 3) oder mit nur geringen (Patient 4) Regenerationszeichen und Entzündungszeichen. Insgesamt wurden 57 der 105 CIDP-Patienten (54%) am Universitätsklinikum Würzburg biopsiert, davon zeigten nur sieben Patienten (12%) diese vorwiegend axonale Schädigung in der Biopsie. Der Anteil von Patienten mit Anti-Contactin-1-Antikörpern liegt in der Subgruppe von CIDP-Patienten mit histologisch axonaler Schädigung also bei 57%. In den Hautbiopsien war bei allen biopsierten Patienten eine schwere nodale Architekturstörung mit verlängerten Schnürringen und Verlust der Immunreaktivität gegen Caspr an einigen Schnürringen auffällig (Doppler et al, 2015b). Des Weiteren kam es zu einer zunehmenden Störung der Blut-Hirn-Schranke. Im Verlauf entwickelte sich bei den drei Patienten, die in der chronischen Phase einer Evaluation zugänglich waren, ein Ruhe- (Patient 3 und 4), Halte- (Patient 2 und 3) und/oder Intentionstremor (Patient 2 und 3). Die Patienten zeigten nur in der Akutphase der Erkrankung ein kurzzeitiges Therapieansprechen auf IVIG, nicht jedoch in der chronischen Phase. Eine Plasmapheresetherapie war bei allen Patienten wirkungsvoll, eine Therapie mit Glukokortikoiden allerdings bei drei der vier Patienten nicht. Immunsuppressiva führten bei den beiden behandelten Patienten zu einer Stabilisierung oder sogar zu einer Besserung. Das Therapieansprechen auf Rituximab ist in Kapitel 5.6.4 dargestellt.

### 5.6.3 Neuropathischer Schmerz als gemeinsames Merkmal Anti-Caspr-positiver Patienten

Der Anti-Caspr-positive CIDP-Patient (Patient 5) präsentierte sich ebenfalls mit einem GBS-artigen Beginn, die Prävalenz von Anti-Caspr-Autoantikörpern in dieser CIDP-Subgruppe liegt somit bei 10% (1/10). Insgesamt kamen also bei 50% (5/10) aller CIDP-Patienten mit einem GBS-artigen Beginn Autoantikörper gegen paranodale Proteine vor. Der Anteil von Anti-Caspr-positiven Patienten in der GBS-Kohorte beträgt mit nur einer Patientin 4,8% (1/21). Sowohl bei Patient 5 als auch bei Patient 6 kam es kurz vor der Erstmanifestation zu einem respiratorischen Infekt, allerdings ohne einen spezifischen Erregernachweis. Auffällig wa-

ren bei beiden Patienten in der Akutphase starke neuropathische Schmerzen sowie eine massive sensible Beteiligung. Elektrophysiologisch überwogen in der Initialphase der Erkrankung bei beiden Patienten Zeichen von Demyelinisierung, beide Patienten wiesen einen Leitungsblock auf. Im chronischen Stadium der Erkrankung kam es bei Patient 5, wie auch bei den Anti-Contactin-1-positiven CIDP-Patienten (Patient 1-4), zu einer axonalen Schädigung mit einer massiven Amplitudenreduktion bis hin zu nicht mehr ableitbaren Reizantworten und einem chronisch-neurogenen Umbau der Muskulatur mit einem elektromyographischen Nachweis von Spontanaktivität. Die Biopsien von Patient 5 ließen analog zu den Biopsiebefunden der Anti-Contactin-1-positiven Patienten eine schwere, axonale Schädigung ohne Regenerationszeichen sowie eine schwere nodale Architektur-störung erkennen (Doppler et al, 2016; Doppler et al, 2015b). Bei Patient 5 trat im Verlauf eine zunehmende Störung der Blut-Hirn-Schranke auf. Bei Patient 6 wurde bei einem monophasischen Verlauf mit einer klinischen und elektrophysiologischen Remission unter Plasmapherese keine komplementierende Diagnostik mittels Biopsien oder einer erneuten Liquorpunktion durchgeführt. Patient 5 sprach therapeutisch weder auf IVIG noch auf eine Plasmapherese an. Der Therapieerfolg unter Rituximab ist in Kapitel 5.6.4 beschrieben.

#### 5.6.4 Klinische Besserung und Reduktion der paranodalen Antikörperlast unter Rituximab-Therapie bei Patient 3 und 5

Bei drei Patienten mit Autoantikörpern gegen Anti-Contactin-1 (Patient 2 und 3) oder Anti-Caspr (Patient 5) wurde eine Off-Label-Therapie mit Rituximab initiiert, der klinische Verlauf evaluiert und parallel die Anti-Contactin-1-Titer oder die Immunreaktivität gegen Caspr an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen sowie das Bindungsverhalten an murinen Zupfnerven experimentell bestimmt.

Eine langfristige, objektive Evaluation war bei Patient 2 bei Klinikaufenthalten in unregelmäßigen Abständen, einer unvollständig durchgeführten elektrophysiologischen Diagnostik sowie einem Therapieabbruch aufgrund von Nebenwirkungen nicht möglich (siehe Kapitel 5.6.1). Tabelle 30 fasst die klinischen und experimentellen Daten bei der Rekrutierung sowie vor und unter der Therapie mit Rituximab zusammen.

Datum	04/2014	04/2016	02/2017
Therapiezeitpunkt (Rituximab)	bei der Rekrutierung	vor Therapie mit Rituximab	10 Monate nach 1. Gabe
B-Zell-Anteil an Lymphozyten im peripheren Blut	n.d.	3%	0,1%
Material	PE-Material	Serum	Serum
Anti-Contactin-1-Titer (ELISA)	1:2000	negativ	n.d.
Bindung an murine Zupfnervenpräparate	paranodal	∅	∅
MRC-Summscore	40	42	42
Sensibilitätsstörungen	stark	stark	gebessert
<u>Elektro-neurographie</u>			
<b>N. medianus sensibel</b>			
Seite	rechts	rechts	n.d.
Amplitude (µV)	∅ RA	∅ RA	n.d.
NLG (m/s)	∅ RA	∅ RA	n.d.
<b>N. ulnaris sensibel</b>			
Seite	rechts	n.d.	n.d.
Amplitude (µV)	∅ RA	n.d.	n.d.
NLG (m/s)	∅ RA	n.d.	n.d.
<b>N. tibialis motorisch</b>			
Seite	n.d.	rechts	n.d.
Amplitude distal (µV)	n.d.	∅ RA	n.d.

Amplitude proximal ( $\mu$ V)	n.d.	Ø RA	n.d.
Leitungsblock	n.d.	Ø RA	n.d.
NLG (m/s)	n.d.	Ø RA	n.d.
dmL	n.d.	Ø RA	n.d.
F-Wellen-Latenz (ms)	n.d.	Ø RA	n.d.
Dispersion	n.d.	Ø RA	n.d.
<b>N. medianus motorisch</b>			
Seite	rechts	rechts	n.d.
Amplitude distal ( $\mu$ V)	6,6	6,8	n.d.
Amplitude proximal ( $\mu$ V)	2,9	6,3	n.d.
Leitungsblock	ja	nein	n.d.
NLG (m/s)	26,4	34,3	n.d.
dmL	9,7	4,8	n.d.
F-Wellen-Latenz (ms)	Ø RA	Ø RA	n.d.
Dispersion	nein	nein	n.d.
<b>N. ulnaris motorisch</b>			
Seite	rechts	n.d.	n.d.
Amplitude distal ( $\mu$ V)	9,1	n.d.	n.d.
Amplitude proximal ( $\mu$ V)	9,2	n.d.	n.d.
Leitungsblock	nein	n.d.	n.d.
NLG (m/s)	43,5	n.d.	n.d.
dmL	6,2	n.d.	n.d.
F-Wellen-Latenz (ms)	57,2	n.d.	n.d.
Dispersion	nein	n.d.	n.d.

**Tabelle 30: klinische und experimentelle Daten im Follow-Up unter Rituximab-Therapie (Patient 2)**  
 Abkürzungen: Ø = keine, dmL = distal motorische Latenz, ms = Millisekunden, N. = Nervus, n.d. = nicht durchgeführt, NLG = Nervenleitungsgeschwindigkeit, RA = Reizantwort.

Bei Patient 3 kam es im Verlauf der Therapie mit Rituximab zu einer deutlichen Besserung der Kraft initial mit einem Anstieg des MRC-Summscores auf 58/60 und anschließend zu einer Stabilisierung bei einem MRC-Summscore von 54-55/60 jeweils vor Verabreichen der Erhaltungszyklen und einem parallel verbesserten Gangbild, die Patientin war nun ohne Zuhilfenahme eines Rollators gehfähig und konnte erneut Treppen steigen. Der Ruhe-, Halte- und Intentionstremors sowie die Dys- und Hypästhesien waren vollständig, die Ataxie teilweise rückläufig, dadurch ergab sich eine starke funktionelle Besserung (ODSS = 3/7). Elektrophysiologisch kam es ebenfalls zu einer Befundbesserung bei einem gleichzeitig sinkenden Anti-Contactin-1-Titer, beim letzten stationären Aufenthalt

war dieser vor Verabreichung der Therapie wieder angestiegen. Nebenwirkungen unter der Therapie traten nicht auf. Tabelle 31 fasst die klinischen und experimentellen Daten vor und unter der Therapie mit Rituximab zusammen.

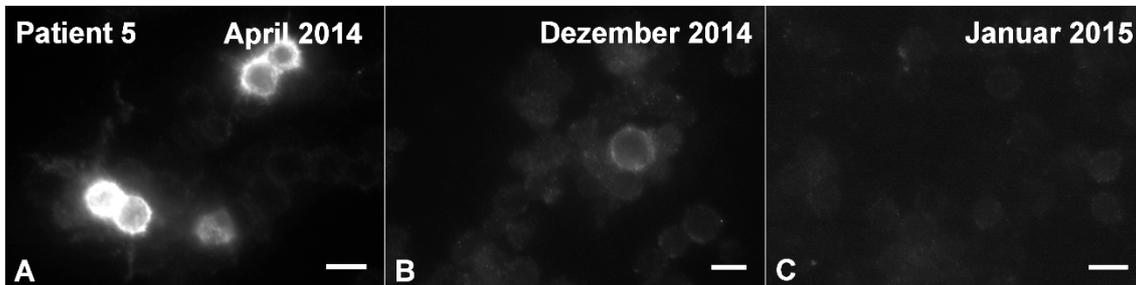
Datum	05/2014	07/2014	10/2015	08/2016
Therapiezeitpunkt (Rituximab)	naiv	5 Wochen nach erstem Zyklus	vor zweitem Erhaltungszyklus	vor drittem Erhaltungszyklus
B-Zell-Anteil an Lymphozyten im peripheren Blut	26%	n.d.	5%	3%
Material	Serum	Serum	Serum	Serum
Anti-Contactin-1-Titer (ELISA)	1:10.000	1:3000	1:500	1:3000
Bindung an murine Zupfnervenpräparate	paranodal	paranodal	paranodal	∅
MRC-Summenscore	54	58	54	55
Gehhilfe	Rollator	Rollator	Rollator	∅
Sensibilitätsstörungen	stark	reduziert	∅	∅
Tremor	stark	reduziert	∅	∅
<u>Elektro-neurographie</u>				
<b>N. suralis sensibel</b>				
Seite	rechts	n.d.	n.d.	n.d.
Amplitude (µV)	∅ RA	n.d.	n.d.	n.d.
NLG (m/s)	∅ RA	n.d.	n.d.	n.d.
<b>N. tibialis motorisch</b>				
Seite	rechts	rechts	n.d.	n.d.
Amplitude distal (µV)	0,03	0,3	n.d.	n.d.
Amplitude proximal (µV)	0,16	0,4	n.d.	n.d.
Leitungsblock	ja	nein	n.d.	n.d.
NLG (m/s)	26,7	26,7	n.d.	n.d.
dmL	14	8,3	n.d.	n.d.
F-Wellen-Latenz (ms)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dispersion	nein	ja	n.d.	n.d.
<b>N. medianus motorisch</b>				
Seite	rechts	n.d.	rechts	rechts
Amplitude distal (µV)	1,507	n.d.	4,6	2,3
Amplitude proximal (µV)	1,529	n.d.	2,9	1,6
Leitungsblock	nein	n.d.	partiell	partiell
NLG (m/s)	21,8	n.d.	31	32,7
dmL	12,8	n.d.	9,8	7,5
F-Wellen-Latenz (ms)	∅ RA	n.d.	∅ RA	∅ RA
Dispersion	nein	n.d.	nein	nein

<b>N. ulnaris motorisch</b>				
Seite	rechts	rechts	rechts	rechts
Amplitude distal ( $\mu$ V)	0,4	2,4	2,1	3,5
Amplitude proximal ( $\mu$ V)	0,6	1,5	0,8	2,5
Leitungsblock	nein	partiell	ja	partiell
NLG (m/s)	29,5	32,3	55,6	33,1
dmL	11	8,5	7,1	4,7
F-Wellen-Latenz (ms)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dispersion	nein	ja	nein	nein

**Tabelle 31: klinische und experimentelle Daten im Follow-Up unter Rituximab-Therapie (Patient 3)**  
 Abkürzungen:  $\emptyset$  = keine, dmL = distal motorische Latenz, ms = Millisekunden, N. = Nervus, n.d. = nicht durchgeführt, NLG = Nervenleitungsgeschwindigkeit, RA = Reizantwort.

Bei Patient 5 kam es nach der Initiierung der Therapie mit Rituximab zu einem raschen Rückgang der neuropathischen Schmerzen, acht Monate nach dem Therapiebeginn war der Patient bereits vollkommen schmerzfrei. Im Verlauf kam es ebenfalls zu einem langsamen Rückgang der Sensibilitätsstörungen und zu einer Besserung der Kraft, zu einer Volumenzunahme der Muskulatur und einer Besserung des Gangbildes. Der Patient war im Verlauf mit Peroneausschienen ohne Gehhilfe mobil und konnte erneut Fahrradfahren und Treppen steigen, der ODSS war von 7/12 auf 3/12 gesunken. Auf eine analgetische Medikation konnte bei vollständig rückläufigen neuropathischen Schmerzen verzichtet werden. Elektrophysiologisch zeigte sich eine kontinuierliche Besserung unter der Therapie mit nun wieder ableitbaren Potentialen in den sensiblen und motorischen Neurographien, allerdings lag weiterhin eine starke Amplitudenreduktion als Ausdruck der axonalen Schädigung und eine leichte Reduktion der Nervenleitungsgeschwindigkeiten bei noch verlängerten distal motorischen Latenzen und nicht ableitbaren F-Wellen vor. Nach einer initialen Reduktion der Immunreaktivität gegen Caspr an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen fünf Monate nach dem Therapiebeginn waren unter den Erhaltungszyklen mit Rituximab sowohl an den HEK-293-Zellen als auch an den murinen Zupfnervenpräparaten keine Anti-Caspr-Autoantikörper mehr nachweisbar (Abbildung 38, B und C). Eine Bestimmung des Titers wurde bei den Anti-Caspr-Antikörpern aufgrund der Verwendung nicht exakt quantifizierbarer Methoden in dieser Studie nicht durchgeführt. Die

Ergebnisse konnten allerdings mittels Durchflusszytometrie bestätigt und quantifiziert werden (Doppler et al, 2016). Die klinischen und experimentellen Daten vor und unter der Therapie mit Rituximab sind in Tabelle 32 zusammengefasst.



**Abbildung 38: Bindung an Caspr-transfizierte HEK-293-Zellen im Verlauf (Patient 5)**  
 Einzelfärbungen mit Serum von Patient 5 im Verlauf. A: bei der Rekrutierung (April 2014), B: 5 Monate nach Therapiebeginn (Dezember 2014), C: 6 Monate nach Therapiebeginn (Januar 2015). Es zeigt sich eine Reduktion (B) beziehungsweise ein Verlust (C) der Immunreaktivität gegen Caspr. Maßstab = 10 µm.

Datum	04/2014	12/2014	01/2015	05/2015	02/2016
Therapiezeitpunkt (Rituximab)	naiv	fünf Monate nach erstem Zyklus	vor zweitem Zyklus	vier Monate nach zweitem Zyklus	vor viertem Zyklus
B-Zell-Anteil an Lymphozyten im peripheren Blut	14%	0,1%	0,5%	0%	0%
Material	Serum	Serum	Serum	Serum	Serum
Immunreaktivität an transfizierten HEK-293-Zellen	stark	reduziert	∅	n.d.	n.d.
Bindung an murine Zupfnervenpräparate	paranodal	negativ	negativ	n.d.	negativ
MRC-Summscore	44	48	52	52	54
Gehhilfe	Rollstuhl	zwei Gehstützen	eine Gehstütze	Peroneus-schiene	Peroneus-schiene
Sensibilitätsstörungen	stark	rückläufig	rückläufig	∅	∅
Schmerz	stark (10/10)	rückläufig	∅	∅	∅
<u>Elektro-neurographie</u>					
<b>N. suralis sensibel</b>					
Seite	rechts	n.d.	n.d.	rechts	rechts
Amplitude (µV)	∅ RA	n.d.	n.d.	∅ RA	1,6
NLG (m/s)	∅ RA	n.d.	n.d.	∅ RA	37,2
<b>N. medianus sensibel</b>					

Seite	rechts	n.d.	n.d.	rechts	rechts
Amplitude (µV)	Ø RA	n.d.	n.d.	Ø RA	0,5
NLG (m/s)	Ø RA	n.d.	n.d.	Ø RA	35,1
<b>N. tibialis motorisch</b>					
Seite	rechts	n.d.	n.d.	rechts	rechts
Amplitude distal (µV)	Ø RA	n.d.	n.d.	Ø RA	0,06
Amplitude proximal (µV)	Ø RA	n.d.	n.d.	Ø RA	0,144
Leitungsblock	Ø RA	n.d.	n.d.	Ø RA	ja
NLG (m/s)	Ø RA	n.d.	n.d.	Ø RA	22,8
dmL	Ø RA	n.d.	n.d.	Ø RA	11,7
F-Wellen-Latenz (ms)	n.d.	n.d.	n.d.	Ø RA	Ø RA
Dispersion	Ø RA	n.d.	n.d.	Ø RA	nein
<b>N. medianus motorisch</b>					
Seite	rechts	n.d.	n.d.	rechts	rechts
Amplitude distal (µV)	0,1	n.d.	n.d.	0,6	0,4
Amplitude proximal (µV)	0,1	n.d.	n.d.	0,3	0,2
Leitungsblock	nein	n.d.	n.d.	ja	ja
NLG (m/s)	12,8	n.d.	n.d.	24	19,8
dmL	23,7	n.d.	n.d.	9,5	5,7
F-Wellen-Latenz (ms)	Ø RA	n.d.	n.d.	n.d.	Ø RA
Dispersion	ja	n.d.	n.d.	nein	nein
<b>N. axillaris motorisch</b>					
Seite	rechts	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Amplitude distal (µV)	2,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Amplitude proximal (µV)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Leitungsblock	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NLG (m/s)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
dmL	19,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F-Wellen-Latenz (ms)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dispersion	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabelle 32: klinische und experimentelle Daten im Follow-Up unter Rituximab-Therapie (Patient 5)**  
 Abkürzungen: Ø = keine, dmL = distal motorische Latenz, ms = Millisekunden, N. = Nervus, n.d. = nicht durchgeführt, NLG = Nervenleitungsgeschwindigkeit, RA = Reizantwort.

Zusammenfassend ist bei Patient 2 und 3 unter B-Zell-Supprimierung und bei Patient 5 unter B-Zell-Depletion mit Rituximab eine Reduktion (Patient 3) beziehungsweise ein vollständiges Verschwinden (Patient 2, 5) der paranodalen Autoantikörper nachweisbar. Klinisch kam es bei Patient 3 und 5 zum Verschwinden der Sensibilitätsstörungen, des Schmerzes (Patient 5) und des Tremors (Patient 3), sowie zur progredienten Besserung der Kraft und der Befunde der elektrophysiologischen Messungen.

## 6. Diskussion

Teilaspekte der Diskussion sind in bereits veröffentlichten Studien der neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikum Würzburg (Appeltshauser et al, 2017; Doppler et al, 2015a; Doppler et al, 2016; Doppler et al, 2015b), welche während der Arbeit an der Promotion entstanden, in Kurzform dargestellt.

### 6.1 Nodo-Paranodopathien als neue Entität autoimmun-vermittelter Neuropathien

Bei vier Patienten mit CIDP konnten mittels ELISA und Bindungsversuchen an murinen Zupfnerven Anti-Contactin-1-IgG-Antikörper detektiert und durch Bindungsversuche an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen sowie Präinkubationsversuche bestätigt werden. Bei einem Patienten mit CIDP und einer Patientin mit GBS gelang der Nachweis und die Bestätigung von Anti-Caspr-IgG-Autoantikörpern mittels Bindungsversuchen an Zupfnerven und Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen sowie Präinkubationsversuchen. In der restlichen Kohorte der CIDP-, GBS- und MMN-Patienten sowie bei den gesunden und „erkrankten Kontrollen“ wurden keine paranodalen Autoantikörper gegen Contactin-1, Caspr oder Neurofascin-155 detektiert. Alle fünf CIDP-Patienten mit paranodalen Autoantikörpern zeigten einen ähnlichen klinischen Phänotyp mit einem subakuten, GBS-artigen Beginn der Erkrankung und einer schweren motorischen Beteiligung, ähnliche histopathologische Merkmale und ein Therapieansprechen auf antikörperreduzierende Therapieansätze wie eine Plasmapheresebehandlung oder eine B-Zell-Depletion mit Rituximab. Die Subgruppe von CIDP- und GBS-Patienten mit paranodalen Autoantikörpern könnte somit zu einer neuen Krankheitsentität autoimmunvermittelter Neuropathien mit ähnlichen klinischen und pathophysiologischen Merkmalen zugehören, der von A. Uncini neu definierten Entität der Nodo-Paranodopathien (Uncini et al, 2013).

### 6.1.1 Vorstellung des Begriffes Nodo-Paranodopathie und Zuordnung anhand elektrophysiologischer, histopathologischer und klinischer Kriterien

Der Begriff Nodo-Paranodopathie wurde erstmals zur Charakterisierung von mit Anti-Gangliosid-Autoantikörpern assoziierten Neuropathien vorgeschlagen, da die gängigen Konzepte der axonalen oder demyelinisierenden Neuropathie nicht den Ranvier'schen Schnürring als Ausgangspunkt der Erkrankung berücksichtigen und die neue Bezeichnung einen Pathomechanismus hervorhebt, der über den Schnürring angreifende Autoantikörper vermittelt ist (Uncini, 2012; Uncini & Kuwabara, 2015; Uncini et al, 2013). Merkmale einer Nodo-Paranodopathie seien "(1) [...]a pathophysiological continuum from transitory nerve conduction block to axonal degeneration; (2) the conduction block may be due to paranodal myelin detachment, node lengthening, dysfunction or disruption of Na<sup>+</sup> channels [...] (3) the conduction block may be promptly reversible without development of excessive temporal dispersion; (4) axonal degeneration, depending on the specific disorder and its severity, eventually follows the conduction block" (Uncini & Kuwabara, 2015). Mehrere Autoren berücksichtigen diese neue Klassifikation in ihren Studien und bestätigen somit das neue Konzept der Nodo-Paranodopathie (Delmont et al, 2017; Doppler et al, 2015b; Fehmi et al, 2017; Gross et al, 2016; Gursoy et al, 2014; Kuntzer, 2016). Die Anti-Contactin-1- und Anti-Caspr-positiven Patienten dieser Studie erfüllen die Kriterien 1-4 einer Nodo-Paranodopathie:

Elektrophysiologisch zeigten sich initial Leitungsblöcke (Patient 1, 3 und 6) und bei allen Patienten vorrangig „demyelinisierende“ Zeichen. Im Verlauf der chronischen Erkrankung (Patient 1-5) kam es allerdings zu einer Dominanz von „axonalen“ Zeichen in der Elektroneurographie mit hochgradigen Amplitudenreduktionen und einem Verschwinden der Leitungsblöcke. Nur bei der Anti-Caspr-positiven Patientin mit GBS lag eine reversible Erkrankung ohne sekundäre axonale Schädigung und klinische und elektrophysiologische Progredienz vor. Als Unterschied zur Anti-Gangliosid-Antikörper-vermittelten Nodo-Paranodopathie waren

sowohl bei den CIDP-Patienten als auch bei der GBS-Patientin im Initialstadium der Erkrankung nicht nur Leitungsblöcke apparent, sondern bereits elektrophysiologische Zeichen von „Demyelinisierung“, wie zum Beispiel eine Reduktion der Nervenleitungsgeschwindigkeit und verlängerte F-Wellen-Latenzen. Pathophysiologisch wäre dies eher nicht durch eine Demyelinisierung im eigentlichen Sinne, sondern durch eine reine Leitungsstörung im Sinne eines reversiblen Leitungsversagens, wörtlich „reversible conduction failure“ (Kuwabara et al, 1998; Uncini & Kuwabara, 2012), wie es auch bei Patienten mit Anti-Gangliosid-Autoantikörpern beschrieben wurde (Susuki et al, 2012), durch Anti-Contactin-1- oder Anti-Caspr-Antikörper erklärbar. Der axogliale Komplex aus Contactin-1, Caspr und Neurofascin-155 trägt nämlich einen fundamentalen Anteil zur Aufrechterhaltung der Nervenleitungsgeschwindigkeit bei: So lassen sich beispielsweise charakteristische Läsionen am Paranodium bei kongenitalen Caspr-Mutationen erkennen (Saifetiarova et al, 2017; Vallat et al, 2016), im Shm-Caspr-Mausmodell mit mutiertem Caspr zeigen sich nicht nur eine Alteration am Paranodium, sondern ebenfalls reduzierte Nervenleitungsgeschwindigkeiten, Paresen, eine Ataxie und ein sekundärer axonaler Schaden (Sun et al, 2009; Takagishi et al, 2016), im Contactin-1-Knockout-Modell reduziert sich die Nervenleitungsgeschwindigkeit dreifach (Boyle et al, 2001); auch bei Neurofascin-Knockout-Mäusen kommt es zu einer drastischen Reduktion der Nervenleitungsgeschwindigkeit bei einer histopathologisch zwar normalen Myelinisierung, aber einer Alteration der nodalen Architektur (Sherman et al, 2005). Eine nodale Architekturstörung könnte also eine elektrophysiologische „Demyelinisierung“ vortäuschen. Elektrophysiologische Zeichen der klassischen „Remyelinisierung“ wie eine zeitliche Dispersion der Potentiale ist bei den Patienten hingegen nicht prominent. Die Kriterien (2) und (3) der Nodo-Paranodopathie treffen also auf die Anti-Caspr- und Anti-Contactin-1-positiven Patienten zu.

Der zugrunde liegende Pathomechanismus der Neuropathie mit paranodalen Autoantikörpern ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird eine direkte Alteration des axoglialen Komplexes am Paranodium durch die Autoantikörper angenommen. Dafür spricht in dieser Studie die histologisch evidente Störung der nodalen Architektur bei den Anti-Contactin-1-positiven Patienten und die IgG-Ablagerung an den Schnürringen des Suralisnervenpräparates des Anti-Caspr-positiven Patienten (Doppler et al, 2016; Doppler et al, 2015b). Die Komplementbindung durch Anti-Caspr-IgG3-Antikörper und Komplementbindung und -aktivierung durch Anti-Contactin-1-Antikörper sowie deren Beeinflussung durch IVIG und auch das Therapieansprechen beim Entfernen der Antikörper durch Plasmapheresen oder eine B-Zell-Depletion mit einem gleichzeitigen Absinken des Titers und klinisch und elektrophysiologisch einer deutlichen Besserung weisen ebenfalls auf die Pathogenität der Anti-Contactin-1- und Anti-Caspr-Antikörper hin. Der elektronenmikroskopische Nachweis einer nodalen Architekturstörung bei Präsenz von Anti-Contactin-1- oder Anti-Neurofascin-155-Antikörpern mit einer Ablagerung von IgG an den Schnürringen (Koike et al, 2017; Kuwahara et al, 2017b; Vallat et al, 2017), die Störung der Bildung axoglialer paranodaler Komplexe bei der Anwesenheit von gegen Zelladhäsionsmoleküle gerichteten Anti-Contactin-1-Antikörpern (Labasque et al, 2014) sowie Passiv-Transfer-Experimente mit Anti-Contactin-1 an Lewisratten mit Nachweis von Alterationen am Schnürring und einer klinischen Manifestation der Erkrankung (Manso et al, 2016) bestätigen die Hypothese der Pathogenität der Anti-Contactin-1-Autoantikörper über die direkte Interaktion am axoglialen Komplex. Die Anti-Caspr-Autoantikörper wurden in dieser Studie erstmals beschrieben, auch hier sprechen die histopathologischen Veränderungen sowie der Therapieerfolg beim Entfernen der Antikörper für die Pathogenität. Zur Bestätigung fehlen jedoch Studien am Tiermodell und klinisch-experimentelle Studien mit einer größeren Fallzahl.

Die Kriterien (1) und (4) der Nodoparanodopathie, nämlich der Übergang von einer primären Leitungsstörung in sekundär axonale Prozesse, sind bei den Patienten dieser Studie histopathologisch evident. Die im Verlauf entnommenen Suralisbiopsien zeigen vorrangig einen Axonverlust, in den Hautbiopsien fällt eine Verlängerung der Schnürringe und eine nodale Architekturstörung auf (Doppler et al, 2015b). Eine für die klassische CIDP typische, makrophagenabhängige Demyelinisierung liegt bei der Anti-Contactin-1- und Anti-Neurofascin-155-positiven Neuropathie histopathologisch nicht vor (Doppler et al, 2015b; Koike et al, 2017; Ogata et al, 2015); außerdem fehlen größtenteils Anzeichen von Remyelinisierung wie Zwiebelschalenformationen oder zu dünn bemerkte Nervenfasern. Histologisch zeigt sich also ebenfalls, dass die Nodoparanodopathie nicht dem gängigen Konzept einer rein demyelinisierenden inflammatorischen Polyneuropathie zuzuordnen ist, auch wenn elektrophysiologisch, wie oben beschrieben, Gemeinsamkeiten mit klassischen demyelinisierenden Neuropathien vorliegen.

Die Entität der Nodoparanodopathie lässt sich zusammenfassend im Hinblick auf den ähnlichen Pathomechanismus auch auf Neuropathien mit Autoantikörpern gegen den axoglialen paranodalen Komplex erweitern. Diese Zuordnung wird von anderen Autoren ebenfalls bestätigt (Koike et al, 2017; Kuwabara et al, 2017). Zusätzlich ist, je nach vorliegendem Antikörper, eine Unterteilung in einheitliche klinische Phänotypen - wie in den folgenden Kapiteln beschrieben - möglich.

### 6.1.2 Anti-Contactin-1-positive Polyneuropathie mit GBS-artigem Beginn, Tremor und Ataxie

Der in Kapitel 5.6.2 beschriebene Phänotyp Anti-Contactin-1-positiver Patienten mit einem GBS-artigen Beginn, einer schweren distal-betonten motorischen Beteiligung, einer Ataxie, einem Tremor, Zeichen axonaler Schädigung, einem schlechten Therapieansprechen auf IVIG in der chronischen Phase und einem guten Therapieansprechen auf Plasmapheresen und Rituximab deckt sich teil-

weise mit der Beschreibung der Anti-Contactin-1-assoziierten Nod-Paranodopathie in der Literatur. So berichten Querol et al. ebenfalls von einem akuten Erkrankungsbeginn, einer schweren motorischen Beteiligung, einer vorwiegend axonalen Neuropathie, einem schlechten Therapieansprechen auf IVIG (Querol et al, 2013a) und einem guten Therapieansprechen auf Rituximab (Querol et al, 2015) bei Patienten mit Anti-Contactin-1-IgG4-Antikörpern. Ein subakuter Beginn, ein schlechtes Therapieansprechen auf IVIG und zusätzlich eine vorrangige sensible Ataxie sind die Kennzeichen einer japanischen Kohorte Anti-Contactin-1-positiver Patienten (Miura et al, 2015).

Der GBS-artige Beginn der Erkrankung scheint ein Charakteristikum aller Nod-Paranodopathien mit Antikörpern gegen den axoglialen Komplex aus Contactin-1, Neurofascin-155 und Caspr zu sein (Delmont et al, 2017; Doppler et al, 2016; Miura et al, 2015; Querol et al, 2014; Querol et al, 2013a). Ein GBS-artiger Beginn liegt generell nur bei 2-16% aller CIDP-Patienten vor (Odaka et al, 2003; Ruts et al, 2010), in dieser Studie bei 9,5% der CIDP-Patienten. In dieser Subgruppe sind allerdings bei 50% aller Patienten Autoantikörper gegen Contactin-1 oder Caspr nachweisbar. Die Ursache für die hohe Prävalenz von Autoantikörpern in dieser Subgruppe könnte im Pathomechanismus liegen, nämlich einer akut auftretenden primären Leitungsstörung mit verzögert einsetzender sekundärer axonaler Degeneration (vergleiche Kapitel 6.1.1).

Ein Tremor, wie er bei drei der vier Patienten in dieser Studie vorlag, wurde vorwiegend bei Anti-Neurofascin-155-positiver Neuropathie beschrieben (Devaux et al, 2016; Itaya et al, 2016; Ogata et al, 2015; Querol et al, 2014). In einer Studie wurde allerdings auch bei Anti-Contactin-1-positiven Patienten bei 8% eine zerebelläre Ataxie und bei 15% ein Halte- und Intentionstremor beobachtet (Devaux et al, 2016). Der beschriebene Tremor der Patienten (Patient 2-4) ließ sich klinisch deutlich von einer Pseudoathetose bei sensibler Ataxie unterscheiden und zeigte eine zentrale Komponente. Passend dazu binden die Anti-Contactin-1-Antikörper, im Gegensatz zu den Anti-Caspr-Antikörpern, *in vitro* an Strukturen des ZNS wie murine hippocampale Neurone (Patient 1-4) und die Körnerzellschicht

von Schnitten des Ratten-Zerebellums (Patient 1, 3) (Doppler et al, 2016; Doppler et al, 2015b). Besonders die exzitatorischen Körnerzellen und die Golgi-Zellen der Körnerzellschicht werden im Contactin-1-Knockout-Mausmodell in Ihrer Entwicklung gestört, was zu einem Phänotyp mit starker zerebellärer Ataxie führt (Berglund et al, 1999; Bhat et al, 2001). Ebenso kommt es zum zerebellären axonalen Untergang mit konsekutiver zerebellärer Ataxie im Neurofascin-155-Knockoutmodell (Pillai et al, 2009). Die Expression paranodaler Proteine ist somit besonders im Kleinhirn essentiell und strukturelle Schäden durch die Autoantikörper könnten als klinische Folge einen Tremor nach sich ziehen. Der zentrale pathophysiologische Mechanismus der Entstehung des Tremors bleibt allerdings unklar, so spricht der prompte Rückgang des Tremors unter Rituximab-Therapie bei einer gleichzeitigen Titerreduktion der Autoantikörper für einen rein funktionalen oder blockierenden Effekt der Antikörper, andererseits könnte die bei Patient 2 vorliegende zerebelläre Atrophie auf eine axonale Degeneration hindeuten. Zur Herstellung kausaler Zusammenhänge sind daher weitere Studien notwendig. Bei Patient 2-4 fällt zudem auf, dass sich der Tremor erst im Verlauf der Erkrankung manifestiert. Die Latenz der Entwicklung des Tremors könnte einer langsam zunehmenden Infiltration der Antikörper in das ZNS geschuldet sein, parallel zur zunehmenden Schrankenstörung, wie sie bei Patient 1, 2 und 4 im Liquor sichtbar war (vergleiche Kapitel 5.6.1). Der Nachweis von Anti-Neurofascin-155-Antikörpern im Serum bei Erkrankungen des ZNS, wie der kombinierten zentralen und peripheren Demyelinisierung (CCPD) oder der MS (Kawamura et al, 2013; Mathey et al, 2007; Shimizu et al, 2017) gibt ebenfalls einen Hinweis darauf, dass paranodale Autoantikörper über eine gestörte Blut-Hirn-Schranke ins ZNS gelangen und dort pathologisch aktiv sind. Messungen der Autoantikörpertiter im Liquor waren bei den Anti-Contactin-1-positiven Patienten retrospektiv nicht möglich. Gegen einen rein medikamenteninduzierten Tremor bei den nicht mehr therapienaiven Patienten, beispielsweise bei Patient 3 und 4, die mit Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid und Ciclosporin A behandelt wurden, welche wiederum einen medikamenteninduzierten Tremor verursachen können (European FK506 Multicentre Liver Study Group, 1994; Ivnitsky et al, 2011; U.S.

Multicenter FK506 Liver Study Group, 1994), spricht die Komponente des Intentionstremors, welche für einen Ciclosporin A-induzierten Tremor nicht typisch ist (Deuschl et al, 1998), sowie das Verschwinden des Tremors nicht direkt nach dem Absetzen der Immunsuppressiva, sondern erst nach dem Beginn der Rituximab-Therapie.

Bei drei Patienten (Patient 2-4) dieser Studie war klinisch eine sensible Ataxie auffällig, nicht aber bei Patient 1. Dies kann in der Prädominanz von IgG3-Autoantikörpern, welche möglicherweise andere pathologische Veränderungen und folglich andere klinische Auswirkungen nach sich ziehen (siehe Kapitel 6.2), bei Patient 1 begründet sein. Allerdings war bei diesem auch durch den progredienten, schweren Verlauf mit einer intensivmedizinischen Behandlung der neurologische Status nur beschränkt beurteilbar und eine mögliche Ataxie somit eventuell nicht festzustellen. Eine sensible Ataxie war bei 100% der Patienten einer japanischen Kohorte mit Anti-Contactin-1-IgG4-Autoantikörpern nachweisbar (Miura et al, 2015), in einer anderen Studie aber nur bei einem von vier Patienten (Querol et al, 2013a). Auch nach Passiv-Transfer-Experimenten zeigten nur die mit IgG4-Antikörpern, nicht aber die mit IgG1-Antikörpern behandelte Lewis-Ratten eine Gangataxie (Manso et al, 2016). Als Ursache für die Ataxie wird sowohl eine Störung der nodalen Architektur an sensiblen Neuronen als auch eine Bindung an große Spinalganglienneurone, die Contactin-1 exprimieren, durch IgG4-Autoantikörper postuliert (Manso et al, 2016; Miura et al, 2015). Unterschiede in der Prävalenz, der klinischen Ausprägung und des Pathomechanismus werden dabei auf ein mögliches Vorliegen von Autoantikörpern gegen unterschiedliche Epitope zurückgeführt. In dieser Studie wurde das Bindungsverhalten von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern an Spinalganglienneurone nicht überprüft, ebenfalls waren Studien am Tiermodell nicht Teil dieser Arbeit. Das Erheben weiterer experimenteller Daten in zukünftigen Studien ist daher notwendig zum Verständnis der Ataxie bei Antikörper-positiven Patienten.

### 6.1.3 Infekttriggerung, fehlende zentrale Beteiligung und neuropathischer Schmerz als Charakteristikum der Anti-Caspr-assoziierten Nodo-Paranodopathie

Trotz eines unterschiedlichen Krankheitsverlaufes bei den Anti-Caspr-positiven Patienten (Patient 5 und 6, siehe Kapitel 6.2.1) weisen beide Patienten gemeinsame klinische Merkmale auf, die in das Konzept der Nodo-Paranodopathie passen:

Zum einen fiel die mögliche Triggerung der Erkrankung durch einen respiratorischen Infekt auf. Gängige Erreger respiratorischer Infektionen wie Influenzaviren, Parainfluenzaviren oder HI-Viren stehen über den Mechanismus der molekularen Mimikry von Gangliosidantigenen in Zusammenhang mit der Entwicklung eines GBS (Hayase & Tobita, 1997; Israeli et al, 2012; Jacobs et al, 1998; Yuki et al, 1993). Studien berichten, dass amerikanische Fabrikarbeiter nach einer akzidentellen Inhalation eines porzinen Hirngewebe-Aerosols eine akute inflammatorische Polyneuropathie entwickelten, parallel konnten bei diesen unter anderem Anti-Caspr2-Antikörper nachgewiesen werden (Lachance et al, 2010; Meeusen et al, 2012; Tracy & Dyck, 2011). Also kann die Exposition gegenüber Antigenen der Caspr-Proteinfamilie zu einer Produktion von Anti-Caspr2-Autoantikörpern führen. Die Entstehung von Anti-Caspr1-Autoantikörpern nach dem Mechanismus der molekularen Mimikry ist demnach ebenfalls denkbar. Die genauere Herstellung eines Zusammenhanges zwischen den Oberflächenproteinen und der Anti-Caspr-assoziierten Nodo-Paranodopathie ist bei einem fehlenden Erregernachweis bei den beiden Patienten und fehlender Information über die Expression von Proteinen mit einer molekularen Ähnlichkeit zu paranodalen Antigenen bei den Erregern allerdings nicht möglich.

Zum anderen zeigten beide Patienten in Gegensatz zu den Anti-Contactin-1-positiven Patienten klinisch keine zentralen Symptome wie Tremor. Auch experimentell zeigte sich immunhistochemisch keine Anfärbung von murinem zentralen Gewebe wie Kortex, Zerebellum oder Rückenmark sowie keine Anfärbung von

kultivierten hippocampalen Neuronen oder Motoneuronen durch die Anti-Caspr-Antikörper (Doppler et al, 2016). Ob die Ursache hierfür in einem ausbleibenden Transport der Antikörper über die Blut-Hirn-Schranke liegt, lässt sich retrospektiv nicht feststellen, da kein Liquor zur Testung auf Autoantikörper konserviert wurde. Bei den Patienten lag aber ebenfalls eine deutliche Schrankenstörung vor, daher ist es wahrscheinlicher, dass die Unterschiede im Expressionsmuster der Proteine im ZNS oder im Pathomechanismus begründet liegen. Analog dazu zeigen Contactin-1-Knockout-Mäuse im Knockout-Mouse-Modell eine schwerere zentrale Beteiligung als Caspr-Knockout-Mäuse; bei Letzteren sind zentrale Symptome eher auf eine gestörte zerebelläre Embryonalentwicklung als auf eine paranodale Störung zurückzuführen (Berglund et al, 1999; Bhat et al, 2001).

Des Weiteren ist als gemeinsames Charakteristikum der Anti-Caspr-assoziierten Nodo-Paranodopathie, im Gegensatz zur Anti-Contactin-1- und Anti-Neurofascin-155-assoziierten Nodo-Paranodopathie (Devaux et al, 2016; Doppler et al, 2015b; Miura et al, 2015), eine starke, multimodal sensible Beteiligung bereits zu Beginn der Erkrankung mit Dysästhesien, Kribbelparästhesien und vor allem neuropathischen Schmerzen auffällig. Experimentell zeigt sich eine Bindung der Anti-Caspr-Antikörper beider Patienten an kleine, nozizeptive Spinalganglienneurone (Doppler et al, 2016). Neuropathischer Schmerz wird ebenfalls als Charakteristikum Anti-Caspr2-assoziiierter Hyperexzitabilitätssyndrome beschrieben (Klein et al, 2012; Nagappa et al, 2017; Sharma & Sharma, 2013; Watanabe, 2013). In einem weiteren Fallbericht wird bei zwei pädiatrischen Patienten mit GBS und nachgewiesenen Anti-Caspr2-Antikörpern neuropathischer Schmerz als Charakteristikum festgestellt (Rosch et al, 2014). Auffälligerweise zeigen die oben erwähnten Arbeiter mit Anti-Caspr2-Antikörpern nach porziner Antigenexposition ebenfalls eine Prädominanz von sensiblen Symptomen und vor allem neuropathischen Schmerzen (Lachance et al, 2010; Meeusen et al, 2012; Tracy & Dyck, 2011). Die beiden Proteine Caspr und Caspr2 gehören der gleichen Familie an und unterscheiden sich hauptsächlich in der intrazellulären

Domäne (siehe Kapitel 3.2.3.1). Eine Assoziation der Autoantikörper zur Entwicklung von neuropathischen Schmerzen ist denkbar, der genaue Mechanismus allerdings noch unklar. Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Neuritis assoziiert mit neuropathischen Schmerzen konnten Alterationen von Natriumströmen an nozizeptiven Spinalganglienneuronen detektiert werden (Taha et al, 2017). Nodale Natriumkanäle werden durch den paranodalen axoglialen Komplex an einer Lateraldiffusion gehindert (siehe Kapitel 3.2.3.1). Eine nodale Architekturstörung sowie eine Störung der Distribution von Natriumkanälen der Spinalganglienneurone könnte somit zur Beeinträchtigung der Nozizeption führen. Auf eine eher funktionelle Beeinträchtigung durch Anti-Caspr-Antikörper deutet allerdings das schnelle Nachlassen der Symptome nach einer B-Zell-Depletion mit einer konsekutiven Entfernung der Anti-Caspr-Antikörper (Doppler et al, 2016) hin. Die neuropathischen Schmerzen bei einer fehlenden Schädigung kleiner Nervenfasern in der Hautbiopsie bei Patient 5 (Doppler et al, 2016) sprechen gegen die Entstehung der Schmerzen im Rahmen einer Small-Fiber-Neuropathie. Stattdessen stützen die Ergebnisse die Hypothese der direkten Schmerzentwicklung durch eine pathogene Wirkung der Anti-Caspr-Antikörper am Paranodium oder am Zellkörper der Spinalganglienneurone. Weitere Studien zur Untersuchung des exakten Pathomechanismus sind nötig.

Zusammenfassend ist auch die Anti-Caspr-positive Nodo-Paranodopathie durch einen charakteristischen Phänotyp mit einem allerdings unterschiedlichen Verlauf abhängig von der IgG-Subklasse (vergleiche Kapitel 6.2.2) gekennzeichnet. Es sind jedoch Studien mit größeren Fallzahlen zur Bestätigung dieser Hypothese nötig.

#### 6.1.4 Neurofascin-155 als weiteres Zielantigen bei Nodo-Paranodopathien mit axoglialen Autoantikörpern

In zahlreichen Studien wurden IgG-Autoantikörper gegen das paranodale Protein Neurofascin-155 mit einer Prädominanz der Subklasse IgG4 bei Patienten mit CIDP beschrieben (Cortese et al, 2016; Delmont et al, 2017; Devaux et al, 2016;

Kadoya et al, 2016; Kawamura et al, 2013; Koike et al, 2017; Mathey et al, 2017; Ng et al, 2012; Ogata et al, 2015; Querol et al, 2014). Die Prävalenz schwankte dabei zwischen 3,4% und 25% und lag im Durchschnitt bei 9,25% für IgG4-Autoantikörper (siehe Tabelle 8). Auch bei GBS-Patienten wurden bei 3-11% Neurofascin-155-IgG-Autoantikörper beschrieben (Kawamura et al, 2013; Ng et al, 2012; Ogata et al, 2015), allerdings wurden hier mit einer durchschnittlichen Prävalenz von 3,4% die IgG-Subklassen IgG1 und IgG3 nachgewiesen (siehe Tabelle 8). In dieser Studie konnten bei keiner Patientenkohorte Neurofascin-IgG-Autoantikörper detektiert werden. Ein methodologisches Versagen bezüglich der Detektionsmethoden ist unwahrscheinlich, da verschiedene Screeningverfahren verwendet wurden (ELISA, immunhistochemische Färbungen an murinen Zupfnervenpräparaten), diese durch Verwendung von Positivkontrollen validiert wurden und der ELISA mit den gleichen Neurofascin-Proteinen und einer ähnlichen Methodik wie in der Indexstudie mit einem erstmaligen positiven Antikörpernachweis (Ng et al, 2012) durchgeführt wurde. Denkbar wäre allenfalls ein Zerfall der Antikörper durch lange Kryokonservierung des Patientenmaterials, was angesichts des hochnachweisbaren Nachweises von Anti-Contactin-1-Antikörpern trotz langer Lagerung jedoch unwahrscheinlich ist. Unterschiede könnten daher eher in der Studienpopulation liegen, so wurden die höchsten Prävalenzen von 18-25% bei einer japanischen Kohorte detektiert (Kawamura et al, 2013; Ogata et al, 2015), die Prävalenzen in der kaukasischen Bevölkerung liegen meist unter 5% (Cortese et al, 2016; Ng et al, 2012; Querol et al, 2014). Die Kohorte von CIDP-Patienten mit einem GBS-artigen, subakuten Beginn, wie er auch für die Anti-Neurofascin-155-assoziierte Nodoparanodopathie typisch ist (Delmont et al, 2017; Querol et al, 2014), ist in dieser Studie mit n = 10 sehr klein. Zudem liegt das Erkrankungsalter von durchschnittlich 31 Jahren bei Patienten mit Anti-Neurofascin-155-Antikörpern (Devaux et al, 2016) deutlich unter dem Durchschnittsalter der CIDP-Patienten dieser Studie mit 61 Jahren; nur ein Patient dieser Studie war bei der Rekrutierung jünger als 20 Jahre. Zur Detektion Anti-Neurofascin-155-positiver Patienten wäre daher eine größere Fallzahl von Patienten mit dem typischen klinischen Phänotyp nötig gewesen.

### 6.1.5 Kein Nachweis von Autoantikörpern gegen axogliale (para)nodale Proteine bei Patienten mit MMN

Die multifokale motorische Neuropathie wurde ebenfalls als weiteres Beispiel einer Nodo-Paranodopathie vorgeschlagen (Uncini, 2012; Uncini et al, 2013), als pathogenetisch wirksames Agens wurden hier die Anti-GM1-Antikörper postuliert. Eine Studie aus dem Jahr 2014 berichtete außerdem von axoglialen Autoantikörpern gegen die nodalen Proteine Neurofascin-186 und Gliomedin bei bis zu 62% aller MMN-Patienten (Notturmo et al, 2014). Im Gegensatz dazu konnten in der aktuellen Studie weder paranodale noch in einer vorherigen Studie nodale Autoantikörper (Doppler et al, 2015a) in der MMN-Kohorte nachgewiesen werden. Die Diskrepanz könnte auf methodologischen Unterschieden beruhen: So wurde von Notturmo et al. nur eine Detektionsmethode mittels ELISA verwendet und kein weiteres Verfahren zur Bestätigung genutzt, zudem wurden nicht humane Proteine und Serumproben in sehr hohen Verdünnungen im ELISA verwendet, die Standardwerte wurden aus dem Mittelwert von wenigen gesunden Kontrollen gebildet und die optische Dichte zeigte insgesamt eine nur geringe Varianz. Außerdem sind in der Studie die Prozentangaben der Prävalenzen durch inakkurate Darstellung nicht objektiv nachvollziehbar. Die Ergebnisse dieser Studie decken sich hingegen mit denen einer aktuellen Studie, in der MMN-Patienten im Gegensatz zu CIDP-Patienten ebenfalls keine (para)nodalen Autoantikörper aufweisen (Mathey et al, 2017). Die Zuordnung der MMN zur Entität der Nodo-Paranodopathien ist beim fehlenden Nachweis von Antikörpern gegen axogliale (para)nodale Proteine und einem unzureichenden Pathogenitätsnachweis für Anti-Gangliosid-Antikörper (siehe Kapitel 3.1.3) also fraglich.

## 6.2 Die Rolle der IgG-Subklasse

Im Gegensatz zu weiteren Studien zu Anti-Contactin-1-Autoantikörpern, bei denen CIDP-Patienten hauptsächlich IgG4-Antikörper aufweisen (Mathey et al, 2017; Miura et al, 2015; Querol et al, 2013a) und schlecht auf eine Therapie mit IVIG ansprechen, zeigten hier zwei CIDP-Patienten (Patient 1 und 4), deren Material in der subakuten Phase der Erkrankung entnommen wurde, eine Prädominanz der Subklasse IgG3. Nach Anpassung der Titer an den Anti-Contactin-1-Gehalt ergaben sich bei Patient 1 sowohl hohe optische Dichten für IgG3 als auch für IgG4, bei Patient 2 und 3, welche in der chronischen Phase rekrutiert wurden, allerdings hauptsächlich für IgG4 (vergleiche Kapitel 5.4.3). Auch bei der Anti-Caspr-positiven GBS-Patientin (Patient 6) ließen sich in der akuten Krankheitsphase IgG3-Antikörper nachweisen, bei Patient 5 mit einem chronischen Verlauf hingegen IgG4-Antikörper. In der Akutphase der Erkrankung wird außerdem bei drei Patienten (Patient 1, 3 und 4) ein Therapieansprechen auf IVIG berichtet, nicht aber in der chronischen Phase. Diese Ergebnisse deuten auf eine entscheidende Rolle der IgG-Subklasse paranodaler Autoantikörper in Bezug auf den Krankheitsverlauf, die Pathophysiologie und das Therapieansprechen hin.

### 6.2.1 In Bezug auf die Chronifizierung der Erkrankung

Die Anti-Contactin-1-positiven CIDP-Patienten (Patient 1-4) und der Anti-Caspr-positive CIDP-Patient (Patient 5) präsentierten sich mit einem GBS-artigen Beginn mit Übergang in eine chronisch-progrediente Erkrankung mit einer schweren motorischen Beteiligung und einer histopathologisch evidenten axonalen Degeneration, wie es für eine Nodo-Paranodopathie mit Autoantikörpern gegen axogliale paranodale Proteine typisch ist (vergleiche Kapitel 6.1.1 und 6.1.2). Bei Patient 6 hingegen lag ein klassisches GBS mit einem monophasischen Verlauf ohne eine axonale Schädigung vor. Bei akuten inflammatorischen Nodo-Paranodopathien mit gegen paranodale Proteine gerichteten Antikörpern konnten in verschiedenen Studien Antikörper der IgG-Subklassen 1-3 nachgewiesen werden (Doppler et al, 2016; Miura et al, 2015; Ng et al, 2012; Ogata et al, 2015), bei

CIDP jedoch fast ausschließlich die Subklasse IgG4 (vergleiche Tabelle 8). Bei Anti-Gangliosid-Antikörper-assoziierten akuten inflammatorischen Neuropathien wie der Anti-GM1-assoziierten AMAN und dem Anti-GQ1B-assoziierten MFS lagen ebenfalls hauptsächlich die IgG-Subklassen 1 und 3 vor (Ilyas et al, 2001; Ogino et al, 1995; Willison & Veitch, 1994). Hier diente die Subklasse als Indikator für das Genesungspotential, dabei zeigten Patienten mit IgG3-Antikörpern eine bessere Remission als Patienten mit IgG1-Antikörpern (Jacobs et al, 2008; Koga et al, 2003). Der monophasische Verlauf bei IgG3-vermittelten Erkrankungen mit vollständiger Remission (Koga et al, 2003), analog zum Verlauf bei der Anti-Caspr-IgG3-positiven Patientin in dieser Studie (Patient 6), ließe sich durch die kurze Halbwertszeit von IgG3-Antikörpern erklären (siehe Kapitel 3.3.2) und zusätzlich durch einen unterschiedlichen Pathomechanismus je nach Subklasse (siehe 6.2.2). Bei mehreren autoimmunen chronisch-neurologischen Erkrankungen wie der Anti-MuSK-vermittelten Myasthenia gravis, der Anti-LG11- und Anti-Caspr2-vermittelten limbischen Encephalitis oder auch bei chronisch-sklerosierenden dermatologischen und nephrologischen Erkrankungen wurden IgG4-Autoantikörper nachgewiesen (Huijbers et al, 2015). Die IgG4-Antikörperklasse ist spezifisch und entsteht erst nach chronischem Antigenkontakt (vergleiche Kapitel 3.3.2), was dafür spricht, dass sie nicht am akuten Krankheitsgeschehen beteiligt ist. In dieser Studie wurden erstmalig hauptsächlich IgG3- parallel zu IgG4- Antikörpern in der akuten Phase einer im Verlauf chronischen Erkrankung nachgewiesen. Die Chronifizierung könnte somit durch einen Wechsel der Subklasse von IgG3- zu IgG4-Antikörpern hervorgerufen werden. Bei allergischen Erkrankungen verläuft der Wechsel von IgG1 zu IgG4 T-Zell- und Interleukin-10-abhängig und markiert den Übergang von einer IgE-vermittelten, akuten Reaktion in eine chronische Reaktion, dabei kommt es jedoch physiologisch zu einer Symptomreduktion durch eine direkte Interaktion und eine mögliche Blockierung der Allergene (Aalberse et al, 2009; Lucas, 1990; Vidarsson et al, 2014; Zen & Nakanuma, 2011). Bei IgG4-vermittelten Autoimmunerkrankungen könnte eben diese Blockierung körpereigener Proteine allerdings zum Pathomechanismus der Erkrankung beitragen (Huijbers et al, 2015). Ein Subklassenwechsel von IgG3 zu

IgG4 bei nephrologischen Erkrankungen wurde bereits beschrieben (Huang et al, 2013), auch bei MS kam es unter der Therapie mit Glatirameracetat mit einer Bildung von Autoantikörpern gegen Glatirameracetat zu einem Subklassenwechsel dieser Antikörper von IgG1 zu IgG4 (Basile et al, 2006). In umgekehrter Reihenfolge führte ein Subklassenwechsel von IgG4 zu IgG1 zur Remission bei der Anti-MuSK-positiven Myasthenia gravis (Plomp et al, 2012). Beim Anti-Gangliosid-Antikörper-assoziierten GBS wurde bisher nur von einem Klassenwechsel von IgM zu IgG berichtet (Kuwahara et al, 2017a). Der klinische Verlauf der Nodoparanodopathie könnte initial IgG3-vermittelt sein und den GBS-artigen Beginn bedingen. Nach längerer Antigenexposition könnte analog zu den allergischen Reaktionen ein Subklassenwechsel zu IgG4 stattfinden, dies würde die initiale Symptombesserung bei Verschwinden der IgG3-Antikörper mit einem folgenden Übergang in eine langsam progrediente Erkrankung unter der Anwesenheit von IgG4-Antikörpern erklären, welche möglicherweise eine direkte Störung des axoglialen Komplexes mit einer sekundären axonalen Degeneration verursachen (siehe Kapitel 6.2.2). Leider standen die beiden CIDP-Patienten mit IgG3-Antikörpern in dieser Studie jeweils aufgrund der Entwicklung einer Demenz beziehungsweise des Todes nicht für Follow-Up-Untersuchungen zur Verfügung. Bei den Patienten mit ausschließlich IgG4-Antikörpern ist retrospektiv keine Aussage über die Subklassenzusammensetzung zum Zeitpunkt der Erstmanifestation möglich. Zusammenfassend führen die IgG3-Antikörper wahrscheinlich zu einem akuten, die IgG4-Antikörper hingegen zu einem chronischen Verlauf der Nodoparanodopathie. Eine Chronifizierung durch einen Antikörpersubklassenwechsel ist denkbar, jedoch sind größere, longitudinale Studien zur Überprüfung dieser Hypothese nötig.

## 6.2.2 In Bezug auf die Pathophysiologie: erhöhte Komplementbindung bei Prädominanz der IgG-Subklassen 1-3

Bei den IgG3-vermittelten Nodoparaneuropathien liegt möglicherweise ein grundlegend unterschiedlicher Pathomechanismus als bei den IgG4-vermittelten, chronisch verlaufenden Nodoparaneuropathien vor. Die IgG3-Subklasse ist von allen IgG-Subklassen am stärksten zur Komplementbindung und -aktivierung fähig, im Gegensatz zu IgG4-Antikörpern, die kein Komplement binden (siehe Kapitel 3.3.2). Passend dazu zeigte sich bei den Anti-Contactin-1-positiven Patienten nach einer Anpassung der Proben an den Anti-Contactin-1-Gehalt die stärkste Komplementbindung- und -aktivierung bei Patient 1 mit einem hohen Anteil von IgG3-Antikörpern (siehe Kapitel 5.4.5). Bei Patient 2 und 3 mit einer Prädominanz von Anti-Contactin-1-IgG4-Autoantikörpern lag auch eine Komplementbindung und -aktivierung vor, allerdings in kleinerer Menge. Der Literatur zufolge weisen Patienten mit ausschließlich Anti-Contactin-1-IgG4-Antikörpern keine Komplementbindung und -aktivierung auf (Miura et al, 2015), in dieser Studie lag bei dem ausschließlich Anti-Caspr-IgG4-positiven Patienten (Patient 5) ebenfalls keine Komplementbindung vor. Die Ergebnisse differieren hier zwischen Patient 2 und 3 und Patient 5 *in vitro* aufgrund der Koexistenz der Subklassen IgG1-3 im chronischen Erkrankungsstadium bei Patient 2 und 3, nicht aber bei Patient 5. Auch bei Anti-MuSK-IgG4-positiven Patienten mit Myasthenia gravis wurde eine Komplementablagerung bei einer Koexistenz der IgG-Subklasse 1 beschrieben (Leite et al, 2008). Die Anti-Contactin-1-Antikörper der Subklasse IgG1-3 liegen prozentual im Vergleich zu der dominanten Subklasse IgG4 bei den Patienten im chronischen Erkrankungsstadium nur in einer kleinen Menge vor (32-44% des Gesamt-IgG-Gehalts), ob sie *in vivo* einen Anteil an der Pathophysiologie haben bleibt daher unklar. Bei den Anti-Caspr-positiven Patienten kam es nur bei der GBS-Patientin mit IgG3-Autoantikörpern zur Komplementbindung (siehe Kapitel 5.5.4). Beim Anti-Gangliosid-Antikörper-vermittelten GBS und MFS mit IgG1- und IgG3-Autoantikörpern wird pathophysiologisch ein komplementabhängiger Prozess angenommen; die Komplementablagerung an

den Schnürringen führt hierbei neben der Auslösung einer lokalen Entzündungsreaktion zu einer nodalen Architekturstörung mit einer Reduktion von nodalen Natrium- und Kaliumströmen sowie einer Dispersion und einem Verlust der paranodalen Proteine Caspr und Neurofascin-155 (Hafer-Macko et al, 1996; McGonigal et al, 2010; Susuki et al, 2007b). Ähnliche histologische Veränderungen konnten in dieser Studie ebenfalls bei einem Anti-Contactin-IgG3-positiven Patienten (Patient 4) festgestellt werden, allerdings auch bei den Anti-Contactin-IgG4- und Anti-Caspr-IgG4-positiven Patienten. Bei den IgG4-vermittelten Erkrankungen wäre eine nodale Architekturstörung durch einen Konnektivitätsverlust axogliale Proteine bei einer funktionellen Inhibierung durch die IgG4-Antikörper denkbar (Huijbers et al, 2015; Labasque et al, 2014). Dazu passt der elektronenmikroskopische Nachweis der Lösung terminaler Myelinschleifen vom Axon (Koike et al, 2017). In der klinischen Dokumentation wird histologisch in dieser Studie bei Patient 2, 3 und 5 mit IgG4-Autoantikörpern ein aktiver Axonverlust mit einer starken Entzündungsreaktion und einer T-Zell-Infiltration ohne Regenerationszeichen beschrieben. Bei Patient 4 mit IgG3-Autoantikörpern ist allerdings histopathologisch eine Regeneration nachweisbar. Ein verblindeter, quantifizierender Vergleich mit zeitgleicher Färbung unter Verwendung einheitlicher Methodik wurde jedoch nicht durchgeführt. Bei IgG4-vermittelten Autoimmunerkrankungen stehen T-Zell-vermittelte Entzündungsprozesse im Vordergrund (Zen & Nakanuma, 2011). Diese könnten, zusätzlich zur Lösung der axoglialen Bindung, die aktive sekundäre axonale Degeneration bedingen. Die Makrophagenaktivität hingegen scheint bei der IgG4-vermittelten Erkrankung keine Rolle zu spielen (Koike et al, 2017). Zusammenfassend zeigt sich die Komplementbindung und -aktivierung proportional zum Anteil der IgG-Subklassen 1-3. Es kann also bei IgG3-assoziierten Nodoparanodopathien ein komplementvermittelter Pathomechanismus angenommen werden, bei IgG4-assoziierten Nodoparanodopathien hingegen ein durch die direkte Interaktion der Antikörper und sekundär eventuell T-Zell-vermittelter Pathomechanismus.

### 6.2.3 In Bezug auf das Therapieansprechen auf IVIG

Das initiale Ansprechen auf eine Therapie mit IVIG bei drei CIDP-Patienten (Patient 1, 3 und 4) begründet sich möglicherweise auf einen komplementvermittelten Pathomechanismus bei einer Prädominanz der Subklasse IgG3, das Therapieversagen auf einen komplementunabhängigen Pathomechanismus bei einer Prädominanz der Subklasse IgG4.

Die Wirkmechanismen von IVIG sind in Kapitel 3.1.6.2.2 erläutert. Bei akuten inflammatorischen Neuropathien, vor allem bei der axonalen Variante des GBS oder bei dem mit Anti-Gangliosid-Antikörpern assoziierten GBS wird hauptsächlich ein komplementvermittelter Mechanismus angenommen (Basta et al, 1996; Hafer-Macko et al, 1996; McGonigal et al, 2010). Beim Anti-GQ1b-positiven GBS/MFS zeigte sich eine Reduktion der Komplementablagerung durch IVIG, als Grund wird sowohl die primäre Inhibition der Antikörperbindung (Jacobs et al, 2003) als auch ein Fc-Fragment-vermittelter Mechanismus mit einer direkten Inhibition der Komplementbindung (Sudo et al, 2014) diskutiert. In dieser Studie hatte IVIG *in vitro* keinen Einfluss auf die Antikörperbindung der Anti-Contactin-1-Antikörper an das Antigen (vergleiche Kapitel 5.4.6.1); ein rein antiidiotypischer Effekt von IVIG ist also unwahrscheinlich. Die Komplementbindungsversuche zeigten aber eine Reduktion der C1q-Bindung an die Anti-Contactin-1-Antikörper bei einer Zugabe von IVIG. Bei einer Inkubation zusammen mit dem Komplementfaktor C1q zeigte sich dabei ein stärkerer Effekt als bei der Zugabe von IVIG nach der C1q-Inkubation (vergleiche Kapitel 5.4.6.2). Eine mögliche Erklärung dafür ist die direkte Interaktion und Neutralisierung des Komplementfaktors mit den humanen Immunglobulinen *in vitro* vor der Bindung an die Anti-Contactin-1-Antikörper. Jedoch ist auch eine Blockierung der Komplementbindungsstelle des Anti-Contactin-1-Antikörpers sowie eine geringfügige Verdrängung des bereits gebundenen Komplementfaktors plausibel. Eine Modulation der autoantikörpervermittelten Komplementreaktionen *in vitro* lässt sich allerdings sicher nachweisen; eine methodisch bedingte Fehlinterpretation durch etwa eine reine Blockade der Bindungsstelle des C1q-spezifischen Sekundärantikörpers durch IVIG ist

nicht wahrscheinlich, da sich auch im Komplementaktivierungsversuch bei der Verwendung eines unterschiedlichen Sekundärantikörpers eine Reduktion der Komplementaktivierung zeigte. Der Nachweis von aktiviertem Komplement war *in vitro* nur bei Patient 1 möglich, welcher eine deutlich stärkere Komplementbindung bei Prädominanz der Subklasse IgG3 zeigte, nicht jedoch bei Patient 2 und 3 (vergleiche Kapitel 5.4.5). Dies ist am ehesten durch die geringe Empfindlichkeit der Detektion in diesem Versuch erklärbar. Wahrscheinlich ist die *in-vitro*-Umsetzung des humanen Komplements in die nachweisbaren Abbauprodukte gering, besonders, da es nicht an Zellen gebunden ist (vergleiche Kapitel 3.4.2). Deswegen war auch eine hohe Verdünnung des humanen Komplements (1:10) nötig. Des Weiteren bieten die multiplen Komplementfaktoren bei einer Verwendung des humanen Komplements ein höheres Interaktionspotential mit IVIG als im Komplementbindungsversuch bei einer reinen Verwendung von C1q, was den Effekt im Vergleich mindert.

Den chronisch inflammatorischen Neuropathien wie der klassischen CIDP und insbesondere der Anti-Gangliosid-Antikörper-vermittelten Variante der MMN liegt ebenfalls ein komplementvermittelter Pathomechanismus zugrunde (Quast et al, 2016; Vlam et al, 2015), was möglicherweise das generell gute Therapieansprechen auf IVIG mit einem Therapieversagen bei nur 9,3% aller CIDP-Patienten erklärt (Dalakas, 2004; Querol et al, 2013b). Experimentell konnte eine Reduktion der Komplementbindung und -aktivierung durch IVIG bei Anti-GM1-positiver MMN gezeigt werden (Piepers et al, 2010; Sudo et al, 2014; Yuki et al, 2011). Ein antiidiotypischer, neutralisierender Effekt von IVIG auf Anti-GM1-Antikörper, wie er initial vorgeschlagen wurde (Yuki & Miyagi, 1996), konnte in weiteren Studien als dem komplementvermittelten Effekt von IVIG untergeordnet eingestuft werden (Peng, 2012; Yuki et al, 2011). Im chronischen Stadium der Nodo-Paranodopathie mit Prädominanz von IgG4-Autoantikörpern zeigte Patient 2 ein schlechtes Therapieansprechen auf IVIG, ebenso wurde dieses bei weiteren IgG4-vermittelten, chronischen Nodo-Paranodopathien beschrieben (Devaux et

al, 2016; Miura et al, 2015; Querol et al, 2014; Querol et al, 2013a). In einer Subgruppe von Patienten mit einem schlechten Ansprechen auf IVIG konnten beispielsweise bei 25% der Patienten Anti-Neurofascin-155-Autoantikörper nachgewiesen werden (Querol et al, 2014). Ein wahrscheinlicher Grund dieses Therapieversagens ist demnach der komplementunabhängige Pathomechanismus (siehe 6.1.1 und 6.2.2). Zusammenfassend beeinflusst IVIG die Komplementbindung und -aktivierung bei der Anti-Contactin-1-positiven Nodo-Paranodopathie sowohl konzentrationsabhängig, als auch abhängig von der Menge der IgG-Subklassen 1-3. Als Wirkmechanismus ist eine Bindung an das Fc-Fragment und eine Inhibierung der Komplementbindung, eine Verdrängung des gebundenen Komplements oder eine Inhibierung im Downstream der Komplementkaskade möglich. Eine Therapie mit IVIG ist also möglicherweise bei Vorliegen der Subklasse IgG3 erfolgsversprechend, nicht aber beim Vorliegen der Subklasse IgG4; hier kommen antikörperdepletierende Therapien in Frage (siehe Kapitel 6.4.3). Die dominante IgG-Subklasse wäre somit ein Prädiktor für das Therapieansprechen bei der Nodo-Paranodopathie mit Antikörpern gegen paranodale Proteine. Größere, prospektive Studien vor allem in Bezug auf die seltenere Subklasse IgG3 sind allerdings zur Verifikation dieser Hypothese nötig.

### 6.3 Nierenbeteiligung bei Nodo-Paranodopathien mit Antikörpern gegen Contactin-1 und Neurofascin-155

Der Auslöser einer Immunreaktion mit einer Bildung von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern ist unklar. Eine infektgetriggerte Immunantwort, wie sie möglicherweise bei der Anti-Caspr- (siehe Kapitel 6.1.3) und bei der Anti-Gangliosid-Antikörper-assoziierten Nodo-Paranodopathie (Caporale et al, 2006; Yuki et al, 1993) vorliegt, konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurde bei Patient 2 zum Zeitpunkt der Erstmanifestation eine membranöse Glomerulonephritis beschrieben. Die Pathophysiologie dieser Erkrankung beruht auf der Ablagerung von Immunkomplexen, bestehend aus gegen Podozytenproteine gerichteten Antikörpern und Antigenen, an der Außenseite der glomerulären Basalmembran (Austin et al, 1992; Mellors et al, 1957). Eine Nierenbeteiligung wurde

in der Literatur in Assoziation mit der CIDP (Kohli et al, 1992; Olbricht et al, 1993; Witte & Burke, 1987) und dem GBS (Behan et al, 1973; Emsley & Molloy, 2002; Murphy et al, 1986; Nicholson et al, 1989) beschrieben. Dabei fielen in der Nierenbiopsie bei der CIDP eine fokal-segmentale Glomerulosklerose (Olbricht et al, 1993; Quek et al, 2014), beim typischen GBS vor allem Immunkomplex- und Komplementablagerungen (Behan et al, 1973; Talamo & Borochoviz, 1982) auf. Bei einer von Quek et al. beschriebenen Patientin mit einer akut beginnenden Neuropathie mit Nierenbeteiligung (Quek et al, 2014) konnten in einer weiteren Studie Neurofascin-140, -186 und -155-IgG-Antikörper der Subklassen IgG3 > IgG4 nachgewiesen werden (Delmont et al, 2017). Diese Patientin zeigte einen GBS-artigen Beginn passend zu einer Nodoparanodopathie. Bei Patient 2 lagen leider keine Informationen über den Befund der Nierenbiopsie vor, es kam aber zu einer Remission der nephrologischen Erkrankung ohne die Entwicklung einer chronischen Glomerulosklerose. In der chronischen Phase waren dann bei diesem Patienten hauptsächlich Anti-Contactin-1-IgG4-Antikörper im Serum nachweisbar, die keine Bindung an histologische Schnitte murinen Nierengewebes zeigten (Doppler et al, 2015b). Die Assoziation von IgG3-Antikörpern mit einer akuten Nephropathie bei Nodoparanopathien (Delmont et al, 2017) sowie das Ausbleiben einer Chronifizierung der Nierenerkrankung unter der Anwesenheit von IgG4-Antikörpern unterstützen die Hypothese eines Subklassenwechsels von IgG3 zu IgG4 bei Nodoparanopathien (siehe Kapitel 6.2.1). Dieser ist unabhängig für die membranöse Glomerulonephritis beschrieben (Huang et al, 2013). Ob im akuten Stadium der Nephropathie eine direkte Interaktion der Antikörper am Glomerulum und den Podozyten, die sowohl Contactin-1 als auch Neurofascin exprimieren (Reid et al, 1994; Sistani et al, 2013), ein komplementvermittelter oder ein sekundär immunkomplexvermittelter Mechanismus zur Pathologie beitragen, lässt sich retrospektiv, ohne eine Kenntnis über den Biopsiebefund von Patient 2, nicht untersuchen. Es fehlen daher Studien mit höherer Fallzahl und einem prospektiven Ansatz.

## 6.4 Klinische Bedeutung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Studie haben eine direkte Bedeutung für das diagnostische und therapeutische Prozedere bei Patienten mit GBS und CIDP. Ein Screening auf Autoantikörper gegen paranodale Proteine sollte bei Patienten mit GBS und mit CIDP, die einen für eine Nodo-Paranodopathie typischen Phänotyp aufweisen, durchgeführt werden. Im Folgenden wird die dazu geeignete Methodik evaluiert und diese Forderung begründet.

### 6.4.1 Evaluation der Screeningmethoden zur Detektion paranodaler axogliale Autoantikörper bei inflammatorischen Polyneuropathien

Als Screeningmethoden wurden in dieser Studie ELISAs, immunhistochemische Färbungen an murinen Zupfnervenpräparaten sowie Einzelfärbungen an transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt. Die Eignung dieser Methoden für den Nachweis paranodaler Autoantikörper konnte in mehreren Studien bestätigt werden (Kadoya et al, 2016; Ng et al, 2012; Querol et al, 2014; Querol et al, 2013a). Anti-Contactin-1-IgG-Antikörper konnten im ELISA bei Patient 1-4, in den immunhistochemischen Färbungen aber nur bei Patient 1-3 nachgewiesen werden. Patient 4 wies einen niedrigen Anti-Contactin-1-Titer auf. Der ELISA ist somit empfindlicher als das immunhistochemische Screening. Ein weiterer Vorteil des ELISAs ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Testung mehrerer Patientenproben auf ein spezifisches Antigen sowie der geringe methodische Aufwand. ELISAs werden auch in anderen Studien als Screeningmethode vorgeschlagen (Kadoya et al, 2016). Allerdings fehlen bisher Standardreihen, außerdem kommt es bei der Etablierung von ELISAs für alle paranodalen Proteine zu methodologischen Limitationen; beispielsweise ist humanes Caspr-Protein zur Beschichtung kommerziell nicht verfügbar. Ein Nachteil der immunhistochemischen Methode hingegen ist die Notwendigkeit der Fixierung, wodurch die Detektionsrate von humanen Autoantikörpern durch Maskierung von Epitopen reduziert werden könnte (Shi et al, 2001; Stradleigh & Ishida, 2015). Auch die Verwendung murinen Materials

könnte das Bindungsverhalten der Antikörper beeinflussen. Zwar weisen die Bestandteile des paranodalen Komplexes Contactin-1/Caspr/Neurofascin-155 bei Nagetieren und beim Menschen zu über 90% identische Aminosäuresequenzen auf (Menegoz et al, 1997; Peles et al, 1997), in mehreren Studien zu paranodalen Autoantikörpern wurden jedoch im ELISA Differenzen in der Detektionsrate bei einer Verwendung von murinen oder humanen Proteinen berichtet (Cortese et al, 2016; Miura et al, 2015). Ein Vorteil der Immunhistochemie liegt allerdings in der Möglichkeit der direkten Visualisierung der Antikörper-Antigenbindung am Schnürring und der Möglichkeit des Screenings auf mehrere nodale und paranodale Proteine gleichzeitig. Wie in Kapitel 4.6.3.1 und 4.6.3.2 beschrieben wurden initial auch Einzelfärbungen an transfizierten HEK-293-Zellen als Screeningmethode durchgeführt. Aufgrund einer durch eine hohe, unspezifische Hintergrundfärbung erschwerten Auswertung sowie eines hohen methodologischen Aufwandes wurde die Einzelfärbungen als Screeningmethode bereits im Verlauf der Arbeit verworfen und stattdessen Doppelfärbungen an transfizierten HEK-293-Zellen als Bestätigungsmethode verwendet (siehe Kapitel 4.6.3.1). Die Doppelfärbung erlaubt einen eindeutigen Nachweis, allerdings eignet sie sich ebenfalls wegen des hohen Zeit- und Kostenaufwandes bei einem hohen Materialverbrauch von Kontrollantikörpern sowie einer nötigen Expertise in der Durchführung und Auswertung nicht als Routine-Screeningverfahren. Als Material wurden in dieser Studie sowohl Serum als auch PE-Material verwendet. Der Gesamt-IgG-Gehalt ist im PE-Material insgesamt niedriger als im Serum, dementsprechend ist auch der Anti-Contactin-1-Titer bei den Patienten im PE-Material niedriger (siehe Kapitel 5.2 und 5.4.3). Zum Nachweis der Antikörper eignen sich beide Materialien, zum direkten, interindividuellen Vergleich oder zur intraindividuellen Verlaufsbeurteilung sollte allerdings einheitliches Material verwendet werden. ELISA und Bindungsversuche an Zupfnervenpräparaten können und sollten zusammenfassend parallel entweder mit Serum oder PE-Material als Screeningmethode bei Patienten mit GBS und CIDP mit Verdacht auf eine Nodo-Paranodopathie durchgeführt werden. Eine Entwicklung von standardisierten, ELISA-basierten Verfahren wäre für einen multizentrischen Vergleich wünschenswert.

## 6.4.2 Etablierung neuer diagnostischer Kriterien für Nodo-Paranodopathien

Wie in Kapitel 6.1.1 und 6.2.2 erläutert ist die Nodo-Paranodopathie eine neue Entität, die sich aufgrund des charakteristischen Pathomechanismus nicht in die klassischen, elektrophysiologischen Konzepte einer axonalen oder demyelinisierenden Neuropathie (Hadden et al, 1998) einordnen lässt (Fehmi et al, 2017; Uncini & Kuwabara, 2012). In dieser Studie wurden drei der fünf chronisch erkrankten Patienten initial als klassische AIDP diagnostiziert, entwickelten im Verlauf jedoch eine chronische Erkrankung mit axonaler Schädigung. Ein frühzeitiges Screening auf nodale oder paranodale Autoantikörper in Kombination mit einer histologischen Diagnostik und gegebenenfalls mit einer Anwendung von modifizierten elektrophysiologischen Kriterien für GBS-Unterformen (Rajabally et al, 2015) könnten helfen, Fehldiagnosen zu vermeiden und schneller eine adäquate Therapie einzuleiten (siehe Kapitel 6.4.3). Es sollten daher neue diagnostische Kriterien für Nodo-Paranodopathien etabliert werden. Dazu sind allerdings weitere Studien nötig.

## 6.4.3 Implikationen eines Autoantikörperscreenings auf eine Off-Label-Therapie mit Rituximab und einen Therapieversuch mit IVIG

Rituximab wird bei der CIDP generell nur vereinzelt und probatorisch als Off-Label-Therapie verabreicht (siehe Kapitel 3.1.6.3). Bei drei Patienten dieser Studie wurde bei einem konkreten Verdacht auf eine autoantikörpervermittelte Erkrankung eine Rituximabtherapie durchgeführt und evaluiert. Bei Patient 2 zeigten sich darunter Nebenwirkungen, die zum Therapieabbruch führten. Eine langfristige Evaluation des Therapieansprechens ist daher - zusätzlich zu einem erschwerenden Assessment bei unregelmäßigen Follow-Up-Untersuchungen - nicht möglich. Auffällig ist außerdem, dass bereits vor der Rituximab-Therapie im Serum und PE-Material des Patienten keine Autoantikörper mehr nachweisbar waren. Ein B-Zell-Anteil im peripheren Blut von nur 3% bei Patient 2 kann die Ursa-

che des negativen Nachweises von Autoantikörpern sein; die Ursache dieser Reduktion ist unklar. Der B-Zell-Anteil im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Abnahme des PE-Materials mit einem Anti-Contactin-1-Titer von 1:2000 wurde nicht bestimmt, daher fehlt ein Vergleichswert. Eine weitere Ursache für das Verschwinden der Autoantikörper könnte in dem klinisch eher schubförmig beschriebenen Verlauf bei Patient 2 im Vergleich zu einem kontinuierlich chronisch progredienten Verlauf bei den anderen Patienten (Patient 3 und 5) liegen. Möglicherweise wurden bei Patient 2 nicht dauerhaft Autoantikörper produziert, daher waren diese zum Zeitpunkt der Follow-Up-Untersuchung nicht nachweisbar.

Bei den konsequent mit Rituximab behandelten Patienten dieser Studie (Patient 3 und 5) zeigte sich bei Patient 3 eine zeitweise Titerreduktion der Anti-Contactin-1-Autoantikörper von 1:10.000 auf 1:500, bei Patient 5 ein vollständiges Verschwinden der Anti-Caspr-Autoantikörper. Der Unterschied ist wohlmöglich auf den erhöhten Anteil von B-Zellen im peripheren Blut (26% vor Therapiebeginn, Normwert < 25%) bei Patient 3 mit einem nur teilweisen Therapieansprechen und einer Reduktion des B-Zell-Anteils zeitweise auf 3% zurückzuführen. Bei Patient 5 hingegen lag der B-Zell-Anteil vor der Therapie mit 14% im Normbereich und konnte unter der Therapie auf nicht nachweisbare Werte reduziert werden. Der Wiederanstieg des Titers bei Patient 3 vor Gabe des letzten Erhaltungszyklus könnte eine Verkürzung der Therapieintervalle bei einer nicht suffizienten B-Zell-Depletion implementieren, aber auch eine schwankende Produktion der Autoantikörper wäre denkbar. Bei der Anti-Musk-IgG4-positiven Myasthenia gravis korreliert die Antikörperlast mit der klinischen Besserung (Diaz-Manera et al, 2012). Auch bei den Patienten dieser Studie kam es parallel zum Absinken des Antikörpertiters zu einer deutlichen klinischen und elektrophysiologischen Befundbesserung (siehe Kapitel 5.4.4 und 5.6.4). Die Persistenz der Autoantikörper bei Patient 3, wenn auch in geringerer Menge, könnte die nur mäßige motorische Besserung mit einer Besserung des MRC-Summscores um nur 1-4 Punkte bei Patient 3 im Vergleich zur starken Rekonvaleszenz bei Patient 5 (Anstieg des MRC-Sum-

menscores von 44 auf 54 Punkte) erklären. Die prolongierte Erholung der motorischen Symptome bei beiden Patienten lässt sich außerdem auf die bereits stattgehabte axonale Schädigung zurückführen. Die sensiblen Symptome waren hingegen bei beiden Patienten parallel zur Antikörperreduktion beziehungsweise -entfernung stark rückläufig, der neuropathische Schmerz bei Patient 5 verschwand bereits kurz nach Therapiebeginn. Dies führte zu einer starken funktionellen Verbesserung und zu einem deutlichen Anstieg der Lebensqualität beider Patienten. Auch andere Studien sprechen für eine hohe Wirksamkeit von Rituximab bei IgG4-Autoantikörper-vermittelten Nodo-Paranodopathien (Delmont et al, 2017; Querol et al, 2015). Rituximab scheint allgemein besonders erfolgreich bei IgG4-vermittelten Erkrankungen zu wirken (siehe Kapitel 3.1.6.3); die Ursache ist allerdings bisher unklar. Eine rechtzeitige Detektion der paranodalen Autoantikörper mit einer Subklassenbestimmung ist daher wichtig und besonders in frühen Stadien der Erkrankung essentiell, um gegebenenfalls zeitnah eine Rituximab-Therapie einleiten zu können und so eine schwere sekundäre axonale Schädigung nach der initialen Leitungsstörung zu verhindern.

In der akuten Phase ist die Differenzierung zwischen einem GBS und einer CIDP mit einem GBS-artigen Beginn nicht zweifelsfrei möglich (Ruts et al, 2010), daher ist es sinnvoll, alle GBS-Patienten einem Screening zu unterziehen. Bei den CIDP-Patienten ist die Prävalenz von Autoantikörpern gegen paranodale axogliale Strukturen in der Gesamtkohorte gering und korreliert zusätzlich mit einem typischen klinischen Phänotyp. Es wäre daher ein Screening zu erwägen, wenn Charakteristika wie ein GBS-artiger Beginn, eine Ataxie, ein Tremor, eine schwere axonale Schädigung, eine schwere klinische Beeinträchtigung, ein schlechtes Ansprechen auf IVIG, ein junges Erkrankungsalter oder neuropathische Schmerzen vorliegen. Dieses Vorgehen wird ebenfalls von anderen Autoren empfohlen (Dalakas & Gooch, 2016). Zudem kann über die Bestimmung der Subklasse das therapeutische Prozedere abgewogen werden: Beim Vorliegen von IgG3-Antikörpern wäre unter der Annahme eines komplementvermittelten Mechanismus (siehe Kapitel 6.2.2 und 6.2.3) eine initiale Therapie mit IVIG sinnvoll,

in der chronischen Phase beim Vorliegen von IgG4-Antikörpern ist wohlmöglich eine PE-Therapie einer Therapie mit IVIG vorzuziehen und bei fehlenden Kontraindikationen nach Abwägung eine Rituximab-Therapie einzuleiten. Ein adäquates Monitoring zum frühzeitigen Erkennen therapieinduzierter Nebenwirkungen und regelmäßige Follow-Up-Untersuchungen sind allerdings essentiell. Ebenso sind größere, prospektive und randomisiert-kontrollierte Studien zur Evaluation der Wirksamkeit von Rituximab bei Nodoparanodopathien nötig. Auch weitere, neue Vertreter der B-Zell-zielgerichteten Immuntherapie wie Ocrelizumab oder Ofatumumab (van Meerten & Hagenbeek, 2010) wären mögliche, zu evaluierende Therapieoptionen bei der IgG4-assoziierten Nodoparanodopathie.

## 6.5 Ausblick

Das Gebiet der Nodoparanodopathien mit Autoantikörpern gegen nodale und paranodale axogliale Proteine ist ein neues Konzept in der Klassifikation der axonalen oder demyelinisierenden inflammatorischen Neuropathie. Die Anti-Neurofascin-155-IgG4-positive Nodoparanodopathie wurde als erste Unterform dieser Entität (Devaux et al, 2012; Ng et al, 2012; Pruss et al, 2011) beschrieben und bisher am häufigsten, auch bereits im Rahmen einer multizentrischen Studie, histopathologisch und klinisch charakterisiert (Cortese et al, 2016; Delmont et al, 2017; Devaux, 2012; Devaux et al, 2016; Itaya et al, 2016; Kadoya et al, 2016; Kawamura et al, 2013; Koike et al, 2017; Mathey et al, 2017; Ng et al, 2012; Ogata et al, 2015; Querol et al, 2014; Vallat et al, 2017). Hinweise auf die Pathogenität liefern Studien am Tiermodell der experimentellen autoimmunen Neuritis, in denen eine klinische Verschlechterung (Ng et al, 2012; Yan et al, 2014) und zusätzlich eine elektrophysiologische Leitungsstörung sowie Anti-Neurofascin-155-Ablagerungen an den Schnürringen nach Antikörperinjektion beobachtet wurden (Ng et al, 2012; Yan et al, 2014). Bei der Anti-Contactin-1-positiven Neuropathie wurden bisher von anderen Gruppen nur Studien mit einer Prädominanz von IgG4-Antikörpern veröffentlicht (Devaux et al, 2016; Koike et al, 2017; Labasque et al, 2014; Miura et al, 2015; Querol et al, 2013a). Es zeigen sich hier nicht nur Unterschiede in der Beschreibung des klinischen Phänotypes bezüglich

der sensiblen Ataxie, des Tremors und des Therapieansprechens, sondern vor allem Unterschiede in der Subklassenzusammensetzung und im Komplementbindungsverhalten durch Anti-Contactin-1-Autoantikörper. Unklar ist außerdem die Assoziation der Anti-Contactin-1-positiven Nodo-Paranodopathie mit autoimmunen Nierenerkrankungen. Des Weiteren existiert bisher nur eine Studie am Tiermodell, bei der eine klinische Verschlechterung, eine nodale Architekturstörung und eine Leitungsstörung nach IgG4-Antikörperinjektion beschrieben wurde (Manso et al, 2016). Die Leitungsstörung wurde auf eine funktionelle Störung am axoglialen paranodalen Komplex durch die Antikörper zurückgeführt (Labasque et al, 2014). Sowohl zur weiteren klinischen Charakterisierung als auch besonders zum Verständnis des Pathomechanismus und dessen Abhängigkeit von der IgG-Subklasse sind weitere klinische und experimentelle Daten nötig. Anti-Caspr-Autoantikörper wurden in dieser Studie erstmals isoliert nachgewiesen und mit einem klinischen Phänotyp assoziiert, zuvor wurden nur Contactin-1/Caspr-Komplexantikörper bei einem Patienten mit CIDP nachgewiesen (Querol et al, 2013a). Kürzlich erfolgte auch in einer anderen Studie die Detektion von Anti-Caspr-Autoantikörpern bei 1% (2 von 246) aller untersuchten CIDP-Patienten, allerdings ohne die Angabe klinischer Daten (Delmont et al, 2017). Angesichts der geringen Fallzahlen sind hier größere Studien zum Screening auf Anti-Caspr-Autoantikörper bei Patienten mit inflammatorischen Neuropathien nötig. Auch Studien zum Screening nach weiteren nodalen, paranodalen und juxtapanodalen Proteinen wie Neurofascin-140, Neurofascin-186, Gliomedin, Connexin-32, Caspr2 oder Contactin-2 sind sinnvoll, da über die Prävalenzen dieser Autoantikörper bei inflammatorischen Neuropathien bisher wenig bekannt ist (vergleiche Tabelle 8). Multizentrische, prospektive Studien mit einer größeren Fallzahl könnten außerdem einen möglichen Subklassenwechsel im Krankheitsverlauf beurteilen sowie das Therapieansprechen bei der Nodo-Paranodopathie abhängig von der Subklasse evaluieren und sind somit zum besseren Verständnis dieser neuen Krankheitsentität sowie zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien notwendig.

## 7. Literaturverzeichnis

Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J. & Rispens, T. (2009) Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*, 39(4), 469-77.

Allt, G. (1975) The node of Ranvier in experimental allergic neuritis: an electron microscope study. *J Neurocytol*, 4(1), 63-76.

American Academy of Neurology AIDS Task Force (1991) Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). Report from an Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology*, 41(5), 617-8.

Appeltshauser, L., Weishaupt, A., Sommer, C. & Doppler, K. (2017) Complement deposition induced by binding of anti-contactin-1 auto-antibodies is modified by immunoglobulins. *Exp Neurol*, 287(Pt 1), 84-90.

Asbury, A. K. & Cornblath, D. R. (1990) Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 27 Suppl, S21-4.

Auer, R. N., Bell, R. B. & Lee, M. A. (1989) Neuropathy with onion bulb formations and pure motor manifestations. *Can J Neurol Sci*, 16(2), 194-7.

Austin, H. A., 3rd, Antonovych, T. T., MacKay, K., Boumpas, D. T. & Balow, J. E. (1992) NIH conference. Membranous nephropathy. *Ann Intern Med*, 116(8), 672-82.

Axelsson, G. & Liedholm, L. J. (2002) [Multifocal motor neuropathy--unusual cause of hypoglossal palsy]. *Lakartidningen*, 99(13), 1448-50.

Basak, S., Raju, K., Babiarz, J., Kane-Goldsmith, N., Koticha, D. & Grumet, M. (2007) Differential expression and functions of neuronal and glial neurofascin isoforms and splice variants during PNS development. *Dev Biol*, 311(2), 408-22.

Basile, E., Gibbs, E., Aziz, T. & Oger, J. (2006) During 3 years treatment of primary progressive multiple sclerosis with glatiramer acetate, specific antibodies switch from IgG1 to IgG4. *J Neuroimmunol*, 177(1-2), 161-6.

Basta, M., Illa, I. & Dalakas, M. C. (1996) Increased in vitro uptake of the complement C3b in the serum of patients with Guillain-Barre syndrome, myasthenia gravis and dermatomyositis. *J Neuroimmunol*, 71(1-2), 227-9.

Behan, P. O., Lowenstein, L. M., Stilmant, M. & Sax, D. S. (1973) Landry-Guillain-Barre-Strohl syndrome and immune-complex nephritis. *Lancet*, 1(7808), 850-4.

Benedetti, L., Briani, C., Franciotta, D., Fazio, R., Paolasso, I., Comi, C., Luigetti, M., Sabatelli, M., Giannini, F., Mancardi, G. L., Schenone, A., Nobile-Orazio, E. & Cocito, D. (2011) Rituximab in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a report of 13 cases and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82(3), 306-8.

- Benedetti, L., Briani, C., Grandis, M., Vigo, T., Gobbi, M., Ghiglione, E., Carpo, M., Cocito, D., Caporale, C. M., Sormani, M. P., Mancardi, G. L., Nobile-Orazio, E. & Schenone, A. (2007) Predictors of response to rituximab in patients with neuropathy and anti-myelin associated glycoprotein immunoglobulin M. *J Peripher Nerv Syst*, 12(2), 102-7.
- Berger, M., McCallus, D. E. & Lin, C. S. (2013) Rapid and reversible responses to IVIG in autoimmune neuromuscular diseases suggest mechanisms of action involving competition with functionally important autoantibodies. *J Peripher Nerv Syst*, 18(4), 275-96.
- Berglund, E. O., Murai, K. K., Fredette, B., Sekerkova, G., Marturano, B., Weber, L., Mugnaini, E. & Ranscht, B. (1999) Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron*, 24(3), 739-50.
- Bhat, M. A., Rios, J. C., Lu, Y., Garcia-Fresco, G. P., Ching, W., St Martin, M., Li, J., Einheber, S., Chesler, M., Rosenbluth, J., Salzer, J. L. & Bellen, H. J. (2001) Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron*, 30(2), 369-83.
- Bindon, C. I., Hale, G., Bruggemann, M. & Waldmann, H. (1988) Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med*, 168(1), 127-42.
- Bleeker, W. K., Teeling, J. L. & Hack, C. E. (2001) Accelerated autoantibody clearance by intravenous immunoglobulin therapy: studies in experimental models to determine the magnitude and time course of the effect. *Blood*, 98(10), 3136-42.
- Bonnon, C., Bel, C., Goutebroze, L., Maigret, B., Girault, J. A. & Faivre-Sarrailh, C. (2007) PGY repeats and N-glycans govern the trafficking of paranodin and its selective association with contactin and neurofascin-155. *Mol Biol Cell*, 18(1), 229-41.
- Boros, P., Gondolesi, G. & Bromberg, J. S. (2005) High dose intravenous immunoglobulin treatment: mechanisms of action. *Liver Transpl*, 11(12), 1469-80.
- Bouche, P., Moulouquet, A., Younes-Chennoufi, A. B., Adams, D., Baumann, N., Meininger, V., Leger, J. M. & Said, G. (1995) Multifocal motor neuropathy with conduction block: a study of 24 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 59(1), 38-44.
- Bournazos, S., DiLillo, D. J. & Ravetch, J. V. (2015) The role of Fc-FcγR interactions in IgG-mediated microbial neutralization. *J Exp Med*, 212(9), 1361-9.
- Bournazos, S. & Ravetch, J. V. (2017) Diversification of IgG effector functions. *Int Immunol*, 29(7), 303-310.
- Boyle, M. E., Berglund, E. O., Murai, K. K., Weber, L., Peles, E. & Ranscht, B. (2001) Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron*, 30(2), 385-97.

- Brettschneider, J., Claus, A., Kassubek, J. & Tumani, H. (2005) Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol*, 252(9), 1067-73.
- Briani, C., Zara, G., Zambello, R., Trentin, L., Rana, M. & Zaja, F. (2004) Rituximab-responsive CIDP. *Eur J Neurol*, 11(11), 788.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D. A., Fernandez, N., Jorieux, S. & Daeron, M. (2009) Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 113(16), 3716-25.
- Buchwald, B., Weishaupt, A., Toyka, K. V. & Dodel, J. (1998) Pre- and postsynaptic blockade of neuromuscular transmission by Miller-Fisher syndrome IgG at mouse motor nerve terminals. *Eur J Neurosci*, 10(1), 281-90.
- Busby, M. & Donaghy, M. (2003) Chronic dysimmune neuropathy. A subclassification based upon the clinical features of 102 patients. *J Neurol*, 250(6), 714-24.
- Cao, Y., Menon, P., Ching-Fen Chang, F., Mahant, N., Geevasinga, N., Fung, V. S. & Vucic, S. (2017) Postural tremor and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve*, 55(3), 338-343.
- Caporale, C. M., Capasso, M., Luciani, M., Prencipe, V., Creati, B., Gandolfi, P., De Angelis, M. V., Di Muzio, A., Caporale, V. & Uncini, A. (2006) Experimental axonopathy induced by immunization with *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharide from a patient with Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol*, 174(1-2), 12-20.
- Charles, P., Tait, S., Faivre-Sarrailh, C., Barbin, G., Gunn-Moore, F., Denisenko-Nehrbass, N., Guennoc, A. M., Girault, J. A., Brophy, P. J. & Lubetzki, C. (2002) Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr Biol*, 12(3), 217-20.
- Chaudhry, V., Corse, A. M., Cornblath, D. R., Kuncl, R. W., Freimer, M. L. & Griffin, J. W. (1994) Multifocal motor neuropathy: electrodiagnostic features. *Muscle Nerve*, 17(2), 198-205.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol*, 7(8), 2745-52.
- Chevret, S., Hughes, R. A. & Annane, D. (2017) Plasma exchange for Guillain-Barre syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, 2, Cd001798.
- Chiba, A., Kusunoki, S., Shimizu, T. & Kanazawa, I. (1992) Serum IgG antibody to ganglioside GQ1b is a possible marker of Miller Fisher syndrome. *Ann Neurol*, 31(6), 677-9.
- Childs, J. D., Piva, S. R. & Fritz, J. M. (2005) Responsiveness of the numeric pain rating scale in patients with low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)*, 30(11), 1331-4.

- Cifuentes-Diaz, C., Dubourg, O., Irinopoulou, T., Vigny, M., Lachkar, S., Decker, L., Charnay, P., Denisenko, N., Maisonobe, T., Leger, J. M., Viala, K., Hauw, J. J. & Girault, J. A. (2011) Nodes of ranvier and paranodes in chronic acquired neuropathies. *PLoS One*, 6(1), e14533.
- Coman, I., Aigrot, M. S., Seilhean, D., Reynolds, R., Girault, J. A., Zalc, B. & Lubetzki, C. (2006) Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain*, 129(Pt 12), 3186-95.
- Correia, I. R. (2010) Stability of IgG isotypes in serum. *MAbs*, 2(3), 221-32.
- Corse, A. M., Chaudhry, V., Crawford, T. O., Cornblath, D. R., Kuncl, R. W. & Griffin, J. W. (1996) Sensory nerve pathology in multifocal motor neuropathy. *Ann Neurol*, 39(3), 319-25.
- Cortese, A., Devaux, J. J., Zardini, E., Manso, C., Taieb, G., Carra Dalliere, C., Merle, P., Osera, C., Romagnolo, S., Visigalli, N., Piscosquito, G., Salsano, E., Alfonsi, E., Moglia, A., Pareyson, D., Marchioni, E. & Franciotta, D. (2016) Neurofascin-155 as a putative antigen in combined central and peripheral demyelination. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 3(4), e238.
- Cragg, M. S., Walshe, C. A., Ivanov, A. O. & Glennie, M. J. (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*, 8, 140-74.
- Dalakas, M. C. (1994) High-dose intravenous immunoglobulin and serum viscosity: risk of precipitating thromboembolic events. *Neurology*, 44(2), 223-6.
- Dalakas, M. C. (1997) Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases. *Ann Intern Med*, 126(9), 721-30.
- Dalakas, M. C. (2002) Mechanisms of action of IVIg and therapeutic considerations in the treatment of acute and chronic demyelinating neuropathies. *Neurology*, 59(12 Suppl 6), S13-21.
- Dalakas, M. C. (2004) The use of intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune neuromuscular diseases: evidence-based indications and safety profile. *Pharmacol Ther*, 102(3), 177-93.
- Dalakas, M. C. (2015) Pathogenesis of immune-mediated neuropathies. *Biochim Biophys Acta*, 1852(4), 658-66.
- Dalakas, M. C. & Gooch, C. (2016) Close to the node but far enough: What nodal antibodies tell us about CIDP and its therapies. *Neurology*, 86(9), 796-7.
- Dalakas, M. C., Rakocevic, G., Salajegheh, M., Dambrosia, J. M., Hahn, A. F., Raju, R. & McElroy, B. (2009) Placebo-controlled trial of rituximab in IgM anti-myelin-associated glycoprotein antibody demyelinating neuropathy. *Ann Neurol*, 65(3), 286-93.

Davidson, A. I., Halstead, S. K., Goodfellow, J. A., Chavada, G., Mallik, A., Overell, J., Lunn, M. P., McConnachie, A., van Doorn, P. & Willison, H. J. (2017) Inhibition of complement in Guillain-Barre syndrome: the ICA-GBS study. *J Peripher Nerv Syst*, 22(1), 4-12.

Davis, J. Q. & Bennett, V. (1993) Ankyrin-binding activity of nervous system cell adhesion molecules expressed in adult brain. *J Cell Sci Suppl*, 17, 109-17.

Davis, J. Q., Lambert, S. & Bennett, V. (1996) Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol*, 135(5), 1355-67.

Delmont, E., Manso, C., Querol, L., Cortese, A., Berardinelli, A., Lozza, A., Belghazi, M., Malissart, P., Labauge, P., Taieb, G., Yuki, N., Illa, I., Attarian, S. & Devaux, J. J. (2017) Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain*, 140(7), 1851-1858.

Denisenko-Nehrbass, N., Oguievetskaia, K., Goutebroze, L., Galvez, T., Yamakawa, H., Ohara, O., Carnaud, M. & Girault, J. A. (2003) Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtaparanodes of myelinated fibres. *Eur J Neurosci*, 17(2), 411-6.

Deuschl, G., Bain, P. & Brin, M. (1998) Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. *Mov Disord*, 13 Suppl 3, 2-23.

Devaux, J. J. (2012) Antibodies to gliomedin cause peripheral demyelinating neuropathy and the dismantling of the nodes of Ranvier. *Am J Pathol*, 181(4), 1402-13.

Devaux, J. J., Miura, Y., Fukami, Y., Inoue, T., Manso, C., Belghazi, M., Sekiguchi, K., Kokubun, N., Ichikawa, H., Wong, A. H. & Yuki, N. (2016) Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*, 86(9), 800-7.

Devaux, J. J., Odaka, M. & Yuki, N. (2012) Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barre syndrome. *J Peripher Nerv Syst*, 17(1), 62-71.

Diaz-Manera, J., Martinez-Hernandez, E., Querol, L., Klooster, R., Rojas-Garcia, R., Suarez-Calvet, X., Munoz-Blanco, J. L., Mazia, C., Straasheijm, K. R., Gallardo, E., Juarez, C., Verschuuren, J. J. & Illa, I. (2012) Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology*, 78(3), 189-93.

Diebolder, C. A., Beurskens, F. J., de Jong, R. N., Koning, R. I., Strumane, K., Lindorfer, M. A., Voorhorst, M., Ugurlar, D., Rosati, S., Heck, A. J., van de Winkel, J. G., Wilson, I. A., Koster, A. J., Taylor, R. P., Saphire, E. O., Burton, D. R., Schuurman, J., Gros, P. & Parren, P. W. (2014) Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*, 343(6176), 1260-3.

Dimachkie, M. M. & Barohn, R. J. (2013) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Curr Treat Options Neurol*, 15(3), 350-66.

- Doppler, K., Appeltshauser, L., Kramer, H. H., Ng, J. K., Meinl, E., Villmann, C., Brophy, P., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., Weishaupt, A. & Sommer, C. (2015a) Contactin-1 and Neurofascin-155/-186 Are Not Targets of Auto-Antibodies in Multifocal Motor Neuropathy. *PLoS One*, 10(7), e0134274.
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Villmann, C., Martin, C., Peles, E., Kramer, H. H., Haarmann, A., Buttmann, M. & Sommer, C. (2016) Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain*, 139(Pt 10):2617-2630.
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Wilhelmi, K., Villmann, C., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., Maurer, M., Weishaupt, A. & Sommer, C. (2015b) Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(7), 720-8.
- Doppler, K., Werner, C. & Sommer, C. (2013) Disruption of nodal architecture in skin biopsies of patients with demyelinating neuropathies. *J Peripher Nerv Syst*, 18(2), 168-76.
- Dorner, T., Isenberg, D., Jayne, D., Wiendl, H., Zillikens, D. & Burmester, G. (2009) Current status on B-cell depletion therapy in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 9(2), 82-9.
- Dunkelberger, J. R. & Song, W. C. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 20(1), 34-50.
- Dyck, P. J., Lais, A. C., Ohta, M., Bastron, J. A., Okazaki, H. & Groover, R. V. (1975) Chronic inflammatory polyradiculoneuropathy. *Mayo Clin Proc*, 50(11), 621-37.
- Ebbo, M., Grados, A., Samson, M., Groh, M., Loundou, A., Rigolet, A., Terrier, B., Guillaud, C., Carra-Dalliere, C., Renou, F., Pozdzik, A., Labauge, P., Palat, S., Berthelot, J. M., Pennaforte, J. L., Wynckel, A., Lebas, C., Le Gouellec, N., Quemeneur, T., Dahan, K., Carbonnel, F., Leroux, G., Perlat, A., Mathian, A., Cacoub, P., Hachulla, E., Costedoat-Chalumeau, N., Harle, J. R. & Schleinitz, N. (2017) Long-term efficacy and safety of rituximab in IgG4-related disease: Data from a French nationwide study of thirty-three patients. *PLoS One*, 12(9), e0183844.
- Eftimov, F., Vermeulen, M., de Haan, R. J., van den Berg, L. H. & van Schaik, I. N. (2009) Subcutaneous immunoglobulin therapy for multifocal motor neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 14(2), 93-100.
- Einheber, S., Zanazzi, G., Ching, W., Scherer, S., Milner, T. A., Peles, E. & Salzer, J. L. (1997) The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol*, 139(6), 1495-506.
- Emsley, H. C. & Molloy, J. (2002) Inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy associated with membranous glomerulonephritis and thrombocytopenia. *Clin Neurol Neurosurg*, 105(1), 23-6.

Engvall, E. & Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-4.

European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society (2010) EFNS/PNS guideline on management of multifocal motor neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society-first revision. *J Peripher Nerv Syst*, 15(4), 295-301.

European FK506 Multicentre Liver Study Group (1994) Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. *Lancet*, 344(8920), 423-8.

European Medicine Agency (2009) *EMEA/H/C/000165 MabThera - EPAR - Product Information*, 2009. Available online: [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000165/WC500025821.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000165/WC500025821.pdf) [Accessed 28.10.2017].

European Medicine Agency (2017) *EMEA/H/C/004112 Truxima : EPAR - Product Information*, 2017. Available online: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/004112/WC500222694.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/004112/WC500222694.pdf) [Accessed 28.10.2017].

Faivre-Sarrailh, C. & Devaux, J. J. (2013) Neuro-glia interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. *Front Cell Neurosci*, 7, 196.

Faivre-Sarrailh, C., Gauthier, F., Denisenko-Nehrbass, N., Le Bivic, A., Rougon, G. & Girault, J. A. (2000) The glycosylphosphatidyl inositol-anchored adhesion molecule F3/contactin is required for surface transport of paranodin/contactin-associated protein (caspr). *J Cell Biol*, 149(2), 491-502.

Faivre-Sarrailh, C. & Rougon, G. (1997) Axonal molecules of the immunoglobulin superfamily bearing a GPI anchor: their role in controlling neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*, 9(2), 109-15.

Fehmi, J., Scherer, S. S., Willison, H. J. & Rinaldi, S. (2017) Nodes, paranodes and neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, [Epub ahead of print].

Figueroa, J. J., Dyck, P. J., Laughlin, R. S., Mercado, J. A., Massie, R., Sandroni, P., Dyck, P. J. & Low, P. A. (2012) Autonomic dysfunction in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology*, 78(10), 702-8.

Fitzpatrick, A. M., Mann, C. A., Barry, S., Brennan, K., Overell, J. R. & Willison, H. J. (2011) An open label clinical trial of complement inhibition in multifocal motor neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 16(2), 84-91.

Franssen, H. & Straver, D. C. (2013) Pathophysiology of immune-mediated demyelinating neuropathies-part I: neuroscience. *Muscle Nerve*, 48(6), 851-64.

Geis, C., Grunewald, B., Weishaupt, A., Wulsch, T., Toyka, K. V., Reif, A. & Sommer, C. (2012) Human IgG directed against amphiphysin induces anxiety behavior in a rat model after intrathecal passive transfer. *J Neural Transm (Vienna)*, 119(8), 981-5.

- Gollan, L., Sabanay, H., Poliak, S., Berglund, E. O., Ranscht, B. & Peles, E. (2002) Retention of a cell adhesion complex at the paranodal junction requires the cytoplasmic region of Caspr. *J Cell Biol*, 157(7), 1247-56.
- Gollan, L., Salomon, D., Salzer, J. L. & Peles, E. (2003) Caspr regulates the processing of contactin and inhibits its binding to neurofascin. *J Cell Biol*, 163(6), 1213-8.
- Gong, Y., Tagawa, Y., Lunn, M. P., Laroy, W., Heffer-Laue, M., Li, C. Y., Griffin, J. W., Schnaar, R. L. & Sheikh, K. A. (2002) Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. *Brain*, 125(Pt 11), 2491-506.
- Goodfellow, J. A. & Willison, H. J. (2016) Antiganglioside, antiganglioside-complex, and antiglycolipid-complex antibodies in immune-mediated neuropathies. *Curr Opin Neurol*, 29(5), 572-80.
- Gorson, K. C., Allam, G. & Ropper, A. H. (1997) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: clinical features and response to treatment in 67 consecutive patients with and without a monoclonal gammopathy. *Neurology*, 48(2), 321-8.
- Govoni, V. & Granieri, E. (2001) Epidemiology of the Guillain-Barre syndrome. *Curr Opin Neurol*, 14(5), 605-13.
- Graham, F. L. & van der Eb, A. J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 52(2), 456-67.
- Griffin, J. W., Li, C. Y., Ho, T. W., Xue, P., Macko, C., Gao, C. Y., Yang, C., Tian, M., Mishu, B. & Cornblath, D. R. (1995) Guillain-Barre syndrome in northern China. The spectrum of neuropathological changes in clinically defined cases. *Brain*, 118 ( Pt 3), 577-95.
- Gross, S., Fischer, A., Rosati, M., Matiasek, L., Corlazzoli, D., Cappello, R., Porcarelli, L., Harcourt-Brown, T., Jurina, K., Garosi, L., Flegel, T., Quitt, P., Molin, J., Huelsmeyer, V. I., Schenk, H., Gandini, G., Gnirs, K., Blot, S., Jeandel, A., Baroni, M., Loderstedt, S., Abbiati, G., Leithaeuser, C., Schulze, S., Kornberg, M., Lowrie, M. & Matiasek, K. (2016) Nodo-paranodopathy, internodopathy and cleftopathy: Target-based reclassification of Guillain-Barre-like immune-mediated polyradiculoneuropathies in dogs and cats. *Neuromuscul Disord*, 26(12), 825-836.
- Gursoy, A. E., Kolukisa, M., Babacan-Yildiz, G., Altintas, O., Yaman, A. & Asil, T. (2014) Reversible conduction failure in overlap of Miller Fisher syndrome and pharyngeal-cervical-brachial variant of Guillain-Barre syndrome in the spectrum of nodo-paranodopathies. *J Clin Neurosci*, 21(7), 1269-71.
- Hadden, R. D., Cornblath, D. R., Hughes, R. A., Zielasek, J., Hartung, H. P., Toyka, K. V. & Swan, A. V. (1998) Electrophysiological classification of Guillain-Barre syndrome: clinical associations and outcome. Plasma Exchange/Sandoglobulin Guillain-Barre Syndrome Trial Group. *Ann Neurol*, 44(5), 780-8.
- Hafer-Macko, C., Hsieh, S. T., Li, C. Y., Ho, T. W., Sheikh, K., Cornblath, D. R., McKhann, G. M., Asbury, A. K. & Griffin, J. W. (1996) Acute motor axonal neuropathy: an antibody-mediated attack on axolemma. *Ann Neurol*, 40(4), 635-44.

Harschnitz, O., van den Berg, L. H., Johansen, L. E., Jansen, M. D., Kling, S., Vieira de Sa, R., Vlam, L., van Rheenen, W., Karst, H., Wierenga, C. J., Pasterkamp, R. J. & van der Pol, W. L. (2016) Autoantibody pathogenicity in a multifocal motor neuropathy induced pluripotent stem cell-derived model. *Ann Neurol*, 80(1), 71-88.

Harvey, G. K., Toyka, K. V., Zielasek, J., Kiefer, R., Simonis, C. & Hartung, H. P. (1995) Failure of anti-GM1 IgG or IgM to induce conduction block following intraneural transfer. *Muscle Nerve*, 18(4), 388-94.

Hayase, Y. & Tobita, K. (1997) Influenza virus and neurological diseases. *Psychiatry Clin Neurosci*, 51(4), 181-4.

Hehir, M. K., Hobson-Webb, L. D., Benatar, M., Barnett, C., Silvestri, N. J., Howard, J. F., Jr., Howard, D., Visser, A., Crum, B. A., Nowak, R., Beekman, R., Kumar, A., Ruzhansky, K., Chen, I. A., Pulley, M. T., LaBoy, S. M., Fellman, M. A., Greene, S. M., Pasnoor, M. & Burns, T. M. (2017) Rituximab as treatment for anti-MuSK myasthenia gravis: Multicenter blinded prospective review. *Neurology*, 89(10), 1069-1077.

Hiew, F. L. & Rajabally, Y. A. (2016) Sural sparing in Guillain-Barre syndrome subtypes: a reappraisal with historical and recent definitions. *Clin Neurophysiol*, 127(2), 1683-8.

Hmiel, L. K., Brorson, K. A. & Boyne, M. T., 2nd (2015) Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity. *Anal Bioanal Chem*, 407(1), 79-94.

Ho, T. W., Hsieh, S. T., Nachamkin, I., Willison, H. J., Sheikh, K., Kiehlbauch, J., Flanigan, K., McArthur, J. C., Cornblath, D. R., McKhann, G. M. & Griffin, J. W. (1997) Motor nerve terminal degeneration provides a potential mechanism for rapid recovery in acute motor axonal neuropathy after *Campylobacter* infection. *Neurology*, 48(3), 717-24.

Huang, C. C., Lehman, A., Albawardi, A., Satoskar, A., Brodsky, S., Nadasdy, G., Hebert, L., Rovin, B. & Nadasdy, T. (2013) IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Mod Pathol*, 26(6), 799-805.

Hughes, R., Atkinson, P., Coates, P., Hall, S. & Leibowitz, S. (1992) Sural nerve biopsies in Guillain-Barre syndrome: axonal degeneration and macrophage-associated demyelination and absence of cytomegalovirus genome. *Muscle Nerve*, 15(5), 568-75.

Hughes, R., Bensa, S., Willison, H., Van den Bergh, P., Comi, G., Illa, I., Nobile-Orazio, E., van Doorn, P., Dalakas, M., Bojar, M. & Swan, A. (2001) Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol*, 50(2), 195-201.

Hughes, R. A. (1997) Plasma exchange versus intravenous immunoglobulin for Guillain-Barre syndrome. *Ther Apher*, 1(2), 129-30.

Hughes, R. A., Allen, D., Makowska, A. & Gregson, N. A. (2006) Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 11(1), 30-46.

Hughes, R. A., Brassington, R., Gunn, A. A. & van Doorn, P. A. (2016) Corticosteroids for Guillain-Barre syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, Cd001446.

Hughes, R. A. & Cornblath, D. R. (2005) Guillain-Barre syndrome. *Lancet*, 366(9497), 1653-66.

Hughes, R. A., Donofrio, P., Bril, V., Dalakas, M. C., Deng, C., Hanna, K., Hartung, H. P., Latov, N., Merkies, I. S. & van Doorn, P. A. (2008) Intravenous immune globulin (10% caprylate-chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 7(2), 136-44.

Hughes, R. A., Swan, A. V. & van Doorn, P. A. (2014) Intravenous immunoglobulin for Guillain-Barre syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*(9), Cd002063.

Huijbers, M. G., Querol, L. A., Niks, E. H., Plomp, J. J., van der Maarel, S. M., Graus, F., Dalmau, J., Illa, I. & Verschuuren, J. J. (2015) The expanding field of IgG4-mediated neurological autoimmune disorders. *Eur J Neurol*, 22(8), 1151-61.

Ilyas, A. A., Chen, Z. W., Cook, S. D., Mithen, F. A. & Singhal, B. S. (2001) Immunoglobulin G subclass distribution of autoantibodies to gangliosides in patients with Guillain-Barre syndrome. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 109(1-2), 115-23.

Irani, V., Guy, A. J., Andrew, D., Beeson, J. G., Ramsland, P. A. & Richards, J. S. (2015) Molecular properties of human IgG subclasses and their implications for designing therapeutic monoclonal antibodies against infectious diseases. *Mol Immunol*, 67(2 Pt A), 171-82.

Israeli, E., Agmon-Levin, N., Blank, M., Chapman, J. & Shoenfeld, Y. (2012) Guillain-Barre syndrome--a classical autoimmune disease triggered by infection or vaccination. *Clin Rev Allergy Immunol*, 42(2), 121-30.

Itaya, K., Inoue, M., Iizuka, N., Shimizu, Y., Yuki, N. & Ichikawa, H. (2016) A case of a 17-year-old male with neurofascin-155 antibody-positive chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy presenting with tremor and ataxia. *Rinsho Shinkeigaku*, 56(9), 633-6.

Ivnitsky, J. J., Schafer, T. V. & Rejniuk, V. L. (2011) Promotion of the toxic action of cyclophosphamide by digestive tract luminal ammonia in rats. *ISRN Toxicol*, 2011, 450875, 1-4.

Jacob, S. & Rajabally, Y. A. (2009) Current proposed mechanisms of action of intravenous immunoglobulins in inflammatory neuropathies. *Curr Neuropharmacol*, 7(4), 337-42.

Jacobs, B. C., Koga, M., van Rijs, W., Geleijns, K., van Doorn, P. A., Willison, H. J. & Yuki, N. (2008) Subclass IgG to motor gangliosides related to infection and clinical course in Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol*, 194(1-2), 181-90.

- Jacobs, B. C., O'Hanlon, G. M., Bullens, R. W., Veitch, J., Plomp, J. J. & Willison, H. J. (2003) Immunoglobulins inhibit pathophysiological effects of anti-GQ1b-positive sera at motor nerve terminals through inhibition of antibody binding. *Brain*, 126(Pt 10), 2220-34.
- Jacobs, B. C., Rothbarth, P. H., van der Meche, F. G., Herbrink, P., Schmitz, P. I., de Klerk, M. A. & van Doorn, P. A. (1998) The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: a case-control study. *Neurology*, 51(4), 1110-5.
- Jaspert, A., Claus, D., Grehl, H. & Neundorfer, B. (1996) Multifocal motor neuropathy: clinical and electrophysiological findings. *J Neurol*, 243(10), 684-92.
- Jensen, M. P. & McFarland, C. A. (1993) Increasing the reliability and validity of pain intensity measurement in chronic pain patients. *Pain*, 55(2), 195-203.
- Jinka, M. & Chaudhry, V. (2014) Treatment of multifocal motor neuropathy. *Curr Treat Options Neurol*, 16(2), 269.
- Kadoya, M., Kaida, K., Koike, H., Takazaki, H., Ogata, H., Moriguchi, K., Shimizu, J., Nagata, E., Takizawa, S., Chiba, A., Yamasaki, R., Kira, J. I., Sobue, G. & Ikewaki, K. (2016) IgG4 anti-neurofascin155 antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Clinical significance and diagnostic utility of a conventional assay. *J Neuroimmunol*, 301, 16-22.
- Kawamura, N., Yamasaki, R., Yonekawa, T., Matsushita, T., Kusunoki, S., Nagayama, S., Fukuda, Y., Ogata, H., Matsuse, D., Murai, H. & Kira, J. (2013) Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology*, 81(8), 714-22.
- Khosroshahi, A., Carruthers, M. N., Deshpande, V., Unizony, S., Bloch, D. B. & Stone, J. H. (2012) Rituximab for the treatment of IgG4-related disease: lessons from 10 consecutive patients. *Medicine (Baltimore)*, 91(1), 57-66.
- Klein, C. J., Lennon, V. A., Aston, P. A., McKeon, A. & Pittock, S. J. (2012) Chronic pain as a manifestation of potassium channel-complex autoimmunity. *Neurology*, 79(11), 1136-44.
- Kleyweg, R. P., van der Meche, F. G. & Schmitz, P. I. (1991) Interobserver agreement in the assessment of muscle strength and functional abilities in Guillain-Barre syndrome. *Muscle Nerve*, 14(11), 1103-9.
- Koga, M., Yuki, N., Hirata, K., Morimatsu, M., Mori, M. & Kuwabara, S. (2003) Anti-GM1 antibody IgG subclass: a clinical recovery predictor in Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, 60(9), 1514-8.
- Kohli, A., Tandon, P. & Kher, V. (1992) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy with membranous glomerulonephritis: report of one case. *Clin Neurol Neurosurg*, 94(1), 31-3.

Koike, H., Kadoya, M., Kaida, K. I., Ikeda, S., Kawagashira, Y., Iijima, M., Kato, D., Ogata, H., Yamasaki, R., Matsukawa, N., Kira, J. I., Katsuno, M. & Sobue, G. (2017) Paranodal dissection in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 88(6), 465-473.

Komada, M. & Soriano, P. (2002) [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol*, 156(2), 337-48.

Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2012) *Diagnostik bei Polyneuropathien*, 2012. Available online: <https://www.dgn.org/leitlinien/2331-II-44-2012-diagnostik-bei-polyneuropathien> [Accessed 10.10.2017].

Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2015) *Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden*, 2015. Available online: <https://www.dgn.org/leitlinien/2338-II-45-2012-therapie-akuter-und-chronischer-immunvermittelter-neuropathien-und-neuritiden> [Accessed 23.08.2017].

Kuitwaard, K., de Gelder, J., Tio-Gillen, A. P., Hop, W. C., van Gelder, T., van Toorenenbergen, A. W., van Doorn, P. A. & Jacobs, B. C. (2009a) Pharmacokinetics of intravenous immunoglobulin and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 66(5), 597-603.

Kuitwaard, K., van Koningsveld, R., Ruts, L., Jacobs, B. C. & van Doorn, P. A. (2009b) Recurrent Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80(1), 56-9.

Kuntzer, T. (2016) What is new in 2015 in dysimmune neuropathies? *Rev Neurol (Paris)*, 172(12), 779-784.

Kusunoki, S. & Kaida, K. (2011) Antibodies against ganglioside complexes in Guillain-Barre syndrome and related disorders. *J Neurochem*, 116(5), 828-32.

Kuwabara, S., Misawa, S. & Mori, M. (2017) Nodopathy: chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin 155 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 88(6), 459.

Kuwabara, S. & Yuki, N. (2013) Axonal Guillain-Barre syndrome: concepts and controversies. *Lancet Neurol*, 12(12), 1180-8.

Kuwabara, S., Yuki, N., Koga, M., Hattori, T., Matsuura, D., Miyake, M. & Noda, M. (1998) IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, 44(2), 202-8.

Kuwahara, M., Samukawa, M., Ikeda, T., Morikawa, M., Ueno, R., Hamada, Y. & Kusunoki, S. (2017a) Characterization of the neurological diseases associated with Mycoplasma pneumoniae infection and anti-glycolipid antibodies. *J Neurol*, 264(3), 467-475.

Kuwahara, M., Suzuki, H., Oka, N., Ogata, H., Yanagimoto, S., Sadakane, S., Fukumoto, Y., Yamana, M., Yuhara, Y., Yoshikawa, K., Morikawa, M., Kawai, S., Okazaki, M., Tsujimoto, T., Kira, J. I. & Kusunoki, S. (2017b) Electron microscopic abnormality and therapeutic efficacy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin155 immunoglobulin G4 antibody. *Muscle Nerve*, [Epub ahead of print].

Labasque, M., Hivert, B., Nogales-Gadea, G., Querol, L., Illa, I. & Faivre-Sarrailh, C. (2014) Specific contactin N-glycans are implicated in neurofascin binding and autoimmune targeting in peripheral neuropathies. *J Biol Chem*, 289(11), 7907-18.

Lachance, D. H., Lennon, V. A., Pittock, S. J., Tracy, J. A., Krecke, K. N., Amrami, K. K., Poeschla, E. M., Orenstein, R., Scheithauer, B. W., Sejvar, J. J., Holzbauer, S., Devries, A. S. & Dyck, P. J. (2010) An outbreak of neurological autoimmunity with polyradiculoneuropathy in workers exposed to aerosolised porcine neural tissue: a descriptive study. *Lancet Neurol*, 9(1), 55-66.

Leite, M. I., Jacob, S., Viegas, S., Cossins, J., Clover, L., Morgan, B. P., Beeson, D., Willcox, N. & Vincent, A. (2008) IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis. *Brain*, 131(Pt 7), 1940-52.

Leussink, V. I., Hartung, H. P., Kieseier, B. C. & Stettner, M. (2016) Subcutaneous immunoglobulins in the treatment of chronic immune-mediated neuropathies. *Ther Adv Neurol Disord*, 9(4), 336-43.

Li, J., Bai, Y., Ghandour, K., Qin, P., Grandis, M., Trostinskaia, A., Ianakova, E., Wu, X., Schenone, A., Vallat, J. M., Kupsky, W. J., Hatfield, J. & Shy, M. E. (2005) Skin biopsies in myelin-related neuropathies: bringing molecular pathology to the bedside. *Brain*, 128(Pt 5), 1168-77.

Linker, R. A. & Kieseier, B. C. (2008) Innovative monoclonal antibody therapies in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*, 1(1), 43-52.

Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., Black, J. A., Greenwood, J., Lian, Z. & Waxman, S. G. (2001) Direct interaction with contactin targets voltage-gated sodium channel Na(v)1.9/NaN to the cell membrane. *J Biol Chem*, 276(49), 46553-61.

Low, P. A., Dyck, P. J., Lambert, E. H., Brimijoin, W. S., Trautmann, J. C., Malagelada, J. R., Fealey, R. D. & Barrett, D. M. (1983) Acute panautonomic neuropathy. *Ann Neurol*, 13(4), 412-7.

Lucas, A. H. (1990) IgG subclass-restricted immune responses to allergens. *Springer Semin Immunopathol*, 12(4), 385-400.

Lutz, H. U., Stammler, P., Bianchi, V., Trueb, R. M., Hunziker, T., Burger, R., Jelezarova, E. & Spath, P. J. (2004) Intravenously applied IgG stimulates complement attenuation in a complement-dependent autoimmune disease at the amplifying C3 convertase level. *Blood*, 103(2), 465-72.

Mahdi-Rogers, M., Brassington, R., Gunn, A. A., van Doorn, P. A. & Hughes, R. A. (2017) Immunomodulatory treatment other than corticosteroids, immunoglobulin and plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*, 5, Cd003280.

Maisonobe, T., Chassande, B., Verin, M., Jouni, M., Leger, J. M. & Bouche, P. (1996) Chronic dysimmune demyelinating polyneuropathy: a clinical and electrophysiological study of 93 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61(1), 36-42.

Manso, C., Querol, L., Mekaouche, M., Illa, I. & Devaux, J. J. (2016) Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects. *Brain*, 139(Pt 6), 1700-12.

Martin, S., Levine, A. K., Chen, Z. J., Ughrin, Y. & Levine, J. M. (2001) Deposition of the NG2 proteoglycan at nodes of Ranvier in the peripheral nervous system. *J Neurosci*, 21(20), 8119-28.

Martin, T. L., Mufson, E. J. & Mesulam, M. M. (1984) The light side of horseradish peroxidase histochemistry. *J Histochem Cytochem*, 32(7), 793.

Mathey, E. K., Derfuss, T., Storch, M. K., Williams, K. R., Hales, K., Woolley, D. R., Al-Hayani, A., Davies, S. N., Rasband, M. N., Olsson, T., Moldenhauer, A., Velhin, S., Hohlfeld, R., Meinl, E. & Linington, C. (2007) Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med*, 204(10), 2363-72.

Mathey, E. K., Garg, N., Park, S. B., Nguyen, T., Baker, S., Yuki, N., Yiannikas, C., Lin, C. S., Spies, J. M., Ghaoui, R., Barnett, M. H., Vucic, S., Pollard, J. D. & Kiernan, M. C. (2017) Autoantibody responses to nodal and paranodal antigens in chronic inflammatory neuropathies. *J Neuroimmunol*, 309, 41-46.

McCombe, P. A., Pollard, J. D. & McLeod, J. G. (1987) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases. *Brain*, 110 ( Pt 6), 1617-30.

McGonigal, R., Rowan, E. G., Greenshields, K. N., Halstead, S. K., Humphreys, P. D., Rother, R. P., Furukawa, K. & Willison, H. J. (2010) Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain*, 133(Pt 7), 1944-60.

McGrogan, A., Madle, G. C., Seaman, H. E. & de Vries, C. S. (2009) The epidemiology of Guillain-Barre syndrome worldwide. A systematic literature review. *Neuroepidemiology*, 32(2), 150-63.

McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A. J., Link, B. K., Levy, R., Czuczman, M. S., Williams, M. E., Heyman, M. R., Bence-Bruckler, I., White, C. A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A. D., Lister, J., Wey, K., Shen, D. & Dallaire, B. K. (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*, 16(8), 2825-33.

Medical Research Council (1943) Aids to the examination of the peripheral nervous system, Memorandum no. 45. *Her Majesty's Stationery Office, London*.

- Meeusen, J. W., Klein, C. J., Pirko, I., Haselkorn, K. E., Kryzer, T. J., Pittock, S. J., Lachance, D. H., Dyck, P. J. & Lennon, V. A. (2012) Potassium channel complex autoimmunity induced by inhaled brain tissue aerosol. *Ann Neurol*, 71(3), 417-26.
- Mellors, R. C., Ortega, L. G. & Holman, H. R. (1957) Role of gamma globulins in pathogenesis of renal lesions in systemic lupus erythematosus and chronic membranous glomerulonephritis, with an observation on the lupus erythematosus cell reaction. *J Exp Med*, 106(2), 191-202.
- Menegoz, M., Gaspar, P., Le Bert, M., Galvez, T., Burgaya, F., Palfrey, C., Ezan, P., Arnos, F. & Girault, J. A. (1997) Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron*, 19(2), 319-31.
- Merkies, I. S., Schmitz, P. I., van der Meche, F. G., Samijn, J. P. & van Doorn, P. A. (2002) Clinimetric evaluation of a new overall disability scale in immune mediated polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 72(5), 596-601.
- Merkies, I. S., Schmitz, P. I., van der Meche, F. G. & van Doorn, P. A. (2000) Psychometric evaluation of a new sensory scale in immune-mediated polyneuropathies. Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment (INCAT) Group. *Neurology*, 54(4), 943-9.
- Missler, M. & Sudhof, T. C. (1998) Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet*, 14(1), 20-6.
- Miura, Y., Devaux, J. J., Fukami, Y., Manso, C., Belghazi, M., Wong, A. H. & Yuki, N. (2015) Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain*, 138(Pt 6), 1484-91.
- Moulin, D. E., Hagen, N., Feasby, T. E., Amireh, R. & Hahn, A. (1997) Pain in Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, 48(2), 328-31.
- Muley, S. A. & Parry, G. J. (2012) Multifocal motor neuropathy. *J Clin Neurosci*, 19(9), 1201-9.
- Murphy, B. F., Gonzales, M. F., Ebeling, P., Fairley, K. F. & Kincaid-Smith, P. (1986) Membranous glomerulonephritis and Landry-Guillain-Barre syndrome. *Am J Kidney Dis*, 8(4), 267-70.
- Nagappa, M., Mahadevan, A., Sinha, S., Bindu, P. S., Mathuranath, P. S., Bineesh, C., Bharath, R. D. & Taly, A. B. (2017) Fatal Morvan Syndrome Associated With Myasthenia Gravis. *Neurologist*, 22(1), 29-33.
- Nakane, P. K. & Kawaoi, A. (1974) Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, 22(12), 1084-91.
- Ng, J. K., Malotka, J., Kawakami, N., Derfuss, T., Khademi, M., Olsson, T., Lington, C., Odaka, M., Tackenberg, B., Pruss, H., Schwab, J. M., Harms, L., Harms, H., Sommer, C., Rasband, M. N., Eshed-Eisenbach, Y., Peles, E., Hohlfeld, R., Yuki, N., Dornmair, K. & Meinl, E. (2012) Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology*, 79(23), 2241-8.

Nicholson, G. D., Prussia, P. R., Sirarajan, S. & Evelyn, S. V. (1989) Membranous glomerulonephritis and the nephrotic syndrome in a patient with Landry-Guillain-Barre-Strohl syndrome. *West Indian Med J*, 38(1), 51-3.

Nobile-Orazio, E. & Gallia, F. (2013) Multifocal motor neuropathy: current therapies and novel strategies. *Drugs*, 73(5), 397-406.

Notturmo, F., Di Febo, T., Yuki, N., Fernandez Rodriguez, B. M., Corti, D., Nobile-Orazio, E., Carpo, M., De Lauretis, A. & Uncini, A. (2014) Autoantibodies to neurofascin-186 and gliomedin in multifocal motor neuropathy. *J Neuroimmunol*, 276(1-2), 207-12.

Odaka, M., Yuki, N. & Hirata, K. (2003) Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barre syndrome. *J Neurol*, 250(8), 913-6.

Ogata, H., Yamasaki, R., Hiwatashi, A., Oka, N., Kawamura, N., Matsuse, D., Kuwahara, M., Suzuki, H., Kusunoki, S., Fujimoto, Y., Ikezoe, K., Kishida, H., Tanaka, F., Matsushita, T., Murai, H. & Kira, J. (2015) Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol*, 2(10), 960-71.

Ogino, M., Orazio, N. & Latov, N. (1995) IgG anti-GM1 antibodies from patients with acute motor neuropathy are predominantly of the IgG1 and IgG3 subclasses. *J Neuroimmunol*, 58(1), 77-80.

Olbricht, C. J., Stark, E., Helmchen, U., Schulze, M., Brunkhorst, R. & Koch, K. M. (1993) Glomerulonephritis associated with inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a case report and review of the literature. *Nephron*, 64(1), 139-41.

Parry, G. J. & Clarke, S. (1988) Multifocal acquired demyelinating neuropathy masquerading as motor neuron disease. *Muscle Nerve*, 11(2), 103-7.

Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G. D., Grumet, M. & Schlessinger, J. (1995) The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell*, 82(2), 251-60.

Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., Plowman, G. D. & Schlessinger, J. (1997) Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *Embo j*, 16(5), 978-88.

Peng, W. (2012) Intravenous immunoglobulin treatment on anti-GM1 antibodies associated neuropathies inhibits cholera toxin and galectin-1 binding to ganglioside GM1. *Immunol Lett*, 143(2), 146-51.

Piepers, S., Jansen, M. D., Cats, E. A., van Sorge, N. M., van den Berg, L. H. & van der Pol, W. L. (2010) IVIg inhibits classical pathway activity and anti-GM1 IgM-mediated complement deposition in MMN. *J Neuroimmunol*, 229(1-2), 256-62.

Pillai, A. M., Thaxton, C., Pribisko, A. L., Cheng, J. G., Dupree, J. L. & Bhat, M. A. (2009) Spatiotemporal ablation of myelinating glia-specific neurofascin (Nfasc NF155) in mice reveals gradual loss of paranodal axoglial junctions and concomitant disorganization of axonal domains. *J Neurosci Res*, 87(8), 1773-93.

Plomp, J. J., Huijbers, M. G., van der Maarel, S. M. & Verschuuren, J. J. (2012) Pathogenic IgG4 subclass autoantibodies in MuSK myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*, 1275, 114-22.

Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A., Einheber, S., Salzer, J. L., Trimmer, J. S., Shrager, P. & Peles, E. (1999) Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K<sup>+</sup> channels. *Neuron*, 24(4), 1037-47.

Poliak, S. & Peles, E. (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*, 4(12), 968-80.

Porter, R. R. (1963) CHEMICAL STRUCTURE OF GAMMA-GLOBULIN AND ANTIBODIES. *Br Med Bull*, 19, 197-201.

Pruss, H., Schwab, J. M., Derst, C., Gortzen, A. & Veh, R. W. (2011) Neurofascin as target of autoantibodies in Guillain-Barre syndrome. *Brain*, 134(Pt 5), e173.

Quast, I., Keller, C. W., Hiepe, F., Tackenberg, B. & Lunemann, J. D. (2016) Terminal complement activation is increased and associated with disease severity in CIDP. *Ann Clin Transl Neurol*, 3(9), 730-5.

Quek, A. M., Soon, D., Chan, Y. C., Thamboo, T. P. & Yuki, N. (2014) Acute-onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with focal segmental glomerulosclerosis. *J Neurol Sci*, 341(1-2), 139-43.

Querol, L., Nogales-Gadea, G., Rojas-Garcia, R., Diaz-Manera, J., Pardo, J., Ortega-Moreno, A., Sedano, M. J., Gallardo, E., Berciano, J., Blesa, R., Dalmau, J. & Illa, I. (2014) Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology*, 82(10), 879-86.

Querol, L., Nogales-Gadea, G., Rojas-Garcia, R., Martinez-Hernandez, E., Diaz-Manera, J., Suarez-Calvet, X., Navas, M., Araque, J., Gallardo, E. & Illa, I. (2013a) Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*, 73(3), 370-80.

Querol, L., Rojas-Garcia, R., Casasnovas, C., Sedano, M. J., Munoz-Blanco, J. L., Alberti, M. A., Paradas, C., Sevilla, T., Pardo, J., Capablo, J. L., Sivera, R., Guerrero, A., Gutierrez-Rivas, E. & Illa, I. (2013b) Long-term outcome in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients treated with intravenous immunoglobulin: a retrospective study. *Muscle Nerve*, 48(6), 870-6.

Querol, L., Rojas-Garcia, R., Diaz-Manera, J., Barcena, J., Pardo, J., Ortega-Moreno, A., Sedano, M. J., Sero-Ballesteros, L., Carvajal, A., Ortiz, N., Gallardo, E. & Illa, I. (2015) Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2(5), e149.

- Rajabally, Y. A., Durand, M. C., Mitchell, J., Orlikowski, D. & Nicolas, G. (2015) Electrophysiological diagnosis of Guillain-Barre syndrome subtype: could a single study suffice? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(1), 115-9.
- Rajabally, Y. A. & Uncini, A. (2012) Outcome and its predictors in Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(7), 711-8.
- Rambukkana, A., Yamada, H., Zanazzi, G., Mathus, T., Salzer, J. L., Yurchenco, P. D., Campbell, K. P. & Fischetti, V. A. (1998) Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science*, 282(5396), 2076-9.
- Ranscht, B. (1988) Sequence of contactin, a 130-kD glycoprotein concentrated in areas of interneuronal contact, defines a new member of the immunoglobulin supergene family in the nervous system. *J Cell Biol*, 107(4), 1561-73.
- Reid, R. A., Bronson, D. D., Young, K. M. & Hemperly, J. J. (1994) Identification and characterization of the human cell adhesion molecule contactin. *Brain Res Mol Brain Res*, 21(1-2), 1-8.
- Renaud, S., Fuhr, P., Gregor, M., Schweikert, K., Lorenz, D., Daniels, C., Deuschl, G., Gratwohl, A. & Steck, A. J. (2006) High-dose rituximab and anti-MAG-associated polyneuropathy. *Neurology*, 66(5), 742-4.
- Ricklin, D., Hajshengallis, G., Yang, K. & Lambris, J. D. (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11(9), 785-97.
- Rios, J. C., Melendez-Vasquez, C. V., Einheber, S., Lustig, M., Grumet, M., Hemperly, J., Peles, E. & Salzer, J. L. (2000) Contactin-associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci*, 20(22), 8354-64.
- Ripellino, P., Fleetwood, T., Cantello, R. & Comi, C. (2014) Treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: from molecular bases to practical considerations. *Autoimmune Dis*, 2014, 201657.
- Rodriguez, E., Nan, R., Li, K., Gor, J. & Perkins, S. J. (2015) A revised mechanism for the activation of complement C3 to C3b: a molecular explanation of a disease-associated polymorphism. *J Biol Chem*, 290(4), 2334-50.
- Rosch, R. E., Bamford, A., Hacoheh, Y., Wraige, E., Vincent, A., Mewasingh, L. & Lim, M. (2014) Guillain-Barre syndrome associated with CASPR2 antibodies: two paediatric cases. *J Peripher Nerv Syst*, 19(3), 246-9.
- Ruts, L., Drenthen, J., Jacobs, B. C. & van Doorn, P. A. (2010) Distinguishing acute-onset CIDP from fluctuating Guillain-Barre syndrome: a prospective study. *Neurology*, 74(21), 1680-6.
- Sagane, K., Hayakawa, K., Kai, J., Hirohashi, T., Takahashi, E., Miyamoto, N., Ino, M., Oki, T., Yamazaki, K. & Nagasu, T. (2005) Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. *BMC Neurosci*, 6, 33.

- Saifee, T. A., Schwingenschuh, P., Reilly, M. M., Lunn, M. P., Katschnig, P., Kassavetis, P., Parees, I., Manji, H., Bhatia, K., Rothwell, J. C. & Edwards, M. J. (2013) Tremor in inflammatory neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84(11), 1282-7.
- Saifetiarova, J., Liu, X., Taylor, A. M., Li, J. & Bhat, M. A. (2017) Axonal domain disorganization in Caspr1 and Caspr2 mutant myelinated axons affects neuromuscular junction integrity, leading to muscle atrophy. *J Neurosci Res*, 95(7), 1373-1390.
- Sander, H. W. & Latov, N. (2003) Research criteria for defining patients with CIDP. *Neurology*, 60(8 Suppl 3), S8-15.
- Saperstein, D. S., Katz, J. S., Amato, A. A. & Barohn, R. J. (2001) Clinical spectrum of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Muscle Nerve*, 24(3), 311-24.
- Schröder A., Ellrichmann G., Chehab G., Schneider M., Linker R.A. & Gold R. (2009) Einsatz von Rituximab in der Behandlung neuroimmunologischer Erkrankungen. *Der Nervenarzt*, 80, 155-165.
- Schumaker, V. N., Calcott, M. A., Spiegelberg, H. L. & Muller-Eberhard, H. J. (1976) Ultracentrifuge studies of the binding of IgG of different subclasses to the C1q subunit of the first component of complement. *Biochemistry*, 15(23), 5175-81.
- Schur, P. H. (1988) IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr Allergy*, 23, 1-11.
- Sejvar, J. J., Kohl, K. S., Gidudu, J., Amato, A., Bakshi, N., Baxter, R., Burwen, D. R., Cornblath, D. R., Cleerbout, J., Edwards, K. M., Heining, U., Hughes, R., Khuri-Bulos, N., Korinthenberg, R., Law, B. J., Munro, U., Maltezou, H. C., Nell, P., Oleske, J., Sparks, R., Velentgas, P., Vermeer, P. & Wiznitzer, M. (2011) Guillain-Barre syndrome and Fisher syndrome: case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*, 29(3), 599-612.
- Sharma, S. & Sharma, P. (2013) Morvan syndrome: after scrotal sac drainage and chemical instillation in hydrocele. *Neurol India*, 61(3), 300-2.
- Shein, H. M. & Enders, J. F. (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 48, 1164-72.
- Sherman, D. L., Tait, S., Melrose, S., Johnson, R., Zonta, B., Court, F. A., Macklin, W. B., Meek, S., Smith, A. J., Cottrell, D. F. & Brophy, P. J. (2005) Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron*, 48(5), 737-42.
- Shi, S. R., Cote, R. J. & Taylor, C. R. (2001) Antigen retrieval immunohistochemistry and molecular morphology in the year 2001. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 9(2), 107-16.
- Shimizu, M., Koda, T., Nakatsuji, Y., Ogata, H., Kira, J. I. & Mochizuki, H. (2017) A case of anti-neurofascin 155 antibody-positive combined central and peripheral demyelination successfully treated with plasma exchange. *Rinsho Shinkeigaku*, 57(1), 41-44.

- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 59, 223-39.
- Singh, J. A., Christensen, R., Wells, G. A., Suarez-Almazor, M. E., Buchbinder, R., Lopez-Olivo, M. A., Ghogomu, E. T. & Tugwell, P. (2010) Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Sao Paulo Med J*, 128(5), 309-10.
- Sistani, L., Rodriguez, P. Q., Hultenby, K., Uhlen, M., Betsholtz, C., Jalanko, H., Tryggvason, K., Wernerson, A. & Patrakka, J. (2013) Neuronal proteins are novel components of podocyte major processes and their expression in glomerular crescents supports their role in crescent formation. *Kidney Int*, 83(1), 63-71.
- Sommer, C., Koch, S., Lammens, M., Gabreels-Festen, A., Stoll, G. & Toyka, K. V. (2005a) Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology*, 65(12), 1924-9.
- Sommer, C., Weishaupt, A., Brinkhoff, J., Biko, L., Wessig, C., Gold, R. & Toyka, K. V. (2005b) Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet*, 365(9468), 1406-11.
- Spiegel, I., Salomon, D., Erne, B., Schaeren-Wiemers, N. & Peles, E. (2002) Caspr3 and caspr4, two novel members of the caspr family are expressed in the nervous system and interact with PDZ domains. *Mol Cell Neurosci*, 20(2), 283-97.
- Spiegelberg, H. L. & Fishkin, B. G. (1972) The catabolism of human G immunoglobulins of different heavy chain subclasses. 3. The catabolism of heavy chain disease proteins and of Fc fragments of myeloma proteins. *Clin Exp Immunol*, 10(4), 599-607.
- Stathopoulos, P., Alexopoulos, H. & Dalakas, M. C. (2015) Autoimmune antigenic targets at the node of Ranvier in demyelinating disorders. *Nat Rev Neurol*, 11(3), 143-56.
- Steck, A. J., Stalder, A. K. & Renaud, S. (2006) Anti-myelin-associated glycoprotein neuropathy. *Curr Opin Neurol*, 19(5), 458-63.
- Stieglbauer, K., Topakian, R., Hinterberger, G. & Aichner, F. T. (2009) Beneficial effect of rituximab monotherapy in multifocal motor neuropathy. *Neuromuscul Disord*, 19(7), 473-5.
- Stoll, G. & Reiners, K. (2016) Immunneuropathien. *Nervenarzt*, 87(8), 887-98.
- Stradleigh, T. W. & Ishida, A. T. (2015) Fixation strategies for retinal immunohistochemistry. *Prog Retin Eye Res*, 48, 181-202.
- Sudo, M., Yamaguchi, Y., Spath, P. J., Matsumoto-Morita, K., Ong, B. K., Shahrizaila, N. & Yuki, N. (2014) Different IVIG glycoforms affect in vitro inhibition of anti-ganglioside antibody-mediated complement deposition. *PLoS One*, 9(9), e107772.

- Sudulagunta, S. R., Sodalagunta, M. B., Sepehrar, M., Khorram, H., Bangalore Raja, S. K., Kothandapani, S., Noroozpour, Z., Aheta Sham, M., Prasad, N., Sunny, S. P., Mohammed, M. D., Gangadharappa, R. & Nidsale Sudarshan, R. (2015) Guillain-Barre syndrome: clinical profile and management. *Ger Med Sci*, 13, Doc16.
- Sun, X. Y., Takagishi, Y., Okabe, E., Chishima, Y., Kanou, Y., Murase, S., Mizumura, K., Inaba, M., Komatsu, Y., Hayashi, Y., Peles, E., Oda, S. & Murata, Y. (2009) A novel Caspr mutation causes the shambling mouse phenotype by disrupting axoglial interactions of myelinated nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(11), 1207-18.
- Susuki, K., Baba, H., Tohyama, K., Kanai, K., Kuwabara, S., Hirata, K., Furukawa, K., Furukawa, K., Rasband, M. N. & Yuki, N. (2007a) Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia*, 55(7), 746-57.
- Susuki, K., Rasband, M. N., Tohyama, K., Koibuchi, K., Okamoto, S., Funakoshi, K., Hirata, K., Baba, H. & Yuki, N. (2007b) Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J Neurosci*, 27(15), 3956-67.
- Susuki, K., Yuki, N., Schafer, D. P., Hirata, K., Zhang, G., Funakoshi, K. & Rasband, M. N. (2012) Dysfunction of nodes of Ranvier: a mechanism for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Exp Neurol*, 233(1), 534-42.
- Taha, O., Opitz, T., Mueller, M., Pitsch, J., Becker, A., Evert, B. O., Beck, H. & Jeub, M. (2017) Neuropathic pain in experimental autoimmune neuritis is associated with altered electrophysiological properties of nociceptive DRG neurons. *Exp Neurol*, 297, 25-35.
- Tait, S., Gunn-Moore, F., Collinson, J. M., Huang, J., Lubetzki, C., Pedraza, L., Sherman, D. L., Colman, D. R. & Brophy, P. J. (2000) An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction. *J Cell Biol*, 150(3), 657-66.
- Takagishi, Y., Katanosaka, K., Mizoguchi, H. & Murata, Y. (2016) Disrupted axon-glia interactions at the paranode in myelinated nerves cause axonal degeneration and neuronal cell death in the aged Caspr mutant mouse shambling. *Neurobiol Aging*, 43, 34-46.
- Talamo, T. S. & Borochoviz, D. (1982) Membranous glomerulonephritis associated with the Guillain-Barre syndrome. *Am J Clin Pathol*, 78(4), 563-6.
- Tao, M. H., Smith, R. I. & Morrison, S. L. (1993) Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J Exp Med*, 178(2), 661-7.
- Thaxton, C., Pillai, A. M., Pribisko, A. L., Dupree, J. L. & Bhat, M. A. (2011) Nodes of Ranvier act as barriers to restrict invasion of flanking paranodal domains in myelinated axons. *Neuron*, 69(2), 244-57.
- Tracy, J. A. & Dyck, P. J. (2011) Auto-immune polyradiculoneuropathy and a novel IgG biomarker in workers exposed to aerosolized porcine brain. *J Peripher Nerv Syst*, 16 Suppl 1, 34-7.

- U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group (1994) A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med*, 331(17), 1110-5.
- Uncini, A. (2012) A common mechanism and a new categorization for anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Exp Neurol*, 235(2), 513-6.
- Uncini, A. & Kuwabara, S. (2012) Electrodiagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome: a critical revision and the need for an update. *Clin Neurophysiol*, 123(8), 1487-95.
- Uncini, A. & Kuwabara, S. (2015) Nodopathies of the peripheral nerve: an emerging concept. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(11), 1186-95.
- Uncini, A., Sabatelli, M., Mignogna, T., Lugaresi, A., Liguori, R. & Montagna, P. (1996) Chronic progressive steroid responsive axonal polyneuropathy: a CIDP variant or a primary axonal disorder? *Muscle Nerve*, 19(3), 365-71.
- Uncini, A., Susuki, K. & Yuki, N. (2013) Nodoparanodopathy: beyond the demyelinating and axonal classification in anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Clin Neurophysiol*, 124(10), 1928-34.
- Vallat, J. M., Nizon, M., Magee, A., Isidor, B., Magy, L., Pereon, Y., Richard, L., Ouvrier, R., Cogne, B., Devaux, J., Zuchner, S. & Mathis, S. (2016) Contactin-Associated Protein 1 (CNTNAP1) Mutations Induce Characteristic Lesions of the Paranodal Region. *J Neuropathol Exp Neurol*, 75(12), 1155-1159.
- Vallat, J. M., Sommer, C. & Magy, L. (2010) Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol*, 9(4), 402-12.
- Vallat, J. M., Yuki, N., Sekiguchi, K., Kokubun, N., Oka, N., Mathis, S., Magy, L., Sherman, D. L., Brophy, P. J. & Devaux, J. J. (2017) Paranodal lesions in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with anti-Neurofascin 155 antibodies. *Neuromuscul Disord*, 27(3), 290-293.
- Valls-Sole, J., Cruz Martinez, A., Graus, F., Saiz, A., Arpa, J. & Grau, J. M. (1995) Abnormal sensory nerve conduction in multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology*, 45(11), 2024-8.
- Van Asseldonk, J. T., Franssen, H., Van den Berg-Vos, R. M., Wokke, J. H. & Van den Berg, L. H. (2005) Multifocal motor neuropathy. *Lancet Neurol*, 4(5), 309-19.
- van den Berg, B., Walgaard, C., Drenthen, J., Fokke, C., Jacobs, B. C. & van Doorn, P. A. (2014) Guillain-Barre syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol*, 10(8), 469-82.

- Van den Bergh, P. Y., Hadden, R. D., Bouche, P., Cornblath, D. R., Hahn, A., Illa, I., Koski, C. L., Leger, J. M., Nobile-Orazio, E., Pollard, J., Sommer, C., van Doorn, P. A. & van Schaik, I. N. (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision. *Eur J Neurol*, 17(3), 356-63.
- van Doorn, P. A., Ruts, L. & Jacobs, B. C. (2008) Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol*, 7(10), 939-50.
- van Meerten, T. & Hagenbeek, A. (2010) CD20-targeted therapy: the next generation of antibodies. *Semin Hematol*, 47(2), 199-210.
- Van Schaik, I. N., Léger, J. M., Nobile-Orazio, E., Cornblath, D. R., Hadden, R. D., Koski, C. L., Pollard, J. D., Sommer, C., Illa, I., Van den Bergh, P. & Van Doorn, P. A. (2010) European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of multifocal motor neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--first revision. *J Peripher Nerv Syst*, 15(4), 295-301.
- van Schaik, I. N., van den Berg, L. H., de Haan, R. & Vermeulen, M. (2005) Intravenous immunoglobulin for multifocal motor neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*(2), Cd004429.
- Vedeler, C. A., Farbu, E. & Mellgren, S. I. (2013) Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Acta Neurol Scand Suppl*(196), 48-51.
- Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, 5, 520, 1-17.
- Vlam, L., Cats, E. A., Harschnitz, O., Jansen, M. D., Piepers, S., Veldink, J. H., Franssen, H., Stork, A. C., Heezius, E., Rooijackers, S. H., Herpers, B. L., van Strijp, J. A., van den Berg, L. H. & van der Pol, W. L. (2015) Complement activity is associated with disease severity in multifocal motor neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2(4), e119.
- Vlam, L., Cats, E. A., Willemsse, E., Franssen, H., Medic, J., Piepers, S., Veldink, J. H., van den Berg, L. H. & van der Pol, W. L. (2014) Pharmacokinetics of intravenous immunoglobulin in multifocal motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85(10), 1145-8.
- Volkmer, H., Zacharias, U., Norenberg, U. & Rathjen, F. G. (1998) Dissection of complex molecular interactions of neurofascin with axonin-1, F11, and tenascin-R, which promote attachment and neurite formation of tectal cells. *J Cell Biol*, 142(4), 1083-93.
- Vucic, S., Kiernan, M. C. & Cornblath, D. R. (2009) Guillain-Barre syndrome: an update. *J Clin Neurosci*, 16(6), 733-41.
- Walport, M. J. (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 344(14), 1058-66.

- Watanabe, O. (2013) [Isaacs's syndrome and associated diseases]. *Rinsho Shinkeigaku*, 53(11), 1067-70.
- Waxman, S. G. & Ritchie, J. M. (1993) Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol*, 33(2), 121-36.
- Willison, H. J. & Veitch, J. (1994) Immunoglobulin subclass distribution and binding characteristics of anti-GQ1b antibodies in Miller Fisher syndrome. *J Neuroimmunol*, 50(2), 159-65.
- Winer, J. B. (2014) An update in guillain-barre syndrome. *Autoimmune Dis*, 2014, 793024, 1-6.
- Witte, A. S. & Burke, J. F. (1987) Membranous glomerulonephritis associated with chronic progressive demyelinating neuropathy. *Neurology*, 37(2), 342-5.
- Yamaguchi, N., Misawa, S., Sato, Y., Nagashima, K., Katayama, K., Sekiguchi, Y., Iwai, Y., Amino, H., Suichi, T., Yokota, T., Nishida, Y., Kohara, N., Hirata, K., Nishiyama, K., Yabe, I., Kaida, K. I., Suzuki, N., Nodera, H., Tsuji, S., Koike, H., Kira, J. I., Hanaoka, H., Kusunoki, S. & Kuwabara, S. (2016) A Prospective, Multicenter, Randomized Phase II Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Eculizumab in Patients with Guillain-Barre Syndrome (GBS): Protocol of Japanese Eculizumab Trial for GBS (JET-GBS). *JMIR Res Protoc*, 5(4), e210.
- Yan, W., Nguyen, T., Yuki, N., Ji, Q., Yiannikas, C., Pollard, J. D. & Mathey, E. K. (2014) Antibodies to neurofascin exacerbate adoptive transfer experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*, 277(1-2), 13-7.
- Yuki, N. & Hartung, H. P. (2012) Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med*, 366(24), 2294-304.
- Yuki, N. & Miyagi, F. (1996) Possible mechanism of intravenous immunoglobulin treatment on anti-GM1 antibody-mediated neuropathies. *J Neurol Sci*, 139(1), 160-2.
- Yuki, N., Susuki, K., Koga, M., Nishimoto, Y., Odaka, M., Hirata, K., Taguchi, K., Miyatake, T., Furukawa, K., Kobata, T. & Yamada, M. (2004) Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31), 11404-9.
- Yuki, N., Taki, T., Inagaki, F., Kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S. & Miyatake, T. (1993) A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med*, 178(5), 1771-5.
- Yuki, N., Watanabe, H., Nakajima, T. & Spath, P. J. (2011) IVIG blocks complement deposition mediated by anti-GM1 antibodies in multifocal motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82(1), 87-91.
- Zen, Y. & Nakanuma, Y. (2011) Pathogenesis of IgG4-related disease. *Curr Opin Rheumatol*, 23(1), 114-8.

Zhang, A., Desmazieres, A., Zonta, B., Melrose, S., Campbell, G., Mahad, D., Li, Q., Sherman, D. L., Reynolds, R. & Brophy, P. J. (2015) Neurofascin 140 is an embryonic neuronal neurofascin isoform that promotes the assembly of the node of Ranvier. *J Neurosci*, 35(5), 2246-54.

Zhang, G., Lopez, P. H., Li, C. Y., Mehta, N. R., Griffin, J. W., Schnaar, R. L. & Sheikh, K. A. (2004) Anti-ganglioside antibody-mediated neuronal cytotoxicity and its protection by intravenous immunoglobulin: implications for immune neuropathies. *Brain*, 127(Pt 5), 1085-100.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Anatomie des Schnürrings, modifiziert nach Stathopoulos et al., 2015 .....	31
Abbildung 2: Molekulare Struktur der Bestandteile des axoglialen Komplexes aus Caspr, Contactin-1 und Neurofascin-155, modifiziert nach Poliak & Peles, 2003 .....	35
Abbildung 3: Aufbau eines Antikörpers der Klasse Immunglobulin G .....	39
Abbildung 4: Aktivierungswege des Komplementsystems.....	43
Abbildung 5: gemeinsame Endstrecke des Komplementsystems .....	44
Abbildung 6: Prinzip des ELISAs .....	64
Abbildung 7: Prinzip des ELISA-basierten Komplementbindungsversuches .....	71
Abbildung 8: Prinzip des HEK-293-Zell-basierten Komplementbindungsversuches ....	80
Abbildung 9: Doppelfärbung mit Anti-Caspr an Zupfnervenpräparaten .....	83
Abbildung 10: Doppelfärbung mit Anti-Neurofascin (NF) an Zupfnervenpräparaten ....	84
Abbildung 11: Einzelfärbungen an Zupfnervenpräparaten mit IgG-subklassenspezifischen Sekundärantikörpern .....	86
Abbildung 12: Streudiagramm Neurofascin-155-IgG-ELISA.....	88
Abbildung 13: Einzelfärbung an Neurofascin-transfizierten HEK-293-Zellen .....	89
Abbildung 14: Doppelfärbung and Neurofascin-transfizierten HEK-293-Zellen .....	90
Abbildung 15: Streudiagramm Contactin-1-IgG-ELISA.....	92
Abbildung 16: Zupfnervenfärbung nach Präinkubation mit Contactin-1 .....	93
Abbildung 17: Einzelfärbung an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen.....	94

Abbildung 18: Doppelfärbung mit Anti-Contactin und humanem Material (Patient 1-4) an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen.....	95
Abbildung 19: Doppelfärbung mit Anti-Contactin und humanem Material (Patient 5-6, Kontrolle) an Contactin-1-transfizierten HEK-293-Zellen.....	96
Abbildung 20: IgG-Subklassen der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4), Verdünnung 1:100 .....	98
Abbildung 21: IgG-Subklassen der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-3) angepasst an den Anti-Contactin-1-Gehalt .....	99
Abbildung 22: ELISA-Verdünnungsreihen zur Bestimmung des Anti-Contactin-1-IgG-Titer zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Patient 3) .....	100
Abbildung 23: ELISA-basierter C1q-KBV .....	102
Abbildung 24: HEK-293-Zell-basierter C1q-KBV (Patient 1-3).....	103
Abbildung 25: C3c-KAV (Patient 1-3).....	104
Abbildung 26: ELISA unter Inkubation von IVIG mit dem Primärantikörper .....	106
Abbildung 27: ELISA unter Inkubation von IVIG nach dem Primärantikörper .....	106
Abbildung 28: Bindung an Contactin-1-transfizierte HEK-293-Zellen unter Zugabe von IVIG (Patient 1).....	107
Abbildung 29: C1q-KBV unter Inkubation von IVIG/BSA mit C1q.....	108
Abbildung 30: C1q-KBV unter Inkubation von IVIG/BSA nach C1q.....	109
Abbildung 31: C3c-KAV unter Inkubation von IVIG/BSA .....	110
Abbildung 32: Einzelfärbung an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen .....	112
Abbildung 33: Doppelfärbung an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen.....	113
Abbildung 34: Subklassenbestimmung an Caspr-transfizierten HEK-293-Zellen.....	115

Abbildung 35: Zupfnervenfärbung nach Präinkubation mit Caspr.....	116
Abbildung 36: HEK-293-Zell-basierter C1q-KBV (Patient 5-6).....	117
Abbildung 37: Bindung an Caspr-transfizierte HEK-293-Zellen im Verlauf (Patient 6)	131
Abbildung 38: Bindung an Caspr-transfizierte HEK-293-Zellen im Verlauf (Patient 5)	144

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: klinisches Bild und Unterscheidungsmerkmale der inflammatorischen Polyneuropathien CIDP, MMN und GBS.....	11
Tabelle 2: Charakteristische Befunde inflammatorischer Polyneuropathien in der Liquordiagnostik, der elektrophysiologischen Diagnostik und in der Histopathologie ..	17
Tabelle 3: INCAT-Diagnosekriterien für CIDP, übersetzt nach Hughes et al., 2001 ....	19
Tabelle 4: Brighton-Diagnosekriterien für GBS I, übersetzt nach Sejvar et al., 2011 ...	19
Tabelle 5: Brighton-Diagnosekriterien für GBS II, übersetzt nach Sejvar et al., 2011 ..	20
Tabelle 6: EFNS-Kriterien für MMN, übersetzt nach van Schaik et al., 2010 .....	22
Tabelle 7: Therapieansprechen bei CIDP, MMN und GBS.....	25
Tabelle 8: Studien zu nodalen und paranodalen axoglialen Autoantikörpern bei inflammatorischen Neuropathien .....	34
Tabelle 9: Eigenschaften der IgG-Subklassen nach Aalberse et al., 2009, Vidarsson et al., 2014, und Hmiel et al., 2015 .....	40
Tabelle 10: Reagenzien und Materialien für die Immunhistochemie und ELISA.....	47
Tabelle 11: Herstellung von Puffern und Lösungen für immunhistochemische Färbungen und ELISA .....	48
Tabelle 12: Antikörper für immunhistochemische Färbungen.....	50
Tabelle 13: Proteine und Antikörper für ELISA und KBV .....	51
Tabelle 14: Reagenzien und Materialien für die Zellkultur .....	52
Tabelle 15: Herstellung von Medien und Puffer für die Zellkultur .....	53
Tabelle 16: verwendete IVIG-Präparate.....	53
Tabelle 17: verwendete Geräte.....	54

Tabelle 18: verwendete Software.....	55
Tabelle 19: klinische Daten der antikörperpositiven Patienten .....	57
Tabelle 20: Anpassung des Anti-Contactin-1-Gehalts für den C1q-KBV .....	67
Tabelle 21: Anpassung des Anti-Contactin-1-Gehalts für den C3c-KAV.....	68
Tabelle 22: Verifizierung der Berechnung für C1q-KBV und C3c-KAV mittels ELISA..	68
Tabelle 23: Gesamt-IgG-Gehalt in Serum und PE-Material (Patient 1-6) .....	87
Tabelle 24: Anti-Contactin-1-IgG-Titer im Serum und PE-Material (Patient 1-4).....	97
Tabelle 25: IgG-Subklassen der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4), angepasst an den Anti-Contactin-1-Gehalt .....	99
Tabelle 26: klinische Daten bei der Erstmanifestation der Erkrankung (Patient 1-6) .	132
Tabelle 27: diagnostische Komplementierung der Anti-Contactin-1-positiven Patienten (Patient 1-4) bei der Rekrutierung an der Neurologischen Klinik des UKW .....	134
Tabelle 28: diagnostische Komplementierung der Anti-Caspr-positiven Patienten bei der Rekrutierung am UKW (Patient 5) und drei Wochen nach Erkrankungsbeginn (Patient 6) .....	135
Tabelle 29: Therapieansprechen (Patient 1-6).....	136
Tabelle 30: klinische und experimentelle Daten im Follow-Up unter Rituximab-Therapie (Patient 2).....	141
Tabelle 31: klinische und experimentelle Daten im Follow-Up unter Rituximab-Therapie (Patient 3).....	143
Tabelle 32: klinische und experimentelle Daten im Follow-Up unter Rituximab-Therapie (Patient 5).....	145

## 10. Abkürzungsverzeichnis

AIDP	akut inflammatorische demyelinisierende Neuropathie
AMAN	akut motorische axonale Neuropathie
AMSAN	akut motorische und sensible axonale Neuropathie
ANA	anti-nukleäre Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
Caspr	contactin associated protein 1
CCPD	combined central and peripheral demyelination
CIDP	chronisch inflammatorische demyelinisierende Neuropathie
CNTN	contactin
DADS	distal erworbene demyelinisierende symmetrische Neuropathie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dl	Deziliter
dmL	distal motorische Latenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFNS	European Federation of Neurological Societies
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMG	Elektromyographie
ENG	Elektroneurographie
Fab	fragment antigen binding
FBS	fetal bovine serum
Fc	crystalisable fragment
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GFP	green fluorescent protein
GLDN	gliomedin
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid
GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositol

HBS	HEPES buffered saline
HEK	human embryonic kidney
HI	Hämophilus influenza
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
INCAT	inflammatory neuropathy cause and treatment
IVIG	intravenöse Immunglobuline
k.A.	keine Angabe
KAV	Komplementaktivierungsversuch
KBV	Komplementbindungsversuch
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KOF	Körperoberfläche
MADSAM	multifokale erworbene demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie
MAG	myelin associated glycoprotein
MEM	minimal essential medium
MFS	Miller-Fisher-Syndrom
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
MMN	multifokale motorische Neuropathie
MRC	Medical Research Council
MS	multiple Sklerose
n.d.	nicht durchgeführt
NF	Neurofascin
NGS	normal goat serum
NIH	National Institute of Health
NLG	Nervenleitungsgeschwindigkeit
NrCAM	neuronal cell adhesion molecule
NRS	numerische Rating-Skala
ODSS	overall disability sum score

ONGW	oberer Normgrenzwert
OT	Objektträger
PBS	phosphate buffered saline
PDL	Poly-D-Lysin
PE	plasma exchange / Plasmapherese
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
RA	Reizantwort
rpm	revolutions per minute
RR	Riva-Rocci / Blutdruck
RT	Raumtemperatur
SAP	Summenaktionspotential
SIDP	subakut inflammatorische demyelinisierende Polyradikulo- neuropathie
SNAP	sensibles Nervenaktionspotential
TE	Tris + EDTA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UKW	Universitätsklinikum Würzburg
UNGW	unterer Normgrenzwert
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

# 11. Anhang

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich in höchstem Maße bei Prof. Dr. Claudia Sommer bedanken für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, für die langjährige hervorragende Betreuung und fachlich exzellenten Ratschläge sowie die positive Unterstützung in allen Belangen.

Ebenso dankbar bin ich meiner Betreuerin Frau PD Dr. Kathrin Doppler, die mich einarbeitete, unter hohem Zeitaufwand intensiv und ausgezeichnet betreute, fachlich elementar zur Qualität dieser Arbeit beitrug, meine Ideen und Arbeit stets wertschätzte, für alle Fragen offen war und mich immer motivierte.

Außerdem möchte ich mich bei den weiteren Mitgliedern meines Promotionskomitees Frau Prof. Carmen Villmann, die zusätzlich Zellen zur Verfügung stellte, die Plasmidpräparation durchführte und die Zweitbegutachtung übernahm, und Herrn Prof. Dr. Andreas Schlosser für die zeitaufwändige Betreuung und fachlichen Anregungen bedanken.

Ich danke des Weiteren allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der neurologischen Klinik und Poliklinik, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, insbesondere Barbara Broll, Barbara Dekant, Susi Hellmig, Katharina Meder, Sonja Mildner und Barbara Reuter für die Einarbeitung, ausgezeichnete technische Unterstützung und die stets große Hilfsbereitschaft, außerdem Frau Melissa Langjahr für die Entnahme und Bereitstellung von Material bereits akquirierter Kontrollpersonen und Patienten.

Ich danke Dr. J. K.M. Ng, Prof. Dr. E. Meini, PhD S. G. Waxman, PhD S. D. Dib-Hajj und Prof. E. Peles für die großzügige Bereitstellung von Arbeitsmaterialien. Teile der Studie wurden über Zuschüsse durch die Firma Kedrion International GmbH finanziert. Ich wurde während meiner Arbeit zeitweise durch ein Promotionsstipendium der medizinischen Fakultät gefördert, wofür ich ebenfalls danken möchte.

Zuletzt richtet sich mein herzlichster Dank besonders an meine Eltern, meine Schwester Laura und meine Freunde, die sich immer für meine Arbeit begeisterten und mich währenddessen stets ermutigten und unterstützten.

## Affidavit / Eidesstattliche Erklärung

I hereby confirm that my thesis with the title “Detection and characterization of auto-antibodies against paranodal proteins in patients with inflammatory polyneuropathy” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, 15.02.2018

---

Luise Appeltshauser

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Detektion und Charakterisierung von Autoantikörpern gegen paranodale Proteine bei Patienten mit inflammatorischer Polyneuropathie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, 15.02.2018

---

Luise Appeltshauser