

# **Autoantibody mediated dysfunction of synaptic transmission in the CNS**

## **Autoantikörper-vermittelte Störungen der synapti- schen Übertragung im ZNS**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Neuroscience

vorgelegt von  
Benedikt Grünewald

aus

Mainz

Würzburg, 2012

**Eingereicht am: 31.5.2012**

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r: Prof. Micheal Sendtner**

**1. Betreuer:** Prof. Claudia Sommer

**2. Betreuer** Prof. Manfred Heckmann

**3. Betreuer:** Prof. Erich Buchner

**Tag des Promotionskolloquiums: .....**

**Doktorurkunden ausgehändigt am: .....**

**Meiner Familie**

## Summary

A growing number of neurological disorders are associated with autoantibodies targeting antigens within the central nervous system. Only in few cases experimental evidence corroborates a pathogenic role of the autoantibodies. Two autoantibody associated diseases were investigated in detail in this work: the Juvenile neuronal ceroid lipofuscinoses (JNCL) with autoantibodies against the 65kD isoform of the glutamate decarboxylase and the Stiff Person Syndrome (SPS) with autoantibodies against amphiphysin.

The analysis of *cln3* knockout mice, an animal model of the JNCL, revealed a phenotype resembling the human disorder, including progressive motor decline, limited cued learning and an increase in anxiety-related behavior. Electrophysiological analysis revealed an autoantibody mediated cerebellar dysfunction, which is best explained by diminished local GABAergic inhibition. A reduction of autoantibody production in the *cln3* knockout mice by depletion of plasma cells after treatment with Bortezomib had a positive effect on the disease outcome.

In the second experimental part, the effect of autoantibodies to amphiphysin from SPS patients on synaptic transmission was analysed. In patch-clamp experiments the GABAergic synaptic transmission was found to be disturbed primarily during high-frequent stimulation. This is in line with the hypothesized defect of synaptic vesicle endocytosis induced by autoantibodies.

Passive transfer of human autoantibodies to rats induced anxiety-related behavior, a key symptom of SPS. The active immunization of mice against amphiphysin and subsequent opening of the blood brain barrier led to subclinical disturbances of the Ia afferent-motor neuron reflex pathway within the spinal cord.

In conclusion, for two CNS disorders autoimmune mechanisms were identified leading to antibody-induced deregulations of central synaptic transmission. These findings may have implication for the research on pathomechanisms of other putative antibody mediated disorders.

## Zusammenfassung

Die Anzahl neurologischer Erkrankungen bei denen Autoantikörper gegen zentralnervöse Antigene bekannt sind, hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Allerdings gibt es nur für wenige dieser Erkrankungen hinreichende experimentelle Belege für eine pathogene Wirkung der Autoantikörper. Zwei dieser Erkrankungen wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht: die Juvenile Neuronale Ceroid-Lipofuszinose (JNCL) mit Autoantikörpern gegen die 65 kD Isoform der Glutamatdecarboxylase und das Stiff Person Syndrom (SPS) mit Autoantikörpern gegen Amphiphysin.

Die phänotypische Charakterisierung der *cln3* knockout-Maus, einem Mausmodell für die JNCL, zeigte eine progressive Verschlechterung der motorischen und koordinativen Fähigkeiten, eingeschränktes reizbedingtes Lernen und gesteigertes angstähnliches Verhalten. Diese Symptome ähneln denen der humanen Erkrankung. Elektrophysiologisch konnte eine Antikörper-induzierte zerebelläre Dysfunktion identifiziert werden, die einer verminderten lokalen GABAergen Hemmung zugeordnet wird. Eine Reduktion der Antikörperproduktion im Tiermodell durch eine Depletion der Plasmazellen durch den Proteaseinhibitor Bortezomib hatte einen positiven Effekt auf die Krankheitsentwicklung.

Im zweiten experimentellen Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Autoantikörpern gegen Amphiphysin von Patienten mit SPS auf die synaptische Transmission untersucht. Es zeigte sich hierbei in Patch-Clamp Experimenten eine Störung der GABAergen Übertragung v.a. bei hochfrequenter Stimulation, was im Einklang mit dem vermuteten Antikörper-induzierten Endozytosedefekt steht.

Passiver Transfer von humanen Autoantikörpern gegen Amphiphysin induzierte angstähnliches Verhalten in Ratten, einem weiteren Kernsymptom des SPS. Aktive Immunisierung gegen Amphiphysin und anschließende Öffnung der Blut-Hirn-Schranke in Mäusen führte zu einer subklinischen Veränderung der Reflexverarbeitung von Ia Afferenzen auf Motoneurone im Rückenmark der Mäuse.

Insgesamt konnten in zwei Erkrankungen des ZNS autoimmune Mechanismen identifiziert werden, die zu einer Antikörper-induzierten Fehlregulation der zentralen synaptischen Transmission führen. Diese Ergebnisse können wegweisend sein auch für die Erforschung der Pathophysiologie anderer Antikörper-assoziierte Erkrankungen des ZNS.

## Inhaltsverzeichnis

Summary	I
Zusammenfassung	II
Inhaltsverzeichnis	III
<b>1. Einleitung und theoretische Grundlagen</b>	<b>1</b>
1.1. Autoantikörper-vermittelte Erkrankungen des ZNS .....	1
Pathogenetische Wirkung der assoziierten AAK im ZNS .....	2
1.2. Juvenile Neuronale Zeroid-Lipofuszinose (Batten disease) .....	3
Die Neuronalen Zeroid-Lipofuszinosen.....	3
JNCL, <i>CLN3</i> -Gen und Neurobiologie.....	4
Autoimmune Mechanismen in der JNCL.....	6
1.3. Stiff Person-Syndrom.....	7
Das Stiff Person-Syndrom (SPS) .....	7
Amphiphysin, Endozytose und Stiff Person-Syndrom .....	8
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1. Tiere, Versuchsgruppen, Behandlung .....	12
Tiere und experimentelle Gruppen.....	12
Narkose und Behandlung.....	13
Gewebe-und Blutentnahme.....	15
2.2. Verhaltenstests.....	16
Motorische Testung .....	16
Testung auf angsthähnliches Verhalten und konditioniertes Lernen.....	17
	III

2.3. Elektrophysiologische Messungen .....	19
In-Vivo Elektrophysiologie .....	19
In-vitro Elektrophysiologie .....	21
2.4. Histologie .....	23
2.5. Molekularbiologische Methoden .....	24
2.6. Durchflusszytometrie .....	24
2.7. Statistische Analyse .....	25
3. Ergebnisse A: autoimmune Mechanismen bei CLN3 <sup>-/-</sup> Mäusen	26
3.1. Angstähnliches Verhalten und Lerndefizite der cln3 <sup>-/-</sup> -Maus.....	26
Screening auf angstähnliches Verhalten mittels Petrischalentest .....	26
Gesteigertes angstähnliches Verhalten im Open Field Test .....	27
Gesteigertes angstähnliches Verhalten im Elevated Plus Maze Test .....	27
Reduziertes aversives Lernen der cln3 <sup>-/-</sup> -Maus.....	28
3.2. Motorische Defizite in cln3 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	29
Keine Veränderungen bei der Fußabdruckanalyse bei Cln3 <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	30
Progressive Beeinträchtigung der RotaRod-Leistungen in cln3 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	30
Koordinative Beeinträchtigungen im Klettertest.....	30
cln3 <sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen eine reduzierte Gesamtstrecke bei ungezwungener Bewegung .....	30
3.3. Normale spinale GABAerge Hemmung in der cln3 <sup>-/-</sup> -Maus .....	31
Nachweis von Antikörperbindung, aber unveränderte Interneuronpopulation im Rückenmark .....	32

Normale frequenzabhängige Depression des Hofmann-Reflex .....	32
Unveränderte GABAerge Hinterwurzelpotentiale in der $cln3^{-/-}$ -Maus.....	33
3.4. Analyse des Purkinje-Zell Feuerverhaltens .....	34
3.5. Bortezomib-induzierte Plasmazelldepletion führt zu verminderter IgG-Deposition im ZNS und zu motorischen Verbesserungen in der $cln3^{-/-}$ -Maus .....	37
4. Ergebnisse B: Experimente mit AAK gegen Amphiphysin .....	39
4.1. AAK gegen Amphiphysin beeinträchtigen die GABAerge synaptische Übertragung.....	39
Normale inhibitorische postsynaptische Miniaturströme nach Amph-AAK-Inkubation .....	39
Unveränderte spontane und evozierte IPSC nach Amph-AAK-Inkubation.....	40
Amph-AAK haben keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität bei geringer Aktivität .	40
Amph-AAK-induzierte Störung der synaptischen Transmission bei erhöhter Aktivität .....	42
4.2. Passiver Transfer von humanen Amphiphysin-AAK in Ratten induziert ängstähnliches Verhalten.....	42
Amph-AAK können ängstähnliches Verhalten in Ratten induzieren .....	43
4.3. Aktive Immunisierung gegen Amphiphysin induziert subklinische Symptome in Mäusen.....	45
Erfolgreiche Immunisierung von Ratten und Mäusen gegen humanes Amphiphysin .....	45
Subklinische Symptome in immunisierten Mäusen.....	46
Starke Nebenwirkung der milden EAE zur BHS-Öffnung bei Ratten .....	47
5. Diskussion .....	48



5.1. Diskussion der Experimente mit $cln3^{-/-}$ -Mäusen .....	48
Angstähnliches Verhalten in der $cln3^{-/-}$ -Maus .....	48
Motorische Defizite und elektrophysiologische Untersuchungen .....	50
Hinweise auf autoimmun-vermittelte Pathomechanismen in der $cln3^{-/-}$ -Maus .....	51
GAD65-AAK bei JNCL und anderen Erkrankungen.....	53
5.2. Diskussion der Experimente mit Autoantikörpern gegen Amphiphysin beim Stiff Person Syndrom .....	54
Amphiphysin-AAK beeinträchtigen die Vesikelendozytose.....	54
Passiver Transfer von Amph-AAK induziert angstähnliches Verhalten .....	55
Aktive Immunisierung gegen Amphiphysin induziert eine Immunantwort und vermindert die Suppression des H-Reflex.....	56
Referenzen .....	58
Appendix A: Abbildungsverzeichnis .....	68
Appendix B: Tabellenverzeichnis .....	69
Appendix C: Abkürzungsverzeichnis .....	70
Affidavit & eidesstattliche Erklärung .....	72
Danksagung/Acknowledgements .....	73
Publikationsliste .....	74

# 1. Einleitung und theoretische Grundlagen

## 1.1. Autoantikörper-vermittelte Erkrankungen des ZNS

Im Gegensatz zu Autoantikörper-vermittelten Erkrankungen des peripheren Nervensystems (PNS), die bereits seit Jahrzehnten bekannt sind (Toyka et al., 1975; Lang et al., 1981) gerieten Autoantikörper-assoziierte Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) erst in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus sowohl der klinischen als auch der Grundlagenwissenschaft (McKnight *et al.*, 2005). Bereits in den 1980er Jahren wurden mit der Entdeckung von Autoantikörpern (AAK) gegen Hu und Yo (Greenlee and Brashear, 1983; Graus et al., 1985) bei paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen und AAK gegen die 65 kD-Isoform der Glutamatdecarboxylase (GAD65) beim Stiff Person-Syndrom (SPS) (Solimena *et al.*, 1988) erstmals AAK beschrieben, die zentrale neuronale Antigene zum Ziel hatten. Da die Zielstrukturen dieser AAK vornehmlich intrazellulär lokalisiert sind, wurden diese AAK zunächst vor allem als diagnostische Marker eingestuft. Ob sie eine pathogene Rolle spielen oder ein Epiphenomen darstellen, war über lange Zeit ungeklärt bzw. ist weiterhin Gegenstand kontroverser wissenschaftlicher Diskussion.

AAK assoziierte Erkrankungen müssen neben dem reinen Auftreten von AAK zusätzlich die auch als Witebsky-Postulate bekannten Kriterien (Witebsky et al., 1957; Rose and Bona, 1993) erfüllen, um als Autoimmunerkrankung mit einer pathogenen Wirkung der AAK kategorisiert zu werden. Das korrespondierende Antigen muss identifiziert sein, und eine analoge Immunreaktion im Versuchstier, entweder durch passiven Transfer der humanen Antikörper oder aktive Immunisierung gegen das Antigen, muss der humanen Erkrankung ähnliche Symptome induzieren. Außerdem sollte eine immunmodulatorische Behandlung mit Reduktion der AK-Titer zu einer Besserung der Symptome führen. Zusätzlich sollten pharmakologische oder genetische Manipulationen des Antigens zu ähnlichen funktionellen, zellulären und systemischen Veränderungen führen. Prinzipiell sind zwei Wege unterscheidbar, wie AAK eine Erkrankung verursachen bzw. aggravieren können. Eine direkte pharmakologische Wirkung beruht auf der Veränderung oder Einschränkung der Funktion des Antigens bzw. der Veränderung der Menge des Zielproteins nach Bindung der AAK (Vincent, 2010). Alternativ oder zusätzlich ist es auch möglich, dass die AAK eine weitere Immunreaktion anregen, beispielsweise durch die Aktivierung des Komplementsystems oder durch zellvermittelte Toxizität, und so letztlich eine Entzündung hervorrufen, wie z.B. bei der Neuromyelitis optica (Bennett et al., 2009; Bradl et al., 2009).

Unabhängig von der Erforschung der möglichen pathogenen Wirkung der AAK wurden in den vergangenen Jahren bei verschiedenen Erkrankungen AAK gegen weitere zentrale neuronale Antige-

ne beschrieben, beispielsweise gegen die Glutamatrezeptor Untereinheit 3 bei der Rasmussen Enzephalitis (Rogers et al., 1994), gegen Aquaporin-4 bei der Neuromyelitis optica (Lennon et al., 2005), gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle bei zerebellärer Ataxie (Liao et al., 2008) und gegen das Leucin-reiche, glioma inactivated Protein 1 (LGI1) und CASPR2 (Irani et al., 2010; Lai et al., 2010), N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (Dalmau et al., 2008),  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA) Rezeptoren (Lai et al., 2009) und GABA-B Rezeptoren (Lancaster et al., 2010) bei der limbischen Enzephalitis. Überblicke über die stetig wachsende Anzahl identifizierter Antigene bei unterschiedlichen AAK-assoziierten ZNS Erkrankungen sind in verschiedenen Übersichtsartikeln veröffentlicht (Lang et al., 2003; Irani and Lang, 2008; Vincent, 2010).

### **Pathogenetische Wirkung der assoziierten AAK im ZNS**

Im Gegensatz zu den AAK-vermittelten Erkrankungen des PNS, wie z.B. die Myasthenia gravis oder das Lambert-Eaton myasthene Syndrom (Toyka et al., 1975; Lang et al., 1981), ist der Nachweis einer AAK-vermittelten Pathogenese bei zentralnervösen Erkrankungen schwieriger, da eine intakte Blut-Hirn-Schranke (BHS) die experimentelle Beweisführung erschwert. Zum einen verhindert bzw. verlangsamt sie die Wirkung von immunomodulatorischen Behandlungen, so dass eine Assoziation zwischen der Senkung des Antikörpertiters und der Besserung der Symptome schwierig ist. Zum anderen erschwert die BHS den Zugang systemisch produzierter bzw. applizierter AAK zu den entsprechenden Antigenen im ZNS, so dass eine Induktion der Krankheiten in entsprechenden Tiermodellen wesentlich aufwändiger und experimentell anspruchsvoll ist.

Trotz dieser Problematik konnten bei einer Reihe von Erkrankungen experimentelle Hinweise auf einen AAK-vermittelten Pathomechanismus gefunden werden. Vor allem bei Synaptopathien mit AAK gegen membranständige Rezeptoren und Kanäle, bzw. mit assoziierten Proteinen, konnten in den letzten Jahren pathophysiologisch relevante Beobachtungen gemacht werden. Es wurden erste Hinweise auf eine immunpharmakologische Wirkung von AAK gegen verschiedene Untereinheiten (UE) des NMDA-Rezeptors (DeGiorgio et al., 2001; Kowal et al., 2006; Dalmau et al., 2008) und gegen UE des Glutamatrezeptor vom AMPA Typ (Lai et al., 2009) gefunden.

Für AAK, die sich gegen ein intrazelluläres Antigen richten, gibt es weit weniger gesicherte Erkenntnisse hinsichtlich ihrer möglichen pathogenen Wirkung. Allgemein anerkannte Ansicht war, dass die entsprechenden AAK zwar gute Marker für die Erkrankungen darstellen, aber aufgrund der intrazellulären Lage der Antigene keine kausale Rolle in der Entstehung der neurologischen Erkrankung spielen können. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir allerdings erstmals für die mit SPS assoziierten AAK gegen Amphiphysin (Amph) direkte Hinweise auf einen AAK-vermittelten Pathomechanismus aufdecken, da durch den passiven Transfer von humanen AAK einer SPS Patientin mit hohem Anteil an AAK gegen Amphiphysin in Ratten typische Krankheitssymptome ausgelöst werden konnten

(Sommer et al., 2005). Aus diesem Experiment ergaben sich weitere wichtige Fragen: zunächst war die Spezifität der AK Wirkung zu untersuchen, da bei den Experimenten die komplette IgG-Fraktion der Patientin verwendet wurde. Des Weiteren war die genaue molekulare Wirkungsweise der AK unklar. Eine prinzipielle Frage ist, ob nur diese AAK, oder auch andere AK intrazelluläre Antigene erreichen können, bzw. welche Voraussetzungen eine Zelle oder das Antigen haben muss, die es AAK erlauben auch an intrazelluläre Antigene zu binden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Frage der pathophysiologischen Wirksamkeit von AAK an zwei konkreten Modellerkrankungen des ZNS mit assoziierten AAK zu untersuchen und ggf. zugrunde liegende Krankheitsmechanismen aufzudecken. Hierzu sollte zum einen ein genetisches Mausmodell für die Juvenile Neuronale Zeroid-Lipofuszinose (JNCL) untersucht werden. Zum anderen wurden pathophysiologische Mechanismen von AAK gegen Amphiphysin, die mit der paraneoplastischen Variante des SPS vergesellschaftet sind, sowohl im Tierversuch als auch in-vitro untersucht.

## 1.2. Juvenile Neuronale Zeroid-Lipofuszinose (Batten disease)

### Die Neuronalen Zeroid-Lipofuszinosen

Die Juvenile Neuronale Zeroid-Lipofuszinose (JNCL, auch Batten Disease oder Vogt-Spielmeyer-Stock-Krankheit) ist eine erbliche autosomal-rezessive, primär neurodegenerative Erkrankung aus der Gruppe der Neuronalen Zeroid-Lipofuszinosen (NCL) (Haltia, 2003). Die unter den NCL zusammengefassten Erkrankungen sind zusammen die weltweit häufigsten erblichen, progressiven, neurodegenerativen Erkrankungen im Kindesalter mit einer Inzidenz von 1:25000 bei Lebendgeborenen in Skandinavien und den USA und von etwa 1:100000 weltweit (Jalanko and Brulke, 2009). Aufgrund des Alters beim Auftreten der ersten Symptome wurden die NCL in vier Hauptformen unterteilt: Infantile (INCL), Spät-infantile (LINCL), Juvenile (JNCL) und Adulte (ANCL) NCL. Diese Unterteilung wurde durch die Identifizierung von 8 krankheitsauslösenden Genloci (CLN1, CLN2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN7, CLN8 and CLN10) weiter verfeinert, wobei derzeit insgesamt über 360 Mutationen bekannt sind (Kousi et al., 2012). Aktuell unterscheidet man 10 Formen der NCL und eine NCL-ähnliche Erkrankung, die durch Mutationen im *CLCN7*-Gen ausgelöst wird (Tabelle 1). Klinisch sind die infantilen und juvenilen NCL-Formen durch zur Blindheit führende Retinopathie, mentale Retardierung, Demenz, motorische Störungen, Epilepsie, psychiatrische Auffälligkeiten und frühzeitigen Tod bestimmt. Bei den seltenen adulten Formen ist Demenz das bestimmende Symptom. Psychiatrische Auffälligkeiten, wie z.B. eine gesteigerte Ängstlichkeit werden häufig unterbewertet, da aufgrund der kognitiven Einschränkung der Patienten eine direkte Beurteilung nur eingeschränkt möglich ist (Bäckman et al., 2001; Bäckman et al., 2005; Adams et al., 2007).

Gen	NCL-Form	Protein
CLN1	Infantile, auch spät-infantile, juvenile und adulte Form	PPT1, Palmitoyl-protein thioesterase 1, lysosomales Enzym
CLN2	Spät-infantile, juvenile Form	TPP1, Tripeptidylpeptidase 1, lysosomales Enzym
CLN3	Juvenile Form	CLN3, Lysosomales Transmembranprotein
CLN4	Adulte Form	Unbekannt
CLN5	Finnische spät-infantile Variante	CLN5, lösliches lysosomales Protein
CLN6	Spät-infantile Form	CLN6, Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums (ER)
CLN7 (MFSD8)	Türkische spät-infantile Variante	MFS8, lysosomales Transmembranprotein
CLN8	Spät-infantile Form (Nordische Epilepsie)	CLN8, Transmembranprotein des ER
CLN9 (nicht identifiziert)	Juvenile Form	Unbekannt
CLN10 (CTSD)	Kongenital, spät-infantile Form	CTSD, Cathepsin D, lysosomales Protein
CLCN7	Infantile Osteopetrose und ZNS-degeneration	CLC7, Lysosomaler Chloridkanal 7

**Tabelle 1: Die verschiedenen Formen der NCL.**

Die Zahl der unterschiedenen NCL-Varianten variiert zwischen 8 und 10. 9 unterschiedliche krankheitsauslösende Gene sind identifiziert worden und 8 entsprechende Proteine. (Adaptiert von Jalanko and Braulke, 2009)

Bei allen NCL-Formen können autofluoreszierende, elektronendichte, lysosomale Einschlüsse nachgewiesen werden, aufgrund derer die NCL auch als lysosomale Speicherkrankungen eingeteilt werden. Interessanterweise scheinen aber in allen NCL-Form vor allem neuronale Zellen vulnerabel zu sein, obwohl die lysosomalen Ablagerungen in allen Zellen des Körpers gefunden werden können (Kyttala *et al.*, 2006). Infolge dessen kommt es zu einem Verlust neuronaler Zellen und einer Gehirnatrophie, die je nach NCL-Form unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Cooper, 2003; Haltia, 2003; Mitchison *et al.*, 2004).

Die genaue Funktion der Proteinprodukte der unterschiedlichen krankheitsauslösenden Gene ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung und noch nicht abschließend geklärt. Auch die Frage ob mögliche Interaktionen der unterschiedlichen NCL-Proteine in einem gemeinsamen Weg enden oder ob unterschiedliche molekulare Fehlfunktionen zu ähnlichen zellularen Dysfunktionen führen könnten, hat noch keine abschließende Klärung gefunden (Kyttala *et al.*, 2006; Persaud-Sawin *et al.*, 2007; Jalanko and Braulke, 2009; Lyly *et al.*, 2009; Getty and Pearce, 2011).

### JNCL, CLN3-Gen und Neurobiologie

Die JNCL ist die häufigste Form der NCL (7 von 10000 Lebendgeborene in Skandinavien). Beginnend mit zunehmendem Sehverlust im Alter von 4-8 Jahren, gefolgt von Krampfanfällen und Verlust von

kognitiven und motorischen Fähigkeiten ab dem 10. Lebensjahr, hat diese Erkrankung eine infauste Prognose und führt zum Tod der Betroffenen in der 3. oder 4. Lebensdekade (Haltia, 2006; Aberg *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2011). Auslösend sind Mutationen in dem auf Chromosom 16 liegendem *CLN3*-Gen (Gardiner *et al.*, 1990; TIBDC, 1995), das evolutionär stark konserviert ist. Das Gen codiert für ein hydrophobes Protein (CLN3P) mit 6 Transmembrandomänen (Mao *et al.*, 2003b), das in Neuronen vor allem in lysosomalen und endosomalen Strukturen lokalisiert ist, aber auch in Synaptosomen und in sogenannten Membran-lipid-rafts nachgewiesen wurde (Mao *et al.*, 2003a; Kytölä *et al.*, 2004; Persaud-Sawin *et al.*, 2004; Rakheja *et al.*, 2004; Kytölä *et al.*, 2005; Storch *et al.*, 2007). Im Gehirn scheint es vor allem in visuellen, limbischen und subkortikalen motorischen Strukturen exprimiert zu werden (Ding *et al.*, 2011). Die Funktion des CLN3P ist noch nicht vollständig verstanden. Neben der Aufrechterhaltung des lysosomalen pH (Holopainen *et al.*, 2001), dem lysosomalen Arginintransport (Ramirez-Montealegre and Pearce, 2005), dem Membrantrafficking, der Zytoskelettorganisation (Rakheja *et al.*, 2004), der BMP-Synthese und der Funktion als Palmitoylprotein D-9 Desaturase (Narayan *et al.*, 2006; Hobert and Dawson, 2007) sind vielfältige Interaktionen beschreiben, beispielweise mit dem Notch/JNK-Signalweg (Tuxworth *et al.*, 2009) oder Hook1 und Rab-Proteinen (Luiro *et al.*, 2004). Welche dieser Funktionen biologisch signifikant sind und warum ihre Dysfunktionen die Erkrankung bedingen ist aber noch ungeklärt (Übersichtsartikel: (Haltia, 2003; Kytölä *et al.*, 2006; Rakheja *et al.*, 2008; Jalanko and Braulke, 2009)).

Für die Erforschung der Proteinfunktionen aber auch der Neurobiologie der JNCL, stehen eine Reihe von Krankheitsmodellen zur Verfügung. Vor allem die unterschiedlichen transgenen Mausmodelle haben sich in den letzten Jahren als nützlich erwiesen (Ding *et al.*, 2011), da sich die Kernsymptome und pathologischen morphologischen und biochemischen Befunde der JNCL in diesen Mäusen reproduzieren ließen. Neben zwei Mausmodellen, in denen Exon 7 und 8 deletiert wurden, um die häufigste humane Mutation zu imitieren (Katz *et al.*, 1999; Cotman *et al.*, 2002), gibt es eine klassische Knockoutmaus, in der das Gen annähernd vollständig fehlt (Mitchison *et al.*, 1999) und eine Maus, in der der codierende Bereich des *CLN3*-Gens weitestgehend durch die als Reportergen dienende  $\beta$ -Galaktosidase ersetzt wurde (Eliason *et al.*, 2007). Phenotypisch zeigen alle Mausmodelle der JNCL vergleichbare Symptome, wenn sich auch der Zeitpunkt des ersten Auftretens und der Schweregrad unterscheidet. Neben dem neuronalen Zellverlust in verschiedenen Gehirnarealen, einer schwachen Gliaaktivierung (Pontikis *et al.*, 2004) und einem unspezifischen Entzündungsgeschehen (Brooks *et al.*, 2003) kommt es in den Mäusen auch zu Dysregulationen des Immunsystems mit Bildung von AAK, wie sie für die JNCL-Patienten beschreiben sind (Cooper *et al.*, 2006).

## Autoimmune Mechanismen in der JNCL

JNCL-Patienten zeigen eine ausgeprägte Autoimmunreaktivität mit AAK gegen neuronale Antigene. Identifiziert wurden GAD65 und  $\alpha$ -Fetoprotein, wobei die Färbemuster humaner Patientenserum den Schluss nahe legen, dass noch weitere AAK gegen multiple Antigene vorhanden sind (Chattopadhyay et al., 2002b; Chattopadhyay et al., 2002a; Ramirez-Montealegre et al., 2005a; Lim et al., 2006; Lim et al., 2007; Castaneda and Pearce, 2008).

Die beiden GAD-Isoformen, GAD65 und GAD67, katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Synthese von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter des Säuger-ZNS. GAD65 scheint außerdem auch am vesikulären GABA-Transport beteiligt zu sein (Jin et al., 2003). Während GAD67 den Großteil der Synthese von GABA übernimmt (Asada et al., 1997), ist GAD65 nur für einen kleinen Teil der Gesamtmenge an GABA im ZNS verantwortlich, nämlich dem präsynaptisch produziertem GABA (Asada et al., 1996). Eine genetische Depletion von GAD65 hat dennoch profunde Auswirkungen auf die GABAerge Transmission (Tian et al., 1999) und auf das Verhalten von entsprechenden Versuchstieren (Kash et al., 1999; Stork et al., 2003; Sangha et al., 2009). Die Funktion von  $\alpha$ -Fetoprotein im ZNS ist hingegen weniger genau verstanden, es scheint vor allem für die normale, pre- und postnatale Entwicklung des Gehirns wichtig zu sein (Mizejewski, 2003; Bakker et al., 2006). Ob AAK gegen  $\alpha$ -Fetoprotein eine pathogene Rolle spielen und/oder die Missregulation der Expression des Proteins zum Krankheitsgeschehen beiträgt bleibt aber spekulativ (Castaneda and Pearce, 2008).

Bei JNCL-Patienten und in den Mausmodellen finden sich krankhafte Veränderungen, für die eine pathogene Wirkung von GAD65-AAK eine plausible Erklärung sein könnte. So findet man eine um 33% reduzierte GAD-Aktivität in Gehirnextrakten von  $cln3^{-/-}$ -Mäusen, bei allerdings unveränderter Expression des Enzyms (Chattopadhyay et al., 2002c). Zudem findet man in den gleichen Extrakten einen um 70% erhöhten Spiegel an Glutamat, dem Substrat des GAD65-Enzyms. Die Inkubation von Gehirnextrakten normaler Mäuse mit Serum von  $cln3^{-/-}$  Mäusen senkt die GAD65-Aktivität um bis zu 45% (Chattopadhyay et al., 2002c). Entsprechende Veränderungen im Gehalt von Glutamat und GABA konnten im Mausmodell schon ab dem ersten Lebensmonat nachgewiesen werden (Pears et al., 2005). Etwas widersprüchlich sind die histopathologischen Befunde aus verschiedenen Mausmodellen. In einem Modell (Mitchison et al., 1999) scheinen primär bestimmte Subpopulationen GABA-erger Interneurone neurodegenerativen Prozessen zu unterliegen, wofür die spekulative Wirkung von anti-GAD65-AAK eine elegante Erklärung sein könnte (Pontikis et al., 2004). In der sogenannten  $Cln3^{\Delta Ex7/8}$ -Maus (Cotman et al., 2002) konnten hingegen keine pathologischen Veränderungen der GABAergen Systeme gefunden werden (Herrmann et al., 2008). Gegen die Hypothese, dass anti-GAD65-IgG einen kausale Rolle bei JNCL Patienten spielen, spricht eine Untersuchung zu der Bindung der Autoantikörper an GAD65 Protein (Ramirez-Montealegre et al., 2005b). Die Daten dieser Studie

legen nahe, dass die anti-GAD65-AAK aus dem Serum von JNCL Patienten primär das linearisierte Antigen im Western Blot (WB) erkennen, es sich also um ein kryptisches Epitop handeln könnte. Daraus könnte man schließen, dass die AAK im lebenden Organismus ihr Antigen gar nicht binden, so dass es sich bei den anti-GAD65-AAK bei der JNCL um ein Epiphenomen handeln könnte.

Auch wenn all diese Zusammenhänge bislang ungeklärt sind, sprechen die überwiegenden Befunde dafür, dass allgemeine Autoimmunreaktionen bei der Entstehung der JNCL eine Rolle spielen. In ZNS-Gewebe humaner Patienten und der  $cln3^{-/-}$ -Maus konnten IgG-Ablagerungen gezeigt werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass im Mausmodell eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke für AAK vorhanden ist (Lim et al., 2007). In der gleichen Arbeit konnte zudem eine Infiltration des ZNS durch Lymphozyten gezeigt werden. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass immunsuppressive Behandlungen einen positiven Effekt auf die Entwicklung der JNCL-Erkrankung haben. Im Mausmodell hatte die Reduktion der IgG-Produktion, sowohl genetisch durch Kreuzung mit einem B-Zell defizienten Mausstamm ( $\mu$ MT Maus, (Kitamura et al., 1991)) als auch durch Behandlung mit Mycophenolat Mofetil, einen positiven Effekt auf die Entwicklung der JNCL-typischen Symptome in der Maus (Seehafer et al., 2011). Die immunsuppressive Behandlung einer kleinen Gruppe von Patienten mit Prednisolon scheint eine Reduktion an GAD65-AAK zu bewirken und zumindest leichte positive Effekte auf die motorischen und kognitiven Fähigkeiten zu haben. (Aberg et al., 2008).

### 1.3. Stiff Person-Syndrom

#### Das Stiff Person-Syndrom (SPS)

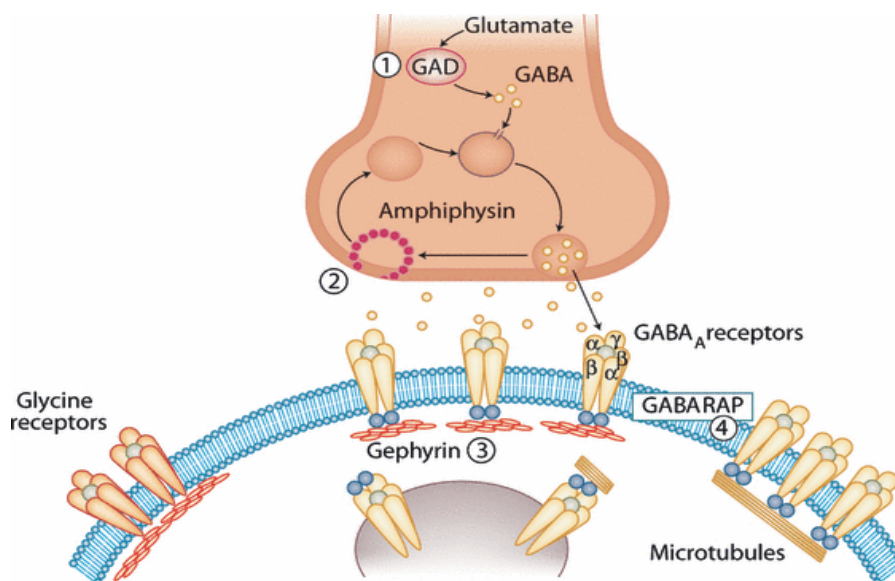
Das SPS ist eine seltene neurologische Erkrankung, die durch eine generalisierte Tonuserhöhung der Skelettmuskulatur und einschießende, schmerzhafte Spasmen gekennzeichnet ist. Zusätzlich können auch nicht-motorische Symptome wie gesteigerte Ängstlichkeit, Panikattacken, Agoraphobie und Depression bei den Patienten auftreten (Henningsen et al., 1996). Das SPS ist in den meisten Fällen eine idiopathische Erkrankung, kann aber auch paraneoplastisch vorliegen, dann zumeist in Folge von kleinzelligem Lungen- oder Brustkrebs. Bis zu 46% Prozent der SPS-Patienten entwickeln einen Diabetes mellitus vom Typ 1, außerdem können Hashimoto-Thyreoiditis, Morbus Basedow, perniziöse Anämie, Zöliakie und Vitiligo mit der SPS-Erkrankung assoziiert sein (Alexopoulos and Dalakas, 2010).

Sowohl in der idiopathischen, als auch in der paraneoplastischen Form treten AAK gegen neuronale Antigene auf (Holmoy and Geis, 2011). Die meisten von der idiopathischen Form betroffenen Patienten bilden AAK gegen GAD65 und/oder das GABA(A)-Rezeptor-assoziierte-Protein (GABARAP) (Solimena et al., 1988; Solimena et al., 1990; Raju et al., 2006). Antikörper gegen Amphiphysin 1 treten vorwiegend bei dem paraneoplastischen SPS auf (De Camilli et al., 1993; Butler et al., 2000), AAK gegen Gephyrin sind bislang lediglich in einem Fall beschrieben. Daneben kommen bei SPS-Patienten



zusätzlich weitere AAK gehäuft vor, die nicht zwingend mit dem SPS in Zusammenhang stehen, beispielsweise AAK gegen Kernproteine, Thyroid, Ribonucleoproteine oder Gliadin (Dalakas et al., 2000).

Wie oben ausführlich beschrieben, ist GAD65 das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der GABA-Synthese und vor allem für die Synthese von vesikulärem GABA in Synapsen verantwortlich. Amphiphysin ist ein präsynaptisches, vesikelassoziertes Protein, dass vornehmlich an der Clathrin-vermittelten Endozytose (CVE) beteiligt ist (Wigge and McMahon, 1998). GABARAP ist ein zytosolisches Protein, dass über Interaktionen mit Gephyrin an dem Einbau und der Positionierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>R) in die Postsynapse beteiligt zu sein scheint (Chen et al., 2000). GABARAP scheint für diese Prozesse aber nicht essentiell, da in GABARAP-knockout Mäusen die synaptische Lokalisation der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren nicht abnorm ist (O'Sullivan et al., 2005). Gephyrin ist ebenfalls ein zytosolisches Protein und ist an der korrekten Positionierung von GABA<sub>A</sub>- und Glycinrezeptoren in der postsynaptischen Membran beteiligt (Kirsch et al., 1993; Essrich et al., 1998). All diesen Antigenen ist die synaptische Lokalisation gemein und ein Funktionsverlust ist plausibel mit den SPS-typischen Symptomen vereinbar (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Lokalisation und Funktion der SPS-Antigenen.**

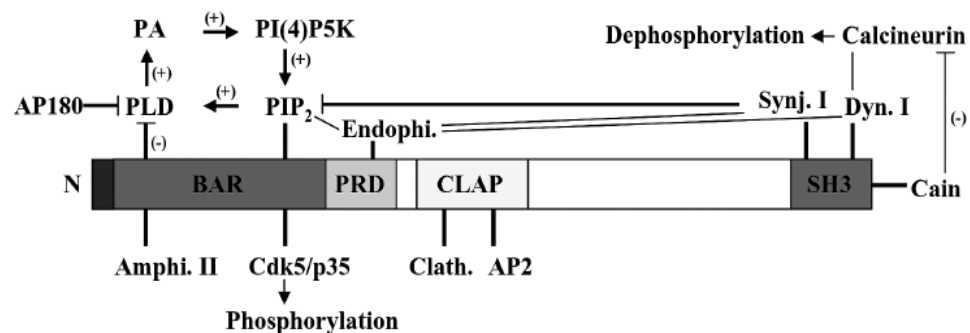
1. GAD65 liegt präsynaptisch in den Terminalen GABAerger Neurone vor und katalysiert die GABA-Synthese. 2. Amphiphysin ist ein präsynaptisches Protein, das bei hoher Aktivität für die CVE essentiell ist. 3. Gephyrin liegt postsynaptisch assoziiert mit GABA<sub>A</sub>R und Glycinrezeptoren vor und ist an deren korrekter Positionierung in der Synapse verantwortlich. 4. GABARAP liegt postsynaptisch assoziiert mit GABA<sub>A</sub>R vor und ist an deren Clustering beteiligt, aber nicht essentiell für deren Einbau in die postsynaptische Membran (adaptiert von Alexopoulos und Dalakas, 2010)

### Amphiphysin, Endozytose und Stiff Person-Syndrom

Amphiphysin ist ein 128 kD schweres Protein, das evolutionär stark konserviert ist. Bei Säugern existieren zwei Isoformen, Amphiphysin 1 (das Antigen bei SPS Patienten) wird vor allem im Gehirn ex-

primiert, während Amphiphysin 2, auch als Bin 1 bezeichnet, häufig alternativ gespleißt wird und ein ubiquitäres Expressionsmuster aufweist (Di Paolo et al., 2002). In den neuronalen Terminalen bilden Amphiphysin 1 und 2 Heterodimere, die in der präsynaptischen Matrix und in verschiedenen Zwischenstadien der Clathrin-ummantelten Vesikel zu finden sind (Bauerfeind et al., 1997; Ramjaun et al., 1997; Wigge et al., 1997).

Amphiphysin selbst hat mehrere funktionell wichtige Domänen (vom N-terminus): 1. eine  $\alpha$ -Helix, 2. eine N-Bin-Amphiphysin-Rvs-(BAR)-Domäne, 3. eine prolinreiche Domäne (PRD), 4. eine Clathrin- und AP2-Bindungsdomäne (CLAP), 5. eine C-terminal liegende Src-homologe Domäne 3 (SH3) (Wu et al., 2009). Über diese unterschiedlichen Domänen interagiert Amphiphysin mit einer Reihe von Proteinen (Abbildung 1.2), wodurch es von Bedeutung für die Rekrutierung von Proteinen ist, die in die Endozytose involviert sind und eine zentrale Rolle bei der Koordinierung der CVE einnimmt. Zusätzlich ist Amphiphysin über seine BAR-Domäne in der Lage, die Krümmung von Zellmembranen zu messen, bzw. die Membran zu biegen und die Krümmung zu verstärken. (Peter, 2004; Blood and Voth, 2006; Casal et al., 2006). Neben der Rolle bei der synaptischen CVE, weisen verschiedene Berichte darauf hin, dass Amphiphysin zudem beim Aufbau des Zytoskeletts involviert ist, indem es die Polymerisierung von Aktinnetzwerken beeinflussen kann (Mundigl et al., 1998; Yamada et al., 2009).

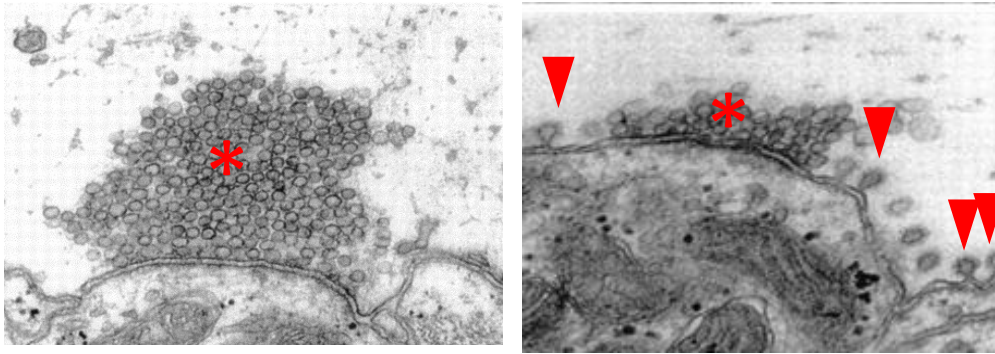


**Abbildung 1.2: Domänenstruktur von Amphiphysin.**

Amphiphysin besitzt 4 wichtige Domänen (BAR-, PRD-, CLAP-, SH3-Domäne) über die es mit einer Reihe von Proteinen und Phospholipidmembranen interagiert. Wichtig für die CVE scheinen vor allem die CLAP- und die SH3-Domäne, über die Amph mit Clathrin, dem AP-2 Aaptorkomplex bzw. Dynamin und Synaptojanin interagiert (Adaptiert von Wu et al 2009).

Die AAK der SPS-Patienten binden vor allem im C-terminalen Bereich, in dem die SH3-Domäne liegt (David et al., 1994). Über die SH3-Domäne kann Amphiphysin sowohl mit Dynamin 1 (David et al., 1996; Grabs et al., 1997), als auch mit Synaptojanin 1 (Micheva et al., 1997; Cestra et al., 1999) interagieren. Während die biologische Signifikanz der Interaktion mit Synaptojanin-1 für die CVE bislang ungeklärt ist, ist die Relevanz der Interaktion mit Dynamin 1 gut belegt.

Dynamamin-1 ist eine Guanosintriphosphatase (GTPase), die bei der CVE und anderen endozytotischen Prozessen entscheidend an der Bindung und Abschnürung von sich ausbildenden Membraninvaginationen und an der Fissur von Vesikeln beteiligt ist (Hinshaw, 2000; Praefcke and McMahon, 2004). Dazu bildet Dynamamin in einem GTP-abhängigen Prozess Polymere im Bereich des Halses der Membraninvaginationen (Roux et al., 2006). Amphiphysin ist über die Rekrutierung von Dynamamin an der Steuerung dieser Prozesse beteiligt (Takei et al., 1999). Amphiphysin kann zudem die GTPase-Aktivität und die Polymerisation von Dynamamin in Abhängigkeit des Phospholipidgehaltes der umgebenden Membranen und deren Krümmung beeinflussen (Yoshida et al., 2004; Wu et al., 2009). Diese enge funktionale Verknüpfung zwischen Dynamamin und Amphiphysin spiegelt sich auch in den ähnlichen Auswirkungen eines Funktionsverlustes eines der beiden Proteine auf die CVE und die synaptische Transmission wieder. Der Verlust von Dynamamin führt in Neuronen zu einer Störung der synaptischen Vesikelendozytose und daraus folgend zu einer Störung der synaptischen Transmission, vor allem während und nach hoher neuronaler Aktivität (Ferguson et al., 2007; Raimondi et al., 2011). Ähnliche Folgen hat auch die genetische Depletion von Amphiphysin. Der Verlust von Amphiphysin 1 führt zu einem fehlerhaften Zusammenfügen endozytotischer Proteinkomplexe in vitro, während elektronenmikroskopisch keine offensichtlichen ultrastrukturellen Veränderungen der Synapsen und der Vesikelmorphologie in Gehirngewebe und Zellkulturen feststellbar sind. Erst bei Stimulation werden signifikante Endozytosedysfunktionen beobachtet, die zu einer Verkleinerung des Recyclingpools führen. Amphiphysin-knockout Mäuse haben infolge dieser Dysfunktion eine kürzere Lebenserwartung, entwickeln spontane Krampfanfälle und zeigen verminderte kognitive Fähigkeiten in verschiedenen Verhaltenstests (Di Paolo et al., 2002). Auch die Unterbindung der Interaktion zwischen Amphiphysin und Dynamamin durch Injektion eines rekombinanten, die SH3-Domäne enthaltenden Proteins führt zu einer Unterbrechung der CVE im Stadium der ausgebildeten Membraninvagination bei Stimulation des Neurons (Shupliakov et al., 1997). Ausgehend von der Bindungsstelle der AAK bei SPS Patienten im Bereich der funktionell wichtigen SH3 Domäne könnte die Interaktion zwischen Amphiphysin und Dynamamin gestört sein. Daraus könnte eine Störung der synaptischen Funktion resultieren. Prüfung dieser Hypothese ist Teil der experimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit.



**Abbildung 1.3: Inhibition der Amphiphysin-Dynamin-Interaktion stört die CVE.**

Die Inhibition der Interaktion von Amphiphysin und Dynamin mit einem Peptid, das die SH3-Domäne enthält, führt unter Ruhebedingungen zu keinen höhergradigen morphologischen Auffälligkeiten in der Synapse des Neunaugenriesenaxons. Eine Vielzahl von Vesikeln (\*) ist rund um die aktive Zone zu sehen (A). Nach hochfrequenter Stimulation sind nur noch wenige Vesikel zu sehen, aber viele Clathrin-ummantelte Membraninvaginationen, die noch nicht den Kontakt zur Zellmembran verloren haben (Pfeilspitzen). Dies legt nahe, dass die Vesikelendozytose vor dem Schritt der Dynamin-vermittelten Ablösung zum Stehen gekommen ist (Adaptiert von Shupliakov, 1997).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tiere, Versuchsgruppen, Behandlung

#### Tiere und experimentelle Gruppen

**Tierhaltung, Versuchsdurchführung, Bezugsquellen.** Alle Tierexperimente wurden durch die Regierung von Unterfranken geprüft und genehmigt (Reg.Ufr. 55.5-2531.01-12/10, 78/05 und 97/09). Die Versuche wurden mit dem Ziel geplant, die Zahl der verwendeten Tiere und deren Stress so gering wie möglich zu halten. Alle Studien wurden im Einklang mit den ARRIVE Leitlinien zur Beschreibung von Tierversuchen und den Kriterien für gute Laborpraxis durchgeführt (Kilkenny *et al.*, 2010).

Die Tiere wurden in Standardkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in einem 12h-Hell-/Dunkelzyklus gehalten. Die an der Durchführung von Verhaltenstests und elektrophysiologischen Studien beteiligten Mitarbeiter waren bezüglich der Genotypen und Behandlung der zu untersuchenden Tiere vollständig verblindet. Die Verteilung auf die unterschiedlichen Untersuchungsgruppen erfolgte durch ein nicht in die Studie involviertes Labormitglied. Die  $cln3^{-/-}$ -Zuchtpaare mit einem 129/SvJ Hintergrund (Mitchison *et al.*, 1999) wurden von D. Pearce zur Verfügung gestellt. Die C57/Bl6-Mäuse für die Patch-Clamp-Untersuchungen entstammen der Zucht der Tierhaltung des Kopfklinikums des Universitätsklinikums Würzburg. Die weiblichen Lewis-Ratten wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) erworben.

**Genotypisierung.** Die Genotypisierung der  $cln3^{-/-}$  Mäuse und der wt-Wurfgeschwister wurde mittels einer Standard-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt (PCR MasterMix, Quiagen, Hilden, Deutschland). Folgende Primer wurden verwendet: CLN3Ex1Fo (TGTATAGCAGACAGCG GACC), CLN3M6R (CAC TCC GAC TAT CCA ACC GA), NIHNeo3'Fo (TCG CCT TCT TGA CGA GTT CT). Für das  $cln3^{-/-}$ -Allel führt diese PCR zu einem ca. 600 Basenpaaren (bp) langen Produkt, für das wt-Allel zu einem ca. 350 bp langen Produkt, die über Gelelektrophorese und Färbung mit Etidiumbromid identifiziert werden konnten. Das DNA-Easy-Blood&Tissue-Kit® (Quiagen) wurde entsprechend den Herstellerangaben für die Aufreinigung der DNA für die PCR verwendet.

**Tiergruppen,  $cln3^{-/-}$ -Versuche.** Für die Untersuchungen an  $cln3^{-/-}$  Mäusen wurden an insgesamt vier Versuchsgruppen Experimente durchgeführt. Die erste Gruppe (Untersuchungen an unbehandelten Tieren) bestand aus 20 Mäusen (wt: 10;  $cln3^{-/-}$ : 10). Die serielle Verhaltenstestung wurde ab einem durchschnittlichen Alter von 9 Monaten durchgeführt, die elektrophysiologischen Untersuchungen am Rückenmark (RM) im Alter von 14 Monaten.

Für die Untersuchungen der Auswirkungen einer erhöhten Durchlässigkeit der BHS für IgG infolge einer Behandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) bei  $cln3^{-/-}$  Mäusen wurden insgesamt 30 Tiere

(wt: 14;  $cln3^{-/-}$ : 16) verwendet. Davon wurden 15 Tiere (wt: 7;  $cln3^{-/-}$ : 8) mit LPS behandelt, die restlichen Tiere erhielten entsprechende Volumina 0,9% NaCl.

Die Tiere der dritten und vierten Gruppe wurden mit Bortezomib behandelt. Die Tiere der dritten Gruppe (22  $cln3^{-/-}$  Mäuse) wurden, beginnend bei einem Durchschnittsalter von 7 Monaten, für maximal 6 Monate behandelt. Bei diesen Tieren wurde Verhaltenstestung durchgeführt und bei Versuchsende Gewebe für immunhistochemische Untersuchungen entnommen. Die  $cln3^{-/-}$  Mäuse der vierten Gruppe wurden über 2 Wochen hinweg mit Bortezomib (n=8) bzw. (n=7) behandelt. Blut und Gewebe wurde für die Durchflusszytometrie verwendet.

**Tiergruppen, Immunisierung gegen Amphiphysin.** Insgesamt wurde die aktive Immunisierung gegen Amphiphysin sowohl an Ratten (2 Versuchsgruppen) als auch an Mäusen (3 Versuchsgruppen) durchgeführt. In einem Vorversuch wurde das Prinzip der Immunisierung an beiden Spezies mit jeweils 7 Tieren (komplettes Freundsches Adjuvans (KFA) + AmphP: 4 Tiere; KFA + NaCl: 3 Tiere) überprüft. Des Weiteren wurde die Auswirkung der erfolgreichen Immunisierung nach Öffnung der BHS mittels einer milden experimentalen adoptiven Autoimmunenzephalomyelitis (AT-EAE) bei Ratten in einem Versuchsansatz (KFA + AmphP + EAE: 10; KFA + NaCl + EAE: 10; KFA + AmphP: 6) überprüft. In Mäusen wurde der Versuch in 2 Gruppen durchgeführt, wobei hier die BHS-Öffnung mit LPS erfolgte (1. und 2. Gruppe je: KFA + AmphP + LPS: 10; KFA + LPS: 10; NaCl + AmphP: 6).

**Tiergruppen, intrathekaler passiver Transfer von Amph-AAK.** Die Ratten wurden nach der operativen Anlage des Katheters randomisiert in Versuchsgruppen unterteilt und erhielten die entsprechende Behandlung. Die 1. Gruppe erhielt die aufgereinigte IgG-Fraktion eines SPS Patienten mit hohem Anteil an Amph-AAK (n=10), die 2. Gruppe eine IgG-Fraktion eines Kontrollpatienten ohne Amph-AAK (n=6). In einem separaten Experiment wurde die 3. Gruppe mit affinitätsgereinigten Amph-AAK behandelt (n=6) und die 4. Gruppe mit der IgG-Fraktion des SPS Patienten nach spezifischer Depletion der Amph-AAK.

## Narkose und Behandlung

**Narkose.** Die Injektionen mit KFA und inkomplettem Freundsches Adjuvans (FA), die Blutentnahmen aus dem retrobulbären Venenkomplex und die elektrophysiologischen Messungen wurden bei Mäusen und Ratten in tiefer Narkose unter Verwendung von Ketamin/Xylazin durchgeführt (intraperitoneal (i.p.); Mäuse: 125 und 8 mg/kg Körpergewicht (KG); Ratten: 80-100 und 5 mg/kg KG; Bayer, Leverkusen und Medistar, Ascheberg, Deutschland). Die Narkose der Ratten für die Katheteroperation erfolgt mittels Inhalationsnarkose mit Isofluran (Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland).

**Immunisierung von Mäusen und Ratten.** Mäuse und Ratten wurden mit dem vollständigen, rekombinanten humanen Amphiphysin-Protein immunisiert. Dazu wurde den Tieren an Tag 1 und Tag 28 humanes Amphiphysin (Mäuse: 200µg; Ratten: 100µg) subkutan injiziert. Als Adjuvans wurde an Tag

1 KFA, an Tag 28 FA verwendet. Die Injektion von KFA kann in seltenen Fällen zu Entzündungen, Abszessen, Granulomen und Fieber führen. Bei Eintreten dieser Symptome wären betroffene Tiere sofort euthanasiert worden. Die Tiere wurden täglich kontrolliert (Gewicht, Fressverhalten, Fellfarbe und -beschaffenheit), ein Verlaufsprotokoll wurde für jedes Tier geführt. Bei Gewichtsabnahme > 20%, unkontrollierbarem Schmerzverhalten oder selbst- oder fremdaggressivem Verhalten wäre ebenso der Versuchsabbruch erfolgt. Allerdings sind bei keinem der Tiere diese Symptome in einem Maß aufgetreten, das eine vorzeitige Euthanasie zwingend notwendig gemacht hätte.

**LPS-Behandlung.** Um systemisch synthetisiertem IgG den Zugang zum ZNS zu ermöglichen, wurde die BHS mit LPS, einem Bakterienwandbestandteil grampositiver Bakterien, experimentell permeabilisiert. Die Behandlung der *cln3*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 3mg/kg KG LPS (*E. coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) erfolgte jeweils 2 mal im Abstand von 48 h zu Beginn der Testungsphase und 2 Monate später. Die Kontrolltiere erhielten 0,9% NaCl-Lösung (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in vergleichbaren Volumina.

Für die systematische Untersuchung des Effektes von LPS auf die Durchlässigkeit der BHS für IgG wurden die Tiere 2 mal im Abstand von 48 h mit LPS behandelt und den Versuchstieren einen, drei bzw. fünf Tage nach der letzten LPS Behandlung gepooltes, polyvalentes humanes IgG (Sando-globulin®, Novartis, Nürnberg, Germany, 10mg/0,1ml) intravenös (i.v.) injiziert. 3 weitere Tiere erhielten entsprechende Volumina 0,9% NaCl. 6 h nach i.v.-Injektion wurden die Tiere transkardial perfundiert und Leber und Gehirn für die immunhistochemische Detektion von humanem IgG entnommen.

Die BHS-Öffnung bei immunisierten Mäusen wurde 12 Tage nach der letzten Immunisierung nach dem gleichen Protokoll durchgeführt.

**BHS-Öffnung Ratten.** Die Öffnung der BHS bei Ratten erfolgte über eine AT-EAE, mit möglichst geringer Ausprägung der EAE-typischen Symptome (Boettger et al., 2009). T-Zellblasten wurden von Herrn PD Dr. Weishaupt zur Verfügung gestellt, die nach beschriebenen Protokollen aufbereitet wurden (Weishaupt et al., 2000; Weishaupt et al., 2004).  $2 \times 10^6$  frisch aktivierte Myelin-basic Protein-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellblasten wurden den einzelnen Tieren in die Schwanzvene injiziert. Nach der Induktion der AT-EAE wurden die Tiere täglich auf ihren Gesundheitszustand und die Symptomatik hin überprüft.

**Intrathekale Katheter und AAK-Injektionen.** Die Katheteroperationen wurden von Dr. Christian Geis durchgeführt. Intrathekale (i.th.) Katheter (0,28- mm Innendurchmesser; 0,61-mm Außendurchmesser; i.th.-länge: 7,0 cm) wurden wie zuvor beschrieben (Yaksh and Rudy, 1976) durch die atlanto-okzipitale Membran in den Spinalkanal eingeführt. Tiere die nach der Operation Anzeichen einer Paralyse zeigten wurden euthanasiert. Die erste Injektion der AAK erfolgte nach Erholung der Tiere frühestens sieben Tage nach der Operation. Es wurden jeweils 10 µl der IgG-Fraktion und danach 10µl

0,9% NaCl zum Durchspülen der Katheter injiziert. Die nativen IgG-Fractionen enthielten 100 mg/ml IgG, die anti-Amphiphysin-spezifische Fraktion 10 mg/ml IgG, die der Amph-AAK depletierte Fraktion 100 mg/ml IgG. Die Injektionen wurden an den ersten 5 Tagen täglich durchgeführt. In Folge wurden die Injektionen 6-10 jeden zweiten Tag und die Injektionen 11 und 12 nach jeweils 3 Tagen durchgeführt.

**Behandlung mit Bortezomib.** Die Mäuse wurden zweimal wöchentlich i.p. mit 0,75 mg/kg KG Bortezomib (5µl/g KG einer 0,15mg/ml Lösung in 0,9% NaCl, Selleck Chemicals LLC, Houston, USA) behandelt. Die entsprechenden Kontrolltiere mit vergleichbarem Alter und gleicher Geschlechtsverteilung erhielten vergleichbare Volumina 0,9% NaCl. Vor der Behandlung wurden bei allen Tieren eine Verhaltenstestung durchgeführt (RotaRod, Analyse der Fußabdrücke). Während der Behandlungsphase wurden die Tiere monatlich getestet und die Werte mit den Basiswerten verglichen (gepaarte Analyse).

## Gewebe-und Blutentnahme

**Blutentnahme.** Die wiederholte Blutentnahme im Versuchsverlauf erfolgte aus dem retrobulbären Venenkomplex mit Hilfe einer handelsüblichen Glaspasteurpipette (A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg, Deutschland). Die Blutentnahme bei Versuchende erfolgte in tiefer Narkose aus der linken Arteria axillaris. Blut für die Durchflusszytometrie (FCM, engl. flow cytometrie) wurde aus dem freipräparierten Herzen entnommen. Entnommenes Blut wurde bei Raumtemperatur ca. 30 min bis zur Koagulation aufbewahrt und anschließend bei 10.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die klare Serumphase wurde dann abgenommen und bei -80°C für weitere Untersuchungen eingefroren.

**Gewebeentnahme.** Bei Versuchsende wurden die Tiere entweder durch zervikale Dislokation oder durch Entbluten in tiefer Narkose getötet. Anschließend wurde das Gewebe entnommen und mit Tissue Tek® Mounting Media (Sakura Finetek Europe Alphen aan den Rijn, Niederlande) in durch flüssigen Stickstoff gekühltem Methylbutan (Sigma-Aldrich) schockgefroren. Das Gewebe wurde anschließend bei -80°C aufbewahrt.

**Transkardiale Perfusion.** Für die transkardiale Perfusion wurden die Tiere mit einer Überdosis Ketamin-Xylazin in Narkose gelegt und der Brustkorb durch das Zwerchfell eröffnet, um das Herz freizulegen. Die Perfusion erfolgte eine langsam drehende Schlauchpumpe (Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) durch die linke Herzkammer. Zunächst wurde das Versuchstier mit 0,1M phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) für 5 min. perfundiert. Falls neben dem Entfernen des Blutes aus den Gefäßen auch eine Fixierung des Gewebes gewünscht war, wurde danach 10-15 min. mit 4% Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Der Erfolg der Perfusion wurde anhand der Entfärbung der Leber und an der Steifigkeit des Gewebes überprüft.



## 2.2. Verhaltenstests

### Motorische Testung

**Rotarod.** Die motorischen Fähigkeiten von Ratten und Mäusen wurden mit einem "accelerating RotaRod"-System (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) getestet. Gemessen wurde die Zeit, die ein Versuchstier auf der sich mit steigender Geschwindigkeit drehenden Trommel (Durchmesser für Ratten: 60 mm; für Mäuse: 30 mm) laufen konnte. Reines „Festhalten“ an der Trommel oder dem Gehäuse wurde als auch als Endzeitpunkt gewertet. Die Geschwindigkeit der Trommel steigerte sich während der Versuche mit Mäusen von 5 auf 50 Umdrehungen pro Minute (U/min), bei Versuchen mit Ratten von 5 bis 32 U/min. In allen Versuchen wurden die Tiere zu Beginn an 5 aufeinander folgenden Tagen in jeweils 5 Durchläufen getestet und trainiert, um stabile Ausgangswerte zu erhalten. In der Folge wurden die Tiere wöchentlich bis monatlich an einem Versuchstag 5 mal getestet. Der Median der 3 besten von den 5 Versuchen an einem Testtag wurde für die statistischen Berechnungen verwendet.

**Analyse der Pfotenabdrücke.** Die Analyse der Pfotenabdrücke wurde entsprechend vorheriger Beschreibungen durchgeführt (Kunkel-Bagden *et al.*, 1993). Für den Versuch wurden die Hinterfüße der Mäuse bzw. der Ratten mit Tinte geschwärzt. Anschließend wurden die Tiere in einen Tunnel gesetzt, in dem sie vom Experimentator weg in eine festgelegte Richtung liefen. Die so gewonnenen Fußabdrücke wurden dann auf folgende Parameter analysiert: Schrittlänge, Gangbreite und Winkel zwischen den Hinterfüßen. Für jeden Versuch, wurden alle 3 Parameter jeweils dreimal ausgemessen und der Median dieser Werte wurde für die weitere Auswertung genutzt.

**Klettertest.** Für den Klettertest wurden die Mäuse trainiert an einer vertikal gespannten, 1 m langen handelsüblichen Paketschnur hochzuklettern. Am oberen Ende befand sich eine fest installierte Plattform, auf der sie mit Futter und Wasser belohnt wurden. Die Zeitmessung fand zwischen dem Greifen der Schnur und dem Erreichen der Plattform mit allen 4 Pfoten statt. Diese Zeit wurde dann für alle weiteren Analysen genutzt. Die wt-Mäuse brauchten im Allgemeinen 6 bis 12 Sekunden für das Erreichen der Plattform. Ein Versuch wurde abgebrochen, wenn eine Maus nach 60 Sekunden die Plattform noch nicht erreicht hatte. Ein Experiment bestand immer aus 5 Versuchen, wobei der Median der 3 besten Versuche für die weitere Analyse genutzt wurde.

Zur Bewertung der Koordination der Bewegung während dem Klettern wurde eine nicht-lineare Bewertungsskala eingesetzt. Diese Skala reichte von 1 bis 4 und die Wertung erfolgte entsprechend folgender Kriterien: 1: Die Maus nutzte alle 4 Läufe alternierend für das Klettern 2: Die Maus nutzte die Hinterläufe nicht über die gesamte Strecken in alternierender Weise 3: Die Maus nutzte die Hinterläufe, aber nie in alternierender Form 4. Die Maus war nicht in der Lage die Hinter-

läufe zum Klettern zu nutzen. Der Median aller Versuche für ein Tier an einem Versuchstag wurde für die weitere Analyse verwendet.

**EAE-Score.** Die Auswirkungen der AT-EAE auf die Ratte wurde nach folgendem semiquantitativen Score bewertet. 0: Normal; 1: schleifender Schanz; 2: leichte Parese der Hinterläufe, ungleichmäßiger Gang; 3: moderate Paraparese, willentliche Bewegungen noch möglich; 4: Querschnittslähmung oder Tetraparese; 5: moribund.

### **Testung auf angstähnliches Verhalten und konditioniertes Lernen**

**Petrischalentest.** Der Petrischalentest wurde zum Screening auf angstähnliches Verhalten bei Mäusen genutzt. Diese einfache Variante eines Barrieretests dient der Evaluation von explorativem Verhalten, das durch gesteigerte Ängstlichkeit reduziert sein kann. Im Versuch wurden die Tiere einzeln in eine Glaspetrischale (Durchmesser: 15 cm; Wandhöhe: 1,5 cm) gesetzt, die sich wiederum auf einem Versuchsfeld mit einer Fläche von 2 qm befand. Die Zeit bis die Tiere mit allen vier Pfoten die Schale verließen, wurde mit einer Stoppuhr gemessen. Verließ ein Tier die Petrischale innerhalb von 60 s nicht, wurde der Versuch abgebrochen und die Zeit von 60 s wurden für die weitere Analyse verwendet. Eine Testung bestand für jedes Tier aus 3 Versuchen, wobei zwischen jedem Versuch mindestens 10 min. lagen. Der Median aller 3 Versuche wurde für die weitere Auswertung verwendet.

**Open field-Test (OF).** Der OF- und der Elevated Plus Maze-Test (EPM) für die  $cln3^{-/-}$ -Mäuse und die Ratten wurden von Antonia Post, Sandy Popp und Thomas Wulsch (alle: Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Universitätsklinikum Würzburg) durchgeführt. Die entsprechenden Versuche mit Tieren, die gegen Amphiphysin immunisierten waren, wurden im Großtierhaus des Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt. Folgende Parameter wurden automatisch mit den jeweiligen Trackingprogrammen gemessen: gesamte zurückgelegte Strecke, Aufenthaltszeiten in den unterschiedlichen Zonen der Testfelder, Zahl der Eintritte in die jeweiligen Zonen. Zusätzlich wurden durch folgende Parameter bestimmt: „Rearing“-verhalten, „Grooming“-verhalten und Grad des Interesses an neuer Umgebung. Diese Parameter können Informationen über den Grad der Ängstlichkeit und das explorative Verhalten geben. Zwischen den einzelnen Versuchen wurden die Geräte mit 70% Ethanol gereinigt, um gleiche Bedingungen für alle getesteten Tiere zu garantieren.

Zur Durchführung des OF-Test bei den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen wurde eine oben offene, quadratische Box (Fläche: 50x50 cm; Wand: 40 cm) aus Perspex XT verwendet. Das Material ist schwarz, blickdicht und semipermeabel für Infrarotlicht (IR; TSE Systems Inc.). Die Testfläche wurde von unten mit Infrarotlicht (200 Lux im Zentrum, 150 Lux in der Peripherie) beleuchtet und die Aktivität wurde mit einer IR-sensitiven CCD-Kamera (GKB Security Corporation, Taichung, Taiwan) beobachtet und mit der Videotrackingsoftware VideoMot2 (TSE Systems Inc.) digitalisiert und analysiert. Für die Analyse wurde

die OF-Fläche in ein Zentrum (25x25 cm) und die umgebende Peripherie unterteilt. Im Versuch wurden die Mäuse in der Peripherie platziert und die Aktivität während der freien Exploration des OF wurde über 5 min. hinweg beobachtet.

Der OF-Test für die immunisierten Mäuse wurde in einer speziellen begehbaren Box durchgeführt, um das Versuchsfeld möglichst frei von Störungen zu halten. Das OF (Fläche: 50x50 cm; Wand: 40 cm) bestand aus grauem, blickdichtem PVC-Plastik, wurde von oben mit weißem Licht beleuchtet (120 Lux) und die OF-Fläche wurde in ein Zentrum (25x25 cm) und eine umgebende Peripherie unterteilt. Die Aktivität wurde mit einer CCD-Kamera (GKB Security Corporation) gefilmt und mit CyberLink Powerdirector (CyberLink Corp, New Taipei City, Taiwan) digitalisiert. Die Analyse der Aktivität erfolgte retrospektiv mit ANY-maze (Stoelting Co., Wood Dale, USA).

Das OF für Ratten bestand aus einer quadratischen, oben offenen Box (Fläche: 82x82x; Wand: 25cm) aus grauem, blickdichtem PVC-Plastik. Der Maze wurde mit weißem Licht beleuchtet (100 Lux). Die Aktivität der Ratten wurde mit einer CCD-Kamera (GKB Security Corporation) und VideoMot2 (TSE Systems Inc.), über 5 min hinweg analysiert (Wultsch *et al.*, 2007).

**Elevated Plus maze (EPM).** Zur Durchführung des EPM bei den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen wurde ein plusförmiges Testfeld aus grauem Perspex (TSE Systems Inc.) verwendet. Die gegenüberliegenden Arme (30x5 cm) waren um eine zentrale Plattform (5x5 cm) angeordnet. Zwei der Arme waren von 15 cm blickdichten Wänden umgeben, während die beiden anderen von einer flachen Lippe (0,25 cm) begrenzt wurden. Das Testfeld befand sich 50 cm über dem Boden. Die offenen Arme wurden mit 200 Lux, die zentrale Plattform mit 120 Lux und der geschlossene Arm mit 40 Lux beleuchtet. Die Mäuse wurden mit Blick auf einen offenen Arm auf die mittlere Plattform, gesetzt und konnten während der 5-minütigen Testphase das Testfeld frei erkunden. Die Analyse erfolgte mit VideoMot2.

Das EPM für die Testung der immunisierten Mäuse hatte die gleichen Maße, bestand aber aus grauem, blickdichtem PVC-Plastik und die die Datenanalyse erfolgte mittels ANY-maze-Software.

Das Testfeld für Ratten bestand aus grauem, blickdichtem PVC-Plastik mit zwei sich gegenüberliegenden geschlossenen Armen (60 x 10 cm; Illumination: 50 Lux) und 30 cm hohen, blickdichten Wänden, 2 sich gegenüberliegenden offenen Armen (50 x 10 cm; 100 Lux) und einer zentralen Plattform (10 x 10 cm; 70 Lux). Der Testfläche befand sich 72 cm über dem Boden. Die Versuche wurden auf die gleiche Weise durchgeführt wie die EPM-Untersuchungen an den Mäusen. Die Auswertung erfolgte mit Vidoemot2 (TSE System Inc.).

**Angstkonditionierung (Fear Conditioning, FC).** Die FC-Versuche wurden mit einem automatisierten Fear conditioning system (TSE Systems Inc.) durchgeführt. Die Versuchskammer wurde während des gesamten Experiments mit einer Lichtintensität von 100 Lux beleuchtet. Während der Konditionierungsphase (Tag 0) wurden die Tiere in die Versuchskammer gesetzt. Vor Beginn der Konditionierung wurde ihnen die Möglichkeit gegeben die neue Umgebung 2 min. lang zu erkunden. Dann wurden die

Mäuse mit einem 80 dB lauten 10 kHz sinusoidalem Ton für 20 s beschallt, der als konditionierter Reiz (CS) definiert wurde. Während den letzten 2 s des CS wurde ein schmerzhafter, elektrischer Reiz (0,75 mA) gegeben, der als unkonditionierter Reiz (US) diente. Nach 80 s Pause wurde diese Prozedur wiederholt. Nach der zweiten Paarung von akustischem und schmerzhaftem Reiz wurden die Tiere für weitere 60 s in Kammer belassen. Nach jedem Versuch wurde die Kammer gründlich mit 70% Ethanol gereinigt.

Die Testung des reizbedingten Lernens erfolgte an Tag 1 und Tag 7 in der gleichen Kammer, wobei sie wie folgt modifiziert wurde um eine „neue“ Umgebung zu generieren: der aus einem Metallgitter bestehende Boden wurde mit einer PVC-Platte und Holzchips abgedeckt, die Arena wurde mit Papier abgedeckt und mit 3% Essigsäure gereinigt um einen neuen olfaktorischen Reiz zu gewährleisten. Die Mäuse wurden einzeln in der Kammer platziert und erhielten 2 min Zeit sich mit der neuen Umgebung vertraut zu machen. Dann wurde der gleiche akustische Reiz wie an Tag 0 für 3 min präsentiert und die Reaktionen der Mäuse wurden aufgezeichnet. Nach Ende der Tonpräsentation wurden die Tiere noch 30 s in der Versuchskammer belassen, bevor sie wieder in ihre ursprünglichen Käfige gesetzt wurden.

Die Testung der kontextuellen Angst wurde an Tag 2 und 8 durchgeführt, indem die Tiere in exakt die gleiche Versuchskammer wie an Tag 0 platziert wurden. Das Verhalten wurde über 5 min hinweg aufgenommen, ohne dass ihnen ein weiterer Reiz präsentiert wurde. Die Apparatur wurde nach jedem Versuch mit 70% Ethanol gereinigt.

Die Experimente wurden durchgängig von einem für Genotyp und Behandlung verblindeten Experimentator beobachtet und für eine unabhängige, zweite Evaluierung aufgezeichnet. Bei jeder Untersuchung wurde die Gesamtzeit des Beobachtens „Freezing“-Verhaltens und die Latenz bis zum ersten „Freezing“ manuell nach einem standardisiertem Protokoll analysiert. Zusätzlich wurde das „Rearing“- und das „Grooming“-Verhalten bewertet.

## 2.3. Elektrophysiologische Messungen

### In-Vivo Elektrophysiologie

**Messung des Hofmann (H)-Reflexes.** Für die Messungen des H-Reflexes bei Mäusen wurden die Tiere mit Ketamin-Xylazin (Dosierung s.o.) narkotisiert. Zur Stimulation des N. tibialis wurden 2 Stahlnadel-elektroden direkt oberhalb des Fußgelenks verwendet. Die Ableitung der orthodromen, motorischen Antworten und der H-Antworten nach Erregung der Ia afferenten Fasern und monosynaptischer Umschaltung im RM erfolgte ebenfalls mit Stahlnadelektroden von der kleinen Fußmuskulatur. Zunächst wurde die Reizschwelle für einen 0,05 ms langen Stimulationspuls bestimmt und im Anschluss wurde die Reizstärke schrittweise (0,1 mA Schritte) erhöht, bis reproduzierbare H-Antworten generiert wur-

den. Stimulation und Ableitung wurden mit einem Toennies Electromyograph und der NeuroScreen-plus Software (Erich Jaeger GmbH, Höchberg, Deutschland) durchgeführt. Waren keine reproduzierbaren M- oder H-Antworten generierbar, bzw. nahm die Amplitude der M-Antwort über den Versuch hinweg ab oder waren klare Anzeichen einer Einblutung im Bereich der Fußmuskulatur sichtbar, wurden die Ableitungen verworfen.

**Messung der Hinterwurzelpotentialie (Dorsal root potentials, DRP).** Für die Messung der DRP wurden die Tiere mit Ketamin-Xylazin narkotisiert. Die Narkose wurde über kleine, intramuskuläre Dosen Ketamin-Xylazin aufrechterhalten. Zur Freilegung des RM wurde unter Sicht mit einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) eine Laminektomie von den unteren lumbalen bis zu den thorakalen Wirbelsegmenten durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass weder die Dura verletzt, noch das RM durch Druck geschädigt wurde. Bei der Präparation wurden die weiter kranial gelegenen, besonders vulnerablen Eintrittsstellen der Wurzeln in das RM bewusst ausgespart um eine Verletzung zu vermeiden. Anschließend wurde mit einer dünnen Kanüle die Dura vorsichtig eröffnet und die Wurzeln L3-5 stumpf separiert. Die Hinterwurzeln wurden nach der Separation möglichst weit distal durchtrennt, um lange Wurzelenden zur Verfügung zu haben. Während der gesamten Operation und der folgenden Ableitung wurde das Gewebe mit artifiziellm Liquor (aCSF; NaCl 134, KCl, 3 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, MgSO<sub>4</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 25, CaCl<sub>2</sub> 2, D-Glucose 10; pH 7,2) feucht gehalten. Die gleiche Lösung diente auch der Befüllung der Saugelektroden. Für die Stimulation und die Ableitung wurden selbstgemachte Saugelektroden verwendet (Martinez-Gomez and Lopez-Garcia, 2005). Die Stimulation erfolgte über einen S88 dual output square pulse stimulator (Grass Technologies, Warwick, USA) und die Ableitung über einen ELC-03X Universal Amplifier (NPI, Tamm, Deutschland). Die Digitalisierung der Daten sowie die Steuerung des Stimulators und des Verstärkers erfolgte über ein LIH 1600 acquisition interface und Patchmaster (beides: HEKA, Lambrecht, Deutschland). Die Auswertung der Amplituden erfolgte mit Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) und dem Neuromatic-Plugin (ThinkRandom.com).

**Extrazelluläre Einzellableitungen (SU) von Purkinjenzellen (PZ).** Für die Ableitung von SU der PZ wurden die Tiere in tiefe Narkose gelegt. Für die Ableitung und die Präparation der Kalotte wurde der Kopf der Maus in einem stereotaktischen Rahmen (Stoelting Co) fixiert. Die Schädeldecke und die Dura über der Vermis des Kleinhirns wurden unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Zeiss) präpariert. Die Oberfläche des Kleinhirns wurde mit aCSF feucht gehalten und die Körpertemperatur des Versuchstier wurde mittels einer temperaturgesteuerten Heizdecke bei 37°C gehalten, um temperaturbedingte Veränderungen des Feuerverhaltens der gemessenen Zellen zu vermeiden. Die Wolfram-mikroelektroden (10-12 MΩ Impedanz; FHC Inc., Bowdoin, Canada) wurden senkrecht zur Gehirnoberfläche mit Hilfe eines motorisierten Mikromanipulators (MPC-385, Sutter Instruments, Novato, USA) vorwärts bewegt, während die eingehenden Signale visuell und akustisch geprüft wurden

(ELC-03X Universal Amplifier, LIH 1600 acquisition interface, Patchmaster). Die PZ wurden anhand ihres Feuerverhaltens (einfache AP mit 50 Hz und intermittierende komplexe AP mit nachfolgender AP-Pause) und ihrer Lage in Bezug auf die Oberfläche des zerebellären Kortex (ca. 250  $\mu\text{m}$  tief) identifiziert. Waren diese Kriterien erfüllt und konnte eine gleichzeitige Ableitung mehrerer Zellen abgeschlossen werden, wurde die Ableitung durchgeführt und gespeichert. Die einfachen AP aus einer fünfminütigen, passiven Ableitung wurden mit einer „Spike-Detection-Routine“ (Igor Pro und Neuroomatic) detektiert. Die Analyse umfasste neben der reinen Frequenz auch die Interspikeintervalle (ISpl, Pause zwischen 2 AP), den Koeffizient der Varianz der ISpl (CV) als Maß für die Regularität und den Koeffizient der Varianz benachbarter ISpl ( $\text{CV}^2$ ) als Maß für die Regularität der AP in kleinen Zeiträumen (Shin *et al.*, 2007; Wulff *et al.*, 2009).

### **In-vitro Elektrophysiologie**

**SU der PZ in-vitro.** Die Messungen der SU der PZ in akuten, zerebellären Schnitten wurden von Herrn Christian Werner direkt im Anschluss an die PZ-Ableitungen in-vivo durchgeführt. Nach der Entnahme der Mausgehirne wurden mit einem Vibratom (VT-1200s, Leica, Wetzlar, Deutschland) 300 $\mu\text{m}$  dicke, koronare Schnitte präpariert und in einer physiologischen Lösung (125mM NaCl, 26mM  $\text{NaHCO}_3$ , 20mM Glukose, 2,5mM KCl, 1,25mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ ) 30 min bei 32°C und anschließend bei RT aufbewahrt (Aiba *et al.*, 1994). Anschließend wurden die Schnitte für die Messungen in eine Messkammer überführt, in der sie konstant mit einer extrazellulären Lösung (125mM NaCl, 25mM  $\text{NaHCO}_3$ , 25mM Glukose, 2,5mM KCl, 1,25mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ ) perfundiert (Flußrate: ca. 2ml/min) wurden. Alle Lösungen wurden durchgehend mit 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$  begast. PZ wurden visuell identifiziert (Axioskop2, 63-fach Wasserimmersionsobjektiv, AxioCam MRm Kamera, AxioVision Bildanalyse Software; alles Zeiss; unterstützt durch DODT Gradienten Optik, Luigs&Neumann; Ratingen, Deutschland). Die nieder-ohmige Patchableitung („loose patch-Konfiguration“) wurden mit einem EPC10 Double patch clamp Amplifier und der Patchmaster-Software (beides HEKA) unter Verwendung von niederigohmigen (2-2,5 MOhm) Elektroden durchgeführt. Die Elektroden wurden mit einem Micropipettenpuller (p97, Sutter Instruments) aus dickwandigem Borsilikatglasröhrchen mit Filament (GB200TF-10, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) hergestellt. Die Stimulation der Parallelfasern erfolgte über Elektroden im Abstand von ca. 200 $\mu\text{m}$  zur abgeleiteten PZ. Rechteckspulse (6-10V, 100 $\mu\text{s}$ , bei 0,5Hz) wurden mittels eines über die Patchmaster-Software gesteuerten Stimulation Isolator (Isoflex, A.M.P.I; Jerusalem, Israel) generiert. Alle Elektroden waren mit extrazelluläre Lösung befüllt. Die Signale wurden bei 2,9 kHz gefiltert und mit 10kHz digitalisiert. Die Datenanalyse erfolgte wie für die in-vivo Ableitungen beschrieben.

**Patch-Clamp Ableitung.** Für die Ableitung inhibitorischer postsynaptischer Potentiale (IPSC) wurden akute hippocampale Schnitte aus 15-21 Tage alten Mäusen hergestellt. Dazu wurden nach Dekapita-

tion der Mäuse die Gehirne in kalter, saccharosehaltiger extrazellulärer Lösung (40mM NaCl, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM Glukose, 150mM Saccharose, 4mM KCl, 1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 7mM MgCl<sub>2</sub>; mit 95% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> begast) präpariert. Von dem präparierten Gehirn wurden mit einem Vibratom 300 µm dicke Schnitte angefertigt (Geiger and Jonas, 2000; Geiger et al., 2002). Die Schnitte wurden dann in ein selbstgebautes Aufbewahrungssystem überführt, in dem sie für 30 min. bei 34°C und in der Folge bis zu 4h bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt wurden. In diesen Aufbewahrungssystemen erfolgte auch die Inkubation mit den entsprechenden humanen IgG-Lösungen (1 mg/ml anti-Amphiphysin- oder Kontroll-IgG) für mindestens 1 h.

Für die Durchführung der Experimente wurden die Schnitte in eine Messkammer überführt, die kontinuierlich mit einer extrazellulären Lösung (125mM NaCl, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 25mM Glukose, 2.5mM KCl, 1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, mit 95% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> begast) durchspült wurde. Die Experimente wurden bei RT durchgeführt. Die Elektroden für Ableitung und Stimulation wurden mit einem Micropipettenpuller (p97, Sutter Instruments) aus dickwandigem Borsilikatglasröhrchen mit Filament (GB200TF-10, Science Products GmbH) gezogen. Die Positionierung der Elektroden erfolgte mit Hilfe von piezogetriebenen, dreiachsigen Mikromanipulatoren (Unit Mini 3 Axes, Luigs & Neumann Feinmechanik + Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland) unter visueller Kontrolle (Axioskop 2). Die Ableitungselektroden waren mit gefilterter intrazellulärer Lösung (140mM KCl, 10mM Hepes, 10mM EGTA, 2mM Na<sub>2</sub>ATP, 2mM MgCl<sub>2</sub>) gefüllt und besaßen einen elektrischen Widerstand von 3-4 MΩ, während die Stimulationselektroden mit gleicher Öffnung extrazelluläre Lösung enthielten. Die Ableitungen, Verstärkung und Digitalisierung der Signale erfolgten mit einem EPC10 Double patch clamp Amplifier und der PULSE-Software (beides HEKA). Die elektrischen Signale wurden unter Verwendung der verstärkereigenen Filter zwischen 2,9 kHz und 10 kHz gefiltert. Die Daten wurden auf einer handelsüblichen Festplatte gespeichert.

Die Körnerzellen (KZ) des Gyrus dentatus (GD) wurden visuell identifiziert und nach Etablierung der „Whole-cell-Konfiguration“ (Hamill *et al.*, 1981) auf -70mV geklemmt. Ableitungen, bei denen das ungeklemmte Membranpotential größer -60mV oder der Serienwiderstand laut automatischer Messung größer 20 MΩ war, wurden verworfen. Gleiches galt für Zellen bei denen die elektrische Stimulation ungeklemmte AP auslöste. Das „liquid junction potential“ wurde nicht korrigiert und der Serienwiderstand nicht kompensiert. Alle Messungen wurden in Gegenwart von 10 mM 6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dione (CNQX, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA) zur Blockade von Glutamatrezeptoren des AMPA-Typs durchgeführt. Für die Messung der Miniaturpotentiale wurde zusätzlich 1 µM Tetrodotoxin (TTX, Sigma) verwendet. In einer separaten Gruppe von Messungen wurden 50 µM AP-5 (2-Amino-5-phosphonovaleriansäure, Sigma) bzw. 20 µM Bicuculin (Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich) verwendet, um mögliche NMDA-Rezeptor vermittelte Komponenten auszu-

schließen bzw. nachzuweisen, dass die postsynaptischen Ströme durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren verursacht sind.

Um möglichst einzel-evozierte Antworten zu induzieren, wurde eine zuvor beschriebene (Edwards *et al.*, 1990) Minimalstimulation der GABAergen Afferenzen durch eine nahe der geklemmten Zelle positionierte Stimulationselektrode angewendet. Die Stimulation erfolgte unter Verwendung einer Isoflex stimulation isolation unit (A.M.P.I, Jerusalem, Israel) unter Kontrolle der EPC10. Zur Einstellung der Minimalstimulation wurde die Stimulationsstärke (2-8V), so gewählt, dass eine maximale Zahl an Fehlern (minimale Zahl an IPSC) aber noch messbare IPSC beobachtet wurde. Diese Schwelle wurde mehrmals hintereinander von beiden Seiten her bestimmt (Allen and Stevens, 1994).

## 2.4. Histologie

**Schnittpräparation.** Die eingefrorenen Gewebstücke wurden von -80°C auf -20°C gebracht und mit Tissue Tek aufgeblickt. 10-30µm dicke Schnitte wurden mit Hilfe eines Kryostaten (CM 050S Kryostat, Leica Microsystems; Wetzlar, Deutschland) angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost®; Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**Färbung.** Die Gewebsschnitte wurden 10 min bei -20 °C mit Aceton (Sigma-Aldrich) permeabilisiert und fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte 30 min mit 10% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS bei RT geblockt. Für die Fluoreszenzfärbungen wurden die Erstantikörper in 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C mit den angegebenen Konzentrationen inkubiert. In weiteren Versuchen wurden unbehandelte Seren aus Ratten und Mäuse wie Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen wurden die passenden, Cy3-gekoppelten Zweitantikörper (1:300; Dianova, Hamburg, Deutschland) für 2 h bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden dann dreimal gewaschen und mit VECTASHIELD® (Vectorlabs, Burlingame, USA) eingedeckt. Für die Detektion der IgG-Ablagerungen wurden die Schnitte über Nacht mit einem biotinyliertem Antikörper inkubiert. Die Färbung wurde dann mit Vectastain ABC Kit (Vectorlabs) sichtbar gemacht.

**Mikroskopie und Bildanalyse.** Die histologischen Färbungen wurden mit Hilfe eines Axioskop 2 (Zeiss), einer Spot4 CCD-Kamera (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) und der Spot Advanced Software (Spot Imaging Solutions, Sterling Heights, USA) mikroskopiert und digitalisiert. Für die semiautomatisierte Zellzählung und die Messungen der optischen Dichte als Maß für die Stärke der Färbung wurde ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA) und MBF Plugin Collection (MacMaster University, Biophotonics Facility, Hamilton, Kanada) verwendet.



## 2.5. Molekularbiologische Methoden

**IgG-Aufreinigung.** Die aufgereinigten IgG-Präparationen, die in den Patch-clamp Messungen, der Histologie und den Western Blots (WB) Anwendung fanden wurden von PD Dr. Andreas Weishaupt und Susanne Hellmig (beide: Universitätsklinikum Würzburg, Neurologische Klinik) affinitäts gereinigt und für die Versuche zur Verfügung gestellt (Geis *et al.*, 2010).

**Herstellung Amphiphysin.** Humanes Amphiphysin wurde von PD Dr. Andreas Weishaupt und Susanne Hellmig hergestellt. Eine Beschreibung des verwendeten Plasmids und der Aufreinigung ist publiziert (Geis *et al.*, 2010).

**SDS-Page und Western Blot.** Die in den Westernblots eingesetzten Lysate wurden aus nativem Maus- bzw. Rattengewebe hergestellt. Dazu wurden die Gewebe mit einem Lysispuffer (500 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1mM 2-Mercapto-ethanol, 1% Triton X 100, Puffer Protease Inhibitor Cocktail (Roche; Basel, Schweiz) und Ultraschall homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem „Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit®“ (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt und die Absorption bei 595 nm photometrisch (BioPhotometer; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt (Bradford, 1976).

Die Proteine wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System; Bio-Rad, Hercules, USA) und im Semidry-Blotverfahren (Trans-Blot SD semi-dry transfer cell; Bio-Rad) auf Nitrocellulose (Westran® Clear Signal, Whatman, London, Vereinigte Königreich) geblottet. Sollten auf einem Blot mehrere unterschiedliche Erstantikörper oder Seren verwendet werden, wurde bei den folgenden Schritten ein Mini-PROTEAN II Multiscreen Apparatus (Bio-Rad) verwendet, die es ermöglicht mehrere AK auf ein Blot durchzuführen, ohne den Blot vorher zu teilen. Die Blots wurden 30 min. bei RT mit 5% Trockenmilchpulver (Sigma-Aldrich) in PBST (3,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) geblockt. Die Erstantikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4°C, die Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper wurden nach dreimaligem Waschen für 2 h bei RT inkubiert. Die Detektion erfolgte mit ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare; Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben.

## 2.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FCM) und die Auswertung der Daten wurden zusammen mit Angela Dreykluft (Universitätsklinikum Würzburg, Neurologie) durchgeführt. Die verwendeten Tiere wurden per Genickbruch getötet oder, falls ZNS-Gewebe für die Durchflusszytometrie entnommen wurde, in tiefer Ketamin-Xylazin-Narkose transkardial mit eiskalter 1x phosphatgepufferte Natriumchloridlösung (PBS; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) perfundiert und die entsprechenden Gewebe ent-

nommen. Die Milzzellen wurden mit einem 40 µm Zellsieb (BD Falcon™, Heidelberg, Deutschland) vereinzelt. Die Knochenmarkszellen wurden aus den an beiden Enden eröffneten Oberschenkelknochen mit einer Spritze und 1 x PBS (PAA Laboratories) ausgespült. Die roten Blutzellen wurden mit ACK-Puffer (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA; Merck, Darmstadt, Deutschland, bzw. Sigma-Aldrich) hämolysiert. Das ZNS-Gewebe wurde wie zuvor beschrieben (Ortler *et al.*, 2008) entnommen und aufbereitet. Dazu wurde das entnommene ZNS-Gewebe homogenisiert und in ein Gefäß mit einem Percoll-Dichtegradienten (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) überführt. Die mononuklearen Zellen wurden aus der Grenzschicht des 30-50% Percollgradienten nach Zentrifugation (30 min. bei 2500 u/min, ohne Bremse) isoliert. Alle auf diesen Wegen gewonnenen Zellen, wurden mit FACS-Puffer resuspendiert und gewaschen. Nachdem die membranständigen Marker mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD138 und B220 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gefärbt wurden, wurden die Zellen permeabilisiert (BD Cytfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD Biosciences), um die Antikörperfärbung für die intrazellulär liegenden leichten Ketten Kappa (IgG<sub>κ</sub>; Ak. von BD Bioscience) zu ermöglichen. Alle Färbungen erfolgten für 2 h bei RT. Nach mehrmaligem Waschen wurden die gefärbten Zellen mit einem FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) gezählt und die Daten wurden mit der FlowJo Software (Tree Star Inc., Ashland, USA) analysiert.

## 2.7. Statistische Analyse

Die computergestützte statistische Analyse erfolgte mit IBM SPSS Statistics (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) oder SigmaPlot 12 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Die angegebenen statistischen Tests wurde entsprechend der Beschaffenheit der Daten und ihrer Verteilung (Shapiro-Wilk Test) durchgeführt. Sterne in den Graphen signalisieren statistische Signifikanz (\* p<0,05, \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001). Wenn nicht anders beschrieben geben die Graphen den Mittelwert sowie die den Standardfehler an.

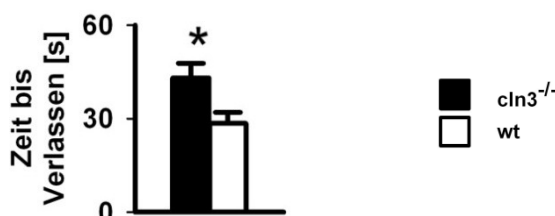
### 3. Ergebnisse A: autoimmune Mechanismen bei CLN3<sup>-/-</sup> Mäusen

Zur Untersuchung möglicher autoimmuner Erkrankungsmechanismen, insbesondere AAK-bedingter Krankheitsmechanismen bei Patienten mit JNCL, wurde eine vierteilige experimentelle Studie bei  $cln3^{-/-}$  Mäusen durchgeführt. Der erste Teil beinhaltete eine intensive und umfassende Untersuchungen des Phenotyps der  $cln3^{-/-}$  Maus hinsichtlich motorischer, kognitiver und psychiatrischer Auffälligkeiten. Ziel war es hierbei die Befunde aus bestehende Studien zu ergänzen und zu erweitern und eine Basis für die Korrelation der Symptomatik mit Befunden aus elektrophysiologischen Analysen zu schaffen. Im zweiten Teil der Studie wurde der Einfluss von AAK auf hemmende Netzwerke im RM der  $cln3^{-/-}$ -Mäuse untersucht. Im dritten Teil wurden mögliche Störungen der zerebellären Aktivität unter Normalbedingungen und bei forcierter Öffnung der Blut-Hirn-Schranke evaluiert, um mögliche Störungen in den für die Bewegungsausführung wichtigen zerebellären Netzwerken zu analysieren. Im vierten Teil der Studie wurde die Wirkung eines reduzierten Autoantikörpertiters in Folge einer pharmakologischen Depletion der Antikörper-produzierenden Plasmazellen mittels Bortezomib auf pathologische Verhaltensmuster der  $cln3^{-/-}$ -Mäuse untersucht.

#### 3.1. Angstähnliches Verhalten und Lerndefizite der $cln3^{-/-}$ -Maus

##### Screening auf angstähnliches Verhalten mittels Petrischalentest

Der Petrischalentest ist ein einfacher Test für das Explorationsverhalten von Mäusen, der es ermöglicht wiederholt Tiere auf mögliches abnormes Verhalten hin zu testen. Die bis zu 14 Monate alten  $cln3^{-/-}$ -Mäuse zeigten ein reduziertes exploratives Verhalten, wie es im Vergleich zu den wt-Mäusen anhand der verlängerten Zeit bis zum vollständigen Verlassen der Petrischale abzulesen ist (Abbildung 3.1). Dieses Ergebnis bestätigt Befunde aus unseren vorangegangenen Studien mit bis zu 7 Monate alten Tieren und kann als Hinweis auf ein möglicherweise gesteigertes angstähnliches Verhalten interpretiert werden.



**Abbildung 3.1: Petrischalentest  $cln3^{-/-}$ -Mäuse.**

$cln3^{-/-}$ -Mäuse brauchen signifikant länger um die Petrischale zu verlassen. (\*  $p < 0,05$ ; Mann-Whitney Test).

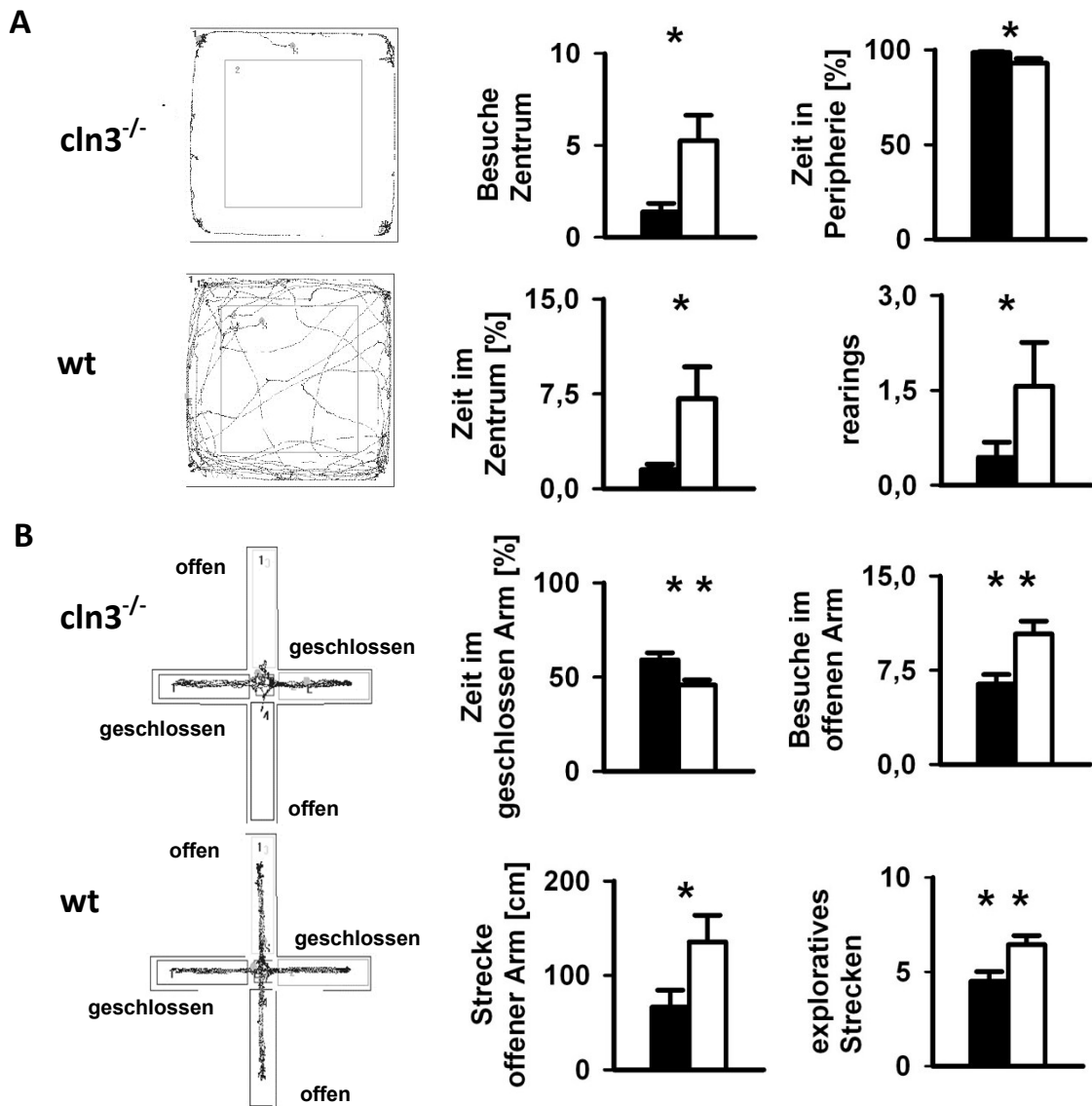
### **Gesteigertes angstähnliches Verhalten im Open Field Test**

Der OF kann neben der Analyse von freier Bewegung auch zur Analyse von angstähnlichem Verhalten genutzt werden. Die  $cln3^{-/-}$ -Mäuse zeigten in diesem Test ein gesteigertes angstähnliches Verhalten, da sie das Zentrum seltener besuchten und dort insgesamt weniger Zeit verbrachten. Die erweiterte Analyse sogenannter „Microbehavior“ ergab zudem, dass bei den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen seltener Rearings beobachtet werden konnten (Abbildung 3.2.A). Als Rearings wird Putzverhalten der Maus bezeichnet, von dem angenommen wird, dass es Entspannung und Wohlbefinden ausdrückt. Eine Reduktion der Anzahl beobachteter Rearings kann als ein Hinweis auf eine gesteigerte Ängstlichkeit gedeutet werden (Hebb *et al.*, 2002).

### **Gesteigertes angstähnliches Verhalten im Elevated Plus Maze Test**

Der EPM bietet den Mäusen die Möglichkeit sich in geschützten, geschlossenen Armen und ungeschützten, offenen Armen aufzuhalten. Vergleichbar zu den Befunden im OF hielten sich die  $cln3^{-/-}$ -Mäuse vermehrt im geschlossenen Arm auf, besuchten den offenen Arm seltener und untersuchten diesen auch weniger intensiv, wie sich aus der verringerten zurückgelegten Distanz im offenen Arm ablesen lässt. Außerdem wurde eine Verringerung der explorativen Streckbewegungen beobachtet (Abbildung 3.2.B).

Aus der Zusammenschau der drei durchgeführten Versuche zur Analyse von angstähnlichem Verhalten kann geschlossen werden, dass  $cln3^{-/-}$ -Mäuse, ähnlich wie auch Patienten mit JNCL eine deutlich gesteigerte Ängstlichkeit aufweisen.



**Abbildung 3.2: Angst-ähnliches Verhalten der *cln3*<sup>-/-</sup>-Maus.**

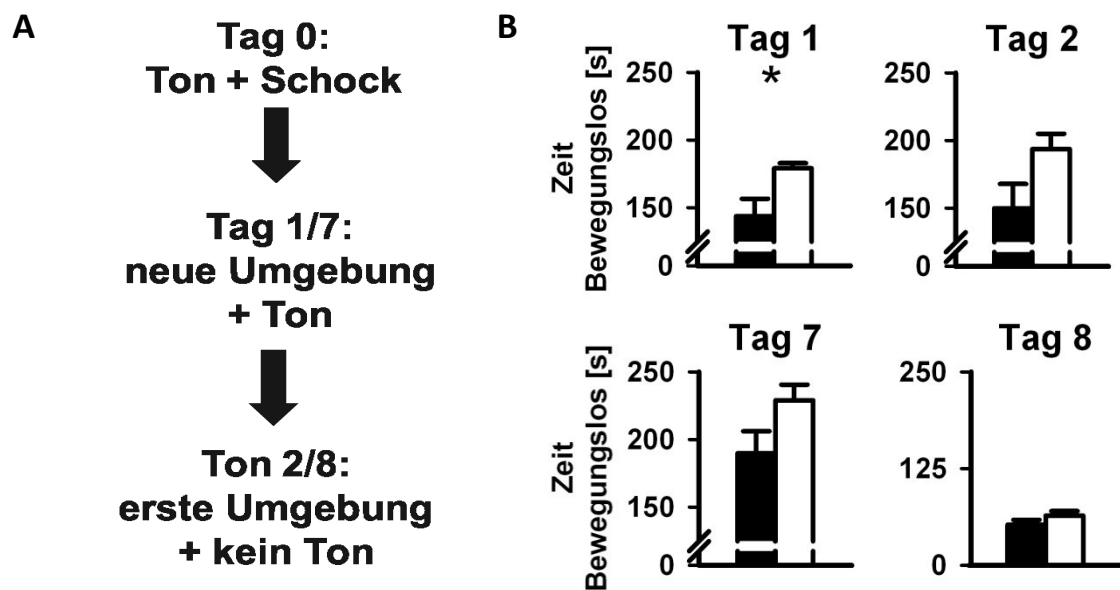
Die *cln3*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten im OF (A) und im EPM (B) ein gesteigertes angst-ähnliches Verhalten. In der linken Spalte sind representative Trackingspuren von Mäusen beider Genotypen dargestellt, wie sie während einem Experiment aufgezeichnet wurden. Die Steigerung des angst-ähnlichen Verhaltens zeigte sich durch die selteneren Besuche des Zentrums im OF und der längeren im geschlossenen Arm des EPM verbrachten Zeit und zurückgelegten Strecke. Zusätzliche Zählungen sogenannten „Microbehavior“ (rearing und stretching) zeigten auch eine Reduktion des explorativen Verhaltens an. (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; zweiseitiger ANOVA)

### Reduziertes aversives Lernen der *cln3*<sup>-/-</sup>-Maus

Einschränkungen von kognitiven Fähigkeiten werden bei Versuchstieren vor allem über die Analyse von Lernen getestet, wobei für unterschiedliche Formen des Lernens eine Reihe von Tests entwickelt wurde. Diese Tests unterscheiden sich vor allem in der Art und Komplexität der zu erlernenden Aufgabe, und ob das Lernen über positive oder negative Reize befördert wird. Bei der von Katz und Kollegen eingeführten *cln3*<sup>-/-</sup> Maus (Katz *et al.*, 1999) konnte ein geringeres Lernvermögen des JNCL-Models mittels eines Light-cued T-maze gezeigt werden (Wendt *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu dieser

Untersuchung wurde in den hier beschriebenen Versuchen aversives Lernen mittel akustischer Angstkonditionierung überprüft (Abbildung 3.3.A).

Die  $cln3^{-/-}$ -Mäuse zeigten ein gemindertetes Reizlernen 1 Tag nach der Konditionierung, wobei dieser Unterschied 7 Tage später noch graduell aber nicht mehr signifikant vermindert war. Diese Form des Lernens wird als mehrheitlich von der Funktion der Amygdala abhängig angesehen. Ein entsprechender Unterschied im kontextuellen Lernen war nicht feststellbar. Daraus lässt sich schließen, dass das eher Amygdala-abhängige Reizlernen in den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen im getesteten Alter gestört ist, während das eher Hippocampus-abhängige kontextuelle Lernen nicht oder nur unwesentlich beeinträchtigt ist (Abbildung 3.3.B.)



**Abbildung 3.3: vermindertes Reizlernen der  $cln3^{-/-}$ -Mäuse.**

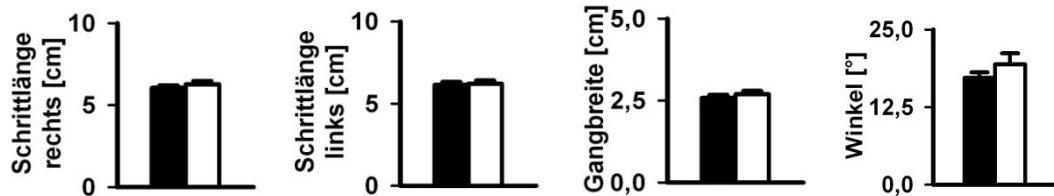
Für die Angstkonditionierung wurde den Tieren an Tag 0 ein CS und ein US gepaart präsentiert. An den Tagen 1 und 7 wurde das Amygdala-abhängige Reizlernen überprüft, an den Tagen 2 und 8 das Hippocampus-abhängige kontextuelle Lernen (A). Die  $cln3^{-/-}$ -Mäuse zeigten ein signifikant schlechteres Reizlernen an Tag 1. Der Unterschied war an Tag 7 geringer ( $p=0,067$ ). Im kontextuellen Lernen zeigten sich graduelle, aber keine signifikanten Unterschiede an Tag 2 ( $p=0,054$ ), während an Tag 8 beide Gruppen kein kontextausgelöstes Angstverhalten zeigten (\*  $p<0,05$ ; Student's T-Test).

### 3.2. Motorische Defizite in $cln3^{-/-}$ -Mäusen

Die motorischen Störungen der  $cln3^{-/-}$ -Maus wurden in einer Reihe von Tests untersucht, in Ergänzung zu schon bestehenden Studien bei den hier verwendeten und anderen genetischen Mausmodellen für die JNCL (Mitchison *et al.*, 1999; Katz *et al.*, 2008; Weimer *et al.*, 2009). Diese Analysen sollten dann Rückschlüsse auf zugrunde liegende Störung der zentralen Verarbeitungswege zulassen, bzw. mit funktionellen Untersuchungen korrelierbar sein.

### Keine Veränderungen bei der Fußabdruckanalyse bei Cln3<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die Fußabdruckanalyse dient der Quantifizierung möglicher Abweichungen des Gangbildes der Versuchstiere während der freien Bewegung. Die cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten in diesem Test in allen analysierten Merkmalen keine Abweichungen von den Kontrolltieren (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Normale Koordination bei freiem Laufen.**

Die Analyse des Gangbildes der cln3<sup>-/-</sup>- und wt-Mäuse ergab keinen Unterschied zwischen den Gruppen für die gemessenen Parameter (Schrittlänge, Gangbreite und Winkel zwischen den Hinterläufen).

### Progressive Beeinträchtigung der RotaRod-Leistungen in cln3<sup>-/-</sup> Mäusen

Der RotaRod-Test dient der Analyse motorischer Fähigkeiten von Versuchstieren unter Belastung. Zusätzlich erfordert das Laufen auf der beschleunigenden Trommel ein hohes Maß an Koordination und bietet so die Möglichkeit auch koordinative Störungen des motorischen Apparats zu quantifizieren. Der Test von 14 Monate alten cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse ergab eine leicht reduzierte Zeit auf dem RotaRod im Vergleich zu den entsprechenden wt-Tieren. Dies deutet auf eine langsame, progressive Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten der cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse hin (Abbildung 3.5.B.).

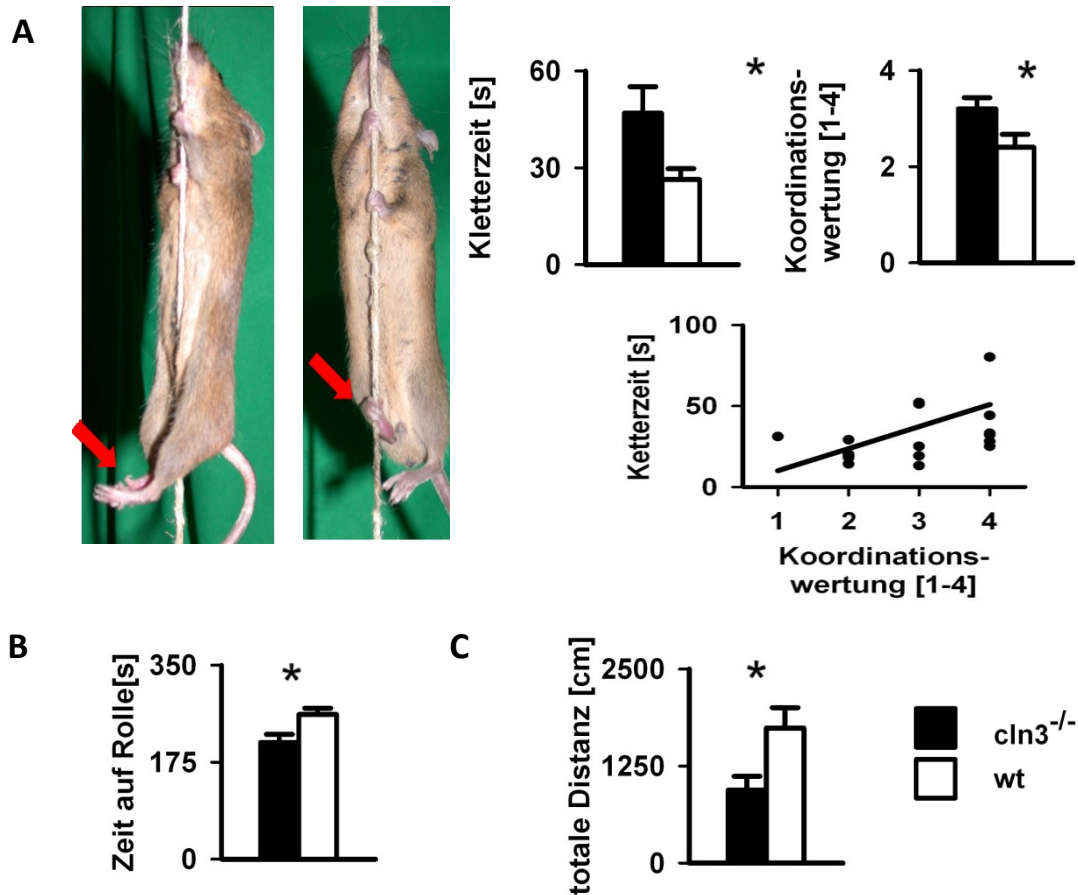
### Koordinative Beeinträchtigungen im Klettertest

Der Klettertest dient ebenso der Analyse und Quantifizierung von motorischen und koordinativen Fähigkeiten. Im Versuch zeigte sich eine deutlich verschlechterte Leistung der 14 Monate alten cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse. Zusätzlich wurde über die semiquantitative Bewertung der Bewegungskoordination eine Einschränkung der Fähigkeit zu zielgerichteter Bewegung der Extremitäten gefunden. Diese korreliert mit den verlängerten Kletterzeiten, woraus gefolgert werden kann, dass die eingeschränkte Bewegungskoordination zur schlechteren Performance der cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse im Klettertest beiträgt (Abbildung 3.5.A). Diese Befunde bestätigen eigene, frühere Versuche, bei 7 Monate alten cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse, wobei die älteren Tiere eine deutlich schlechtere Leistung zeigten, was ebenso wie im RotaRod Test auf eine progressive Beeinträchtigung der motorischen bei den cln3<sup>-/-</sup>-Mäusen hinweist.

### cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine reduzierte Gesamtstrecke bei ungezwungener Bewegung

Im OF können neben dem angstähnlichen Verhalten durch Analyse der Gesamtstrecke auch die motorischen Fähigkeiten und der Bewegungsdrang von Versuchstieren ermittelt werden. Die Gesamt-

strecke, die  $cln3^{-/-}$ -Mäuse in den durchgeführten Versuchen im Durchschnitt zurücklegten war deutlich geringer, als die der wt-Kontrollen. Dies weist im Einklang mit den zuvor beschriebenen Untersuchungen auf eine Störung der Motorik hin (Abbildung 3.5.C)



**Abbildung 3.5. Motorische Defizite der  $cln3^{-/-}$ -Maus.**

Die  $cln3^{-/-}$ -Maus braucht im Klettertest länger, um die Plattform zu erreichen. Dies kann auf eine schlechtere Koordination zurückgeführt werden, wie sie an der Nutzung der Hinterläufe während dem Klettern zu sehen ist (Pfeile). Die Kletterwertung zeigt eine positive Korrelation mit der Kletterzeit (Spearman's  $\rho = 0,606$ ;  $p \leq 0,005$ ) (A). Im RotaRod Test zeigten die Mäuse im Alter von 14 Monaten eine schlechtere Leistung (B). Im OF legten die Mäuse eine geringere Strecke zurück (C). (\* $p < 0,05$ ; A,B, Mann-Whitney Test; C, zweiseitiger ANOVA).

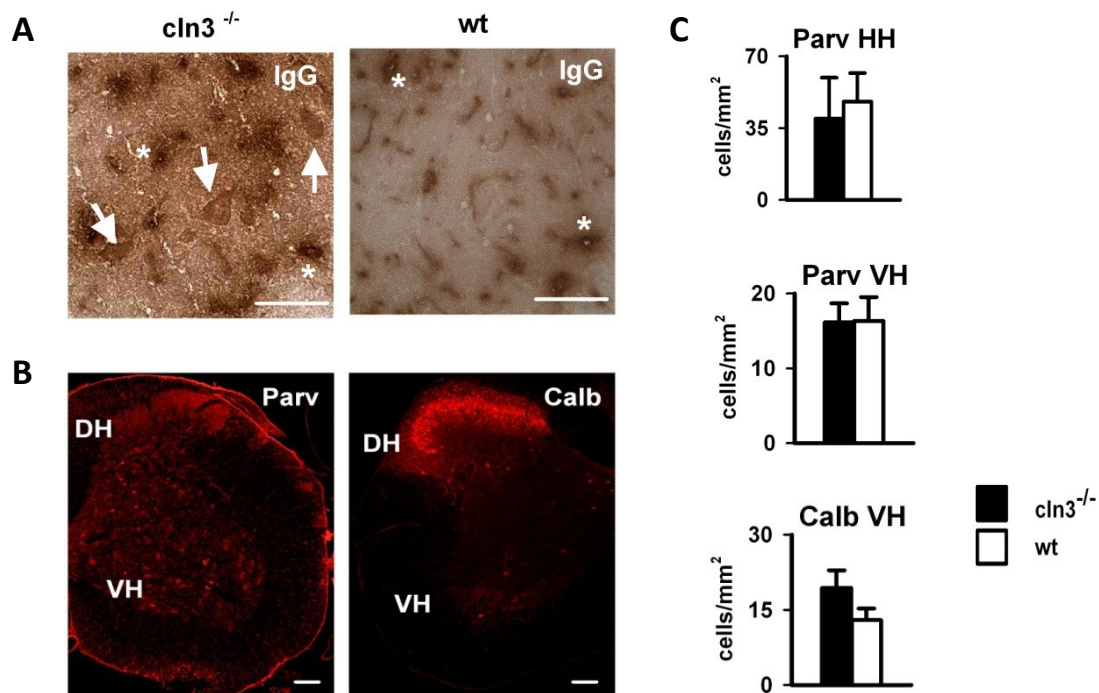
### 3.3. Normale spinale GABAerge Hemmung in der $cln3^{-/-}$ -Maus

Die spinalen Netzwerke sind von zentraler Bedeutung für die korrekte und koordinierte Ausführung von Bewegung wobei lokale Interneurone mit der modulierenden Wirkung auf Motoneurone eine wichtige Funktion haben. Eine Störung dieser inhibitorischen Netzwerke könnte eine Erklärung für die beobachteten Koordinationsstörungen der  $cln3^{-/-}$ -Maus sein.



## Nachweis von Antikörperbindung, aber unveränderte Interneuronpopulation im Rückenmark

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass es innerhalb des Hippocampus von *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu einem selektiven Verlust von GABAergen Interneuronen kommt, die eine Folge der Wirkung von Autoantikörpern sein könnte (Pontikis *et al.*, 2004). Im RM zeigte sich in histologischen Färbungen eine eindeutige zelluläre Bindung von AAK-Ablagerungen *in-vivo* (Abbildung 3.6.A). Allerdings konnten keine Unterschiede der Expression Parvalbumin- bzw. Somatostatin exprimierender Interneuronsubklassen im Rückenmark festgestellt werden (Abbildung 3.6.B und C)



**Abbildung 3.6. Histologische Analyse des Rückenmarks von *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen.**

Im ZNS von *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen zeigt sich eine starke Färbung für IgG. Neben den Gefäßen (Sterne), die auch bei den wt-Mäusen gefärbt sind, zeigen sich eindeutige zelluläre Färbungen (Pfeile) (A). Im Rückenmark unterscheiden sich die Anzahl der Parvalbumin-(Parv)- und Clabindin-(Calb)-positiven Zellen nicht zwischen *cln3<sup>-/-</sup>*- und wt-Mäusen (B,C).

## Normale frequenzabhängige Depression des Hofmann-Reflex

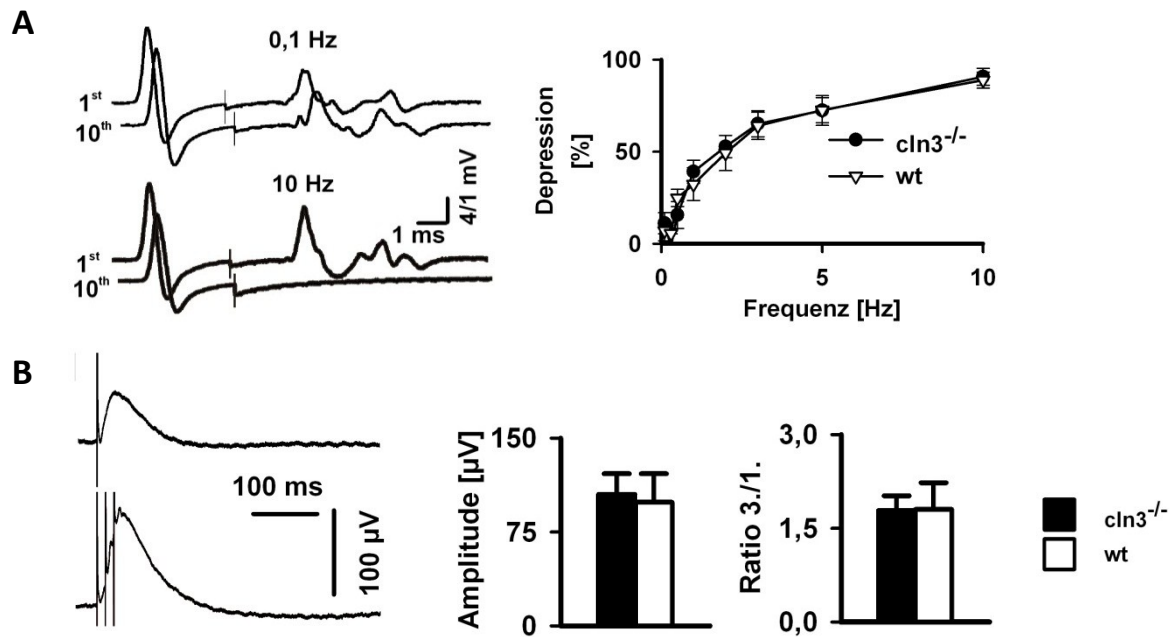
Der Hofmann Reflex (H-Reflex) ist eine elektroneurographische Methode zur Analyse des Eigenreflexbogens. Die elektrische Stimulation eines gemischten peripheren Nerven bei gleichzeitiger Ableitung der Muskelpotentiale in dem entsprechenden von diesem Nerv innervierten Muskel führt zu einer typischen Abfolge von Deflektionen der gemessenen Spannung (Abbildung 3.7.A). Der H-Reflex spiegelt hierbei Muskelkontraktionen wieder, ausgelöst von orthodromen Aktionspotentialen (APs) in den Muskelspindelafferenzen, die monosynaptisch die Motorneurone aktivieren. Bei wiederholter

Stimulation des Nervens kommt es bei höheren Stimulationsfrequenzen zu einer Depression des H-Reflex, bis hin zu einer vollständigen Blockade. An dieser aktivitätsabhängige Unterdrückung (post-activation depression) des H-Reflexes sind lokale GABAerge Interneurone maßgeblich beteiligt. In den Untersuchten *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen wurde eine den wt-Tieren entsprechende frequenzabhängige Depression des H-Reflexes gefunden (Abbildung 3.7.A). Dies weist auf keine höhergradige Funktionseinschränkung der GABAergen Interneurone im Rückenmark hin und steht im Einklang mit vorhergehenden eigenen Studien in 7 Monate alten *cln3<sup>-/-</sup>*-Tieren.

### **Unveränderte GABAerge Hinterwurzelpotentiale in der *cln3<sup>-/-</sup>*-Maus**

Um die GABAerge Transmission im RM möglichst direkt zu bestimmen wurden sogenannte Hinterwurzelpotentiale (DRP) gemessen. DRP spiegeln die präsynaptische afferente Depolarisation (PAD) der primären Afferenzen durch lokale Interneurone im Rückenmark wieder. Diese durch GABAerge, axo-axonale Synapsen ausgelöste Depolarisation der primären Afferenzen hat eine inhibitorische Wirkung und macht den Hauptteil der hemmenden Mechanismen im Rückenmark aus (Eccles et al., 1962b; Eccles et al., 1962a; Eccles et al., 1963; Rudomin and Schmidt, 1999; Rudomin, 2009). Die DRP können nach Stimulation benachbarter Hinterwurzeln an den durchtrennten Hinterwurzeln abgegriffen und quantitativ gemessen werden.

Die DRP wurden in 14 Monate alten *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen und entsprechenden wt-Kontrollen gemessen. Die Potentiale der *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäuse unterschieden sich nicht von den Potentialen der wt-Mäuse, was auf eine normale präsynaptische Inhibition und funktionsfähige Interneurone im RM der *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäuse schließen lässt (Abbildung 3.7.B). Die in den Verhaltenstests beobachteten Defizite sind nach diesen Befunden mit einer GABAergen Dysfunktion auf dem spinalen Niveau somit nicht erklärbar.



**Abbildung 3.7: Normale spinale inhibitorische Netzwerke in der cln3<sup>-/-</sup>Maus.**

Beispielspuren und Auswertung der frequenzabhängigen Depression der H-Reflex-Messungen bei cln3<sup>-/-</sup>- und wt-Mäusen (A). Die erste Auslenkung entspricht der motorischen Antwort (M-Antwort), ausgelöst durch die anterograde Stimulation des Nervus tibialis. Die zweite Auslenkung ist der H-Reflex nach monosynaptischer Transmission im RM. Gezeigt sind die erste und zehnte Spur von 10 aufeinanderfolgenden Stimuli bei den angegebenen Stimulationsfrequenzen. Bei 0,1 Hz verändert sich der H-Reflex nicht, während bei 10 Hz der H-Reflex in der zehnten Spur völlig verschwindet. Die Depression in Abhängigkeit der Frequenz ist in der Graphik gezeigt. Die Frequenz-abhängige Depression des H-Reflexes der cln3<sup>-/-</sup>- unterscheidet sich nicht von dem der wt-Mäuse. Beispielspur und Analyse der Amplituden der DRP-Messungen in cln3<sup>-/-</sup> und wt-Mäusen (B). Die obere Beispielspur zeigt eine Aufnahme nach einmaliger Stimulation, die untere eine nach dreimaliger Stimulation, die zu einer zeitlichen Summation der DRP führt. Die DRP-Amplituden sowohl nach Einzelstimulation als auch nach dreimaliger Stimulation unterscheiden sich bei cln3<sup>-/-</sup>- und wt-Mäusen nicht.

### 3.4. Analyse des Purkinje-Zell Feuerverhaltens

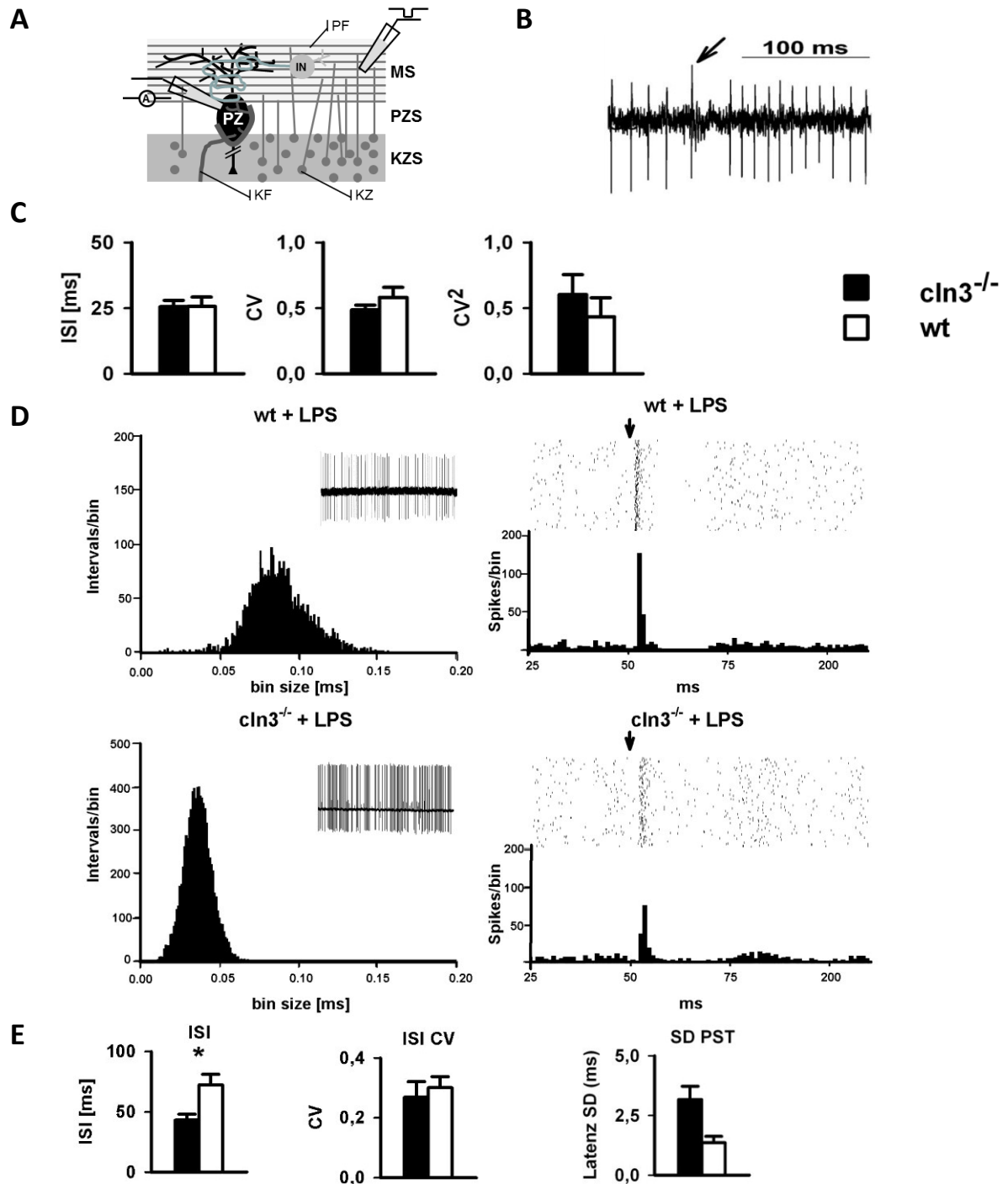
Das Zerebellum ist von zentraler Bedeutung für die Genauigkeit und Koordination von Bewegungen. Zerebellare Fehlfunktionen können zu Bewegungsstörungen führen (z.B. zerebellare Ataxien) und könnten auch die motorischen Dysfunktionen der JNCL-Patienten und der oben geschilderten motorischen und koordinativen Defizite der cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse erklären.

Die Schaltkreise des zerebellaren Cortex sind streng strukturiert und dienen dem Abgleich der aktuellen Bewegung und Position im Raum mit der beabsichtigten Bewegung zur Korrektur möglicher Abweichungen. Der zerebelläre Cortex besitzt 3 Schichten (Abbildung 3.8.A.). In der innenliegenden Schicht befinden sich die Körnerzellen (KZ), in der darüber liegenden Purkinjellschicht die großen und morphologisch auffälligen Purkinjezellen (PZ), während in der äußersten Schicht, der Molekularschicht, die Axone der Körnerzellen, die sogenannten Parallelfasern (PF), verlaufen und en passant

Kontakt zu den Dendriten einer Vielzahl von PZ aufnehmen. Außerdem befinden sich in der Molekularschicht auch lokale, inhibitorische Interneurone, die Korb- und Sternzellen, die auch von den Parallelfasern innerviert werden und selbst inhibitorisch auf die PZ wirken. Die GABAergen PZ sind die einzigen den Cortex verlassenden Projektionsneurone des zerebellären Cortex. Der Cortex wird über zwei getrennte erregende Wege innerviert, dem Moosfaserweg und dem Kletterfaserweg. Die Moosfasern bilden exzitatorische Synapsen zu einer Vielzahl von KZ, die wiederum über die Parallelfasern viele PZ innervieren, während die Kletterfasern jeweils nur eine PZ über eine große Anzahl von Synapsen erregen. Aktivität in den Kletterfasern löst komplexe Potentiale in PZ aus (complex spikes), die durch ein großes Potential zu Anfang gekennzeichnet sind, die von einer Reihe kleinerer Potentiale gefolgt werden. Dagegen löst Aktivität in den Kletterfasern einfache Potentiale (simple spike) aus, die die klassische Form eines Aktionspotentials (AP) haben (Abbildung 3.8.B).

Extrazelluläre Einzelzellmessungen der Purkinjenzellaktivität in anästhesierten *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen *in vivo* ergaben im Vergleich zu den *wt*-Tieren keine Abweichung. Dies galt auch für Tiere, bei denen durch eine LPS-induzierte Störung der BHS das ZNS für AAK leichter erreichbar war (Abbildung 3.8.C).

Hingegen ergab die Messungen der Spontanaktivität und der evozierten Aktivität der zerebellären PZ in akuten Schnitten von LPS-behandelten Tieren Unterschiede zwischen den Tieren der verschiedenen Genotypen. So wurde eine reduzierte ISI bei den *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen festgestellt, die auf eine erhöhte Erregbarkeit der PZ infolge einer Disinhibition zurückgehen könnte. Die Regularität der Spontanaktivität war mit der der *wt*-Mäuse vergleichbar. Nach Parallelfaserstimulation, die neben der direkten Erregung der PZ auch eine Feed-Forward Inhibition der PZ über lokale Interneurone auslöst, zeigte die Aktivität der PZ der *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen einen erhöhten Jitter. Dieser wurde über die Standardabweichung der Latenzen bis zum ersten AP in einem 10ms-Zeitfenster nach der Stimulation gemessen. Die Gesamtzahl an zusätzlich ausgelösten AP war hingegen gleich, was zeigt, dass die generelle Erregbarkeit der PZ in den *cln3<sup>-/-</sup>*-Mäusen nicht verändert ist.



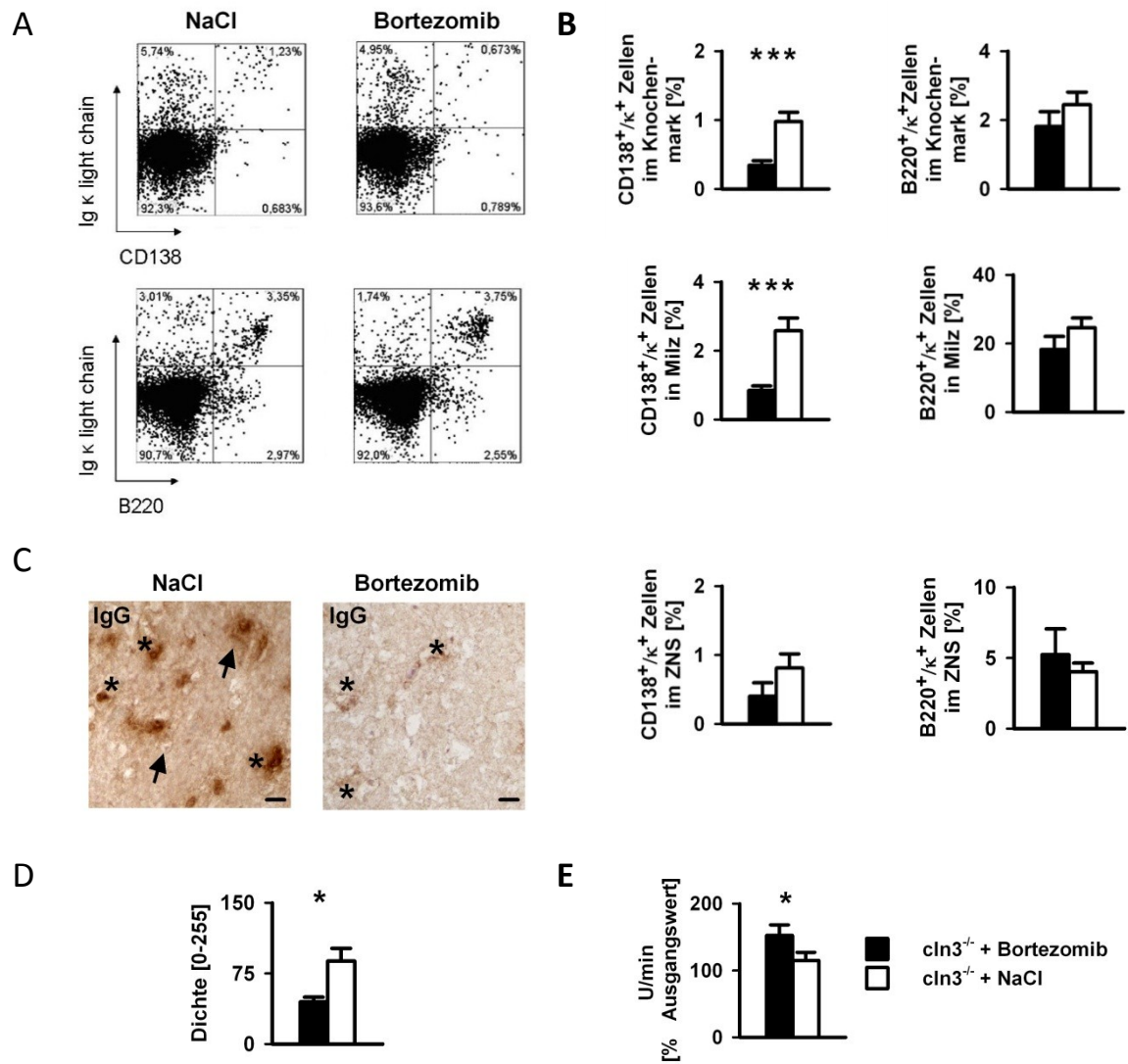
**Abbildung 3.8. Purkinjezellaktivität in-vivo und in-vitro.**

Kletter- und Parallelfasern (KF bzw. PF) bilden erregende glutamaterge Synapsen auf PZ, während lokale Interneurone (IN) GABAerge, inhibitorische Synapsen auf PZ haben (A; MS: Molekularschicht; PZS: Purkinjezellschicht; KZS: Körnerzellschicht; KZ: Körnerzellen). Typischerweise feuern PZ einfach AP mit einer Frequenz von 50 Hz, unterbrochen von komplexen AP (Pfeil)(B). Die Frequenz und die Regularität des PZ-Aktivität ist bei anästhesierten *cln3*<sup>-/-</sup>-Mäusen unverändert zu anästhesierten wt-Mäusen (C). In akuten cerebellären Schnitten ist eine erhöhte AP-Frequenz zu finden (D, linke Histogramme und E) aber keine Veränderung der Regularität (E). Die zeitliche Streuung der zusätzlichen, durch Stimulation der Parallelfaser, evozierten AP ist in den *cln3*<sup>-/-</sup>-Mäusen größer (D, rechte Spalte: exemplarische Rasterplots und Histogramme einzelner Experimente). Auffällig vor der breiteren Streuung der zusätzlichen AP und dem Wegfallen der Pause nach den evozierten AP bei der *cln3*<sup>-/-</sup>-Maus.

### 3.5. Bortezomib-induzierte Plasmazelledepletion führt zu verminderter IgG-Deposition im ZNS und zu motorischen Verbesserungen in der cln3<sup>-/-</sup>-Maus

Die JNCL ist eine komplexe Erkrankung, bei der neben den wahrscheinlichen direkten neurodegenerativen Prozessen auch autoimmun vermittelte Prozesse parallel zum Fortschreiten der Erkrankung beitragen könnten. Zur Abklärung eines AAK-vermittelten Anteils an dem Progress der Erkrankung wurde eine pharmakologische Beeinflussung des Antikörper-Titers durch Behandlung der Versuchstiere mit Bortezomib durchgeführt. Bortezomib ist ein Inhibitor des 26s Proteasoms und zur Sekundärtherapie Multipler Myelome zugelassenen. In Modellen für andere autoantikörpervermittelte Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass Bortezomib, durch die Aktivierung der „terminal unfolded protein response“ vorzugsweise kurz- und langlebige Plasmazellen depletiert und eine starke Reduktion des AAK-Titers bewirkt (Neubert *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2011).

Die Behandlung der cln3<sup>-/-</sup>-Tiere mit Bortezomib führte im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren schon nach 2 Wochen zu einer deutlichen Reduktion der antikörperproduzierenden, CD138- und κ-light-chain-positiven Plasmazellen im Knochenmark und in der Milz (Abbildung 3.9.A und B), Die B-Zell Population hingegen wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst. Dieser depletierende Effekt auf die Plasmazellen war auch nach mehrmonatiger Behandlung beobachtbar. Zusätzlich wurde auch eine deutliche Reduktion der IgG-Ablagerungen im ZNS beobachtet (Abbildung 3.9.C und D). Im RotaRod-Test wurde nach 2 Monaten Behandlung eine leichte Verbesserung der Leistung der Bortezomib-behandelten cln3<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den scheinbehandelten Tieren gefunden (Abbildung 3.9.E). Zusammengefasst weisen die Daten darauf hin, dass AAK eine Rolle beim Fortschreiten der Erkrankung im Mausmodell der JNCL spielen und dass eine gezielte Reduktion der AAK-Produktion einen positiven Effekt auf die Krankheitsentwicklung haben kann.



**Abbildung 3.9. Positive Wirkung von Bortezomib in der cln3<sup>-/-</sup>-Maus.**

Die Behandlung mit Bortezomib führt zu einer Reduktion der AAK-produzierenden Plasmazellen (A; repräsentatives FACS-Experiment; oben: Reduktion der CD138<sup>+</sup>/κ<sup>+</sup>-Plasmazellen gegenüber scheinbehandelten Tieren; unten: B220<sup>+</sup>-Zellen werden nicht beeinflusst). Die Zahl der CD138<sup>+</sup>/κ<sup>+</sup>-Plasmazellen ist in der Milz (\*\*\*)  $p < 0,001$ , Mann-Whitney Test) und Knochenmark (\*\*\*)  $p < 0,001$ , T-Test) signifikant reduziert. Im ZNS sind die Plasmazellen um die Hälfte reduziert. Die B220<sup>+</sup>/κ<sup>+</sup>- B-Zellen werden nicht beeinflusst (B). Nach 7 Monaten Behandlung mit Bortezomib ist eine Reduktion der IgG-Ablagerungen (C; Pfeile: zellgebundenes IgG, Sterne: IgG in/um Blutgefäße) detektierbar. (D). Nach 2 Monaten Behandlung ist eine signifikante Verbesserung der RotaRod-Leistung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren feststellbar (E) (\*  $p < 0,05$ , Mann-Whitney Test).

## 4. Ergebnisse B: Experimente mit AAK gegen Amphiphysin

Aus vorangegangenen Studien gibt es klare Hinweise auf eine AAK-vermittelte Pathogenese des SPS. Erfolgreiche Reproduktion der motorischen Symptome und eine verminderte spinale, GABAerge Inhibition nach passivem Transfer von Amph-AAK (Sommer *et al.*, 2005; Geis *et al.*, 2010), Induktion von angstähnlichem Verhalten in Ratten nach passivem Transfer von GAD65-AAK (Geis *et al.*, 2011) und durch Amph-AAK veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme in embryonalen Motorneuronen *in-vitro* (Geis *et al.*, 2009), weisen stark auf einen vermutlich autoimmun bedingten Pathomechanismus hin. In dieser Arbeit wurden weitere Experimente durchgeführt um diese Hypothese weiter zu untersuchen. Zunächst wurde mittels Patch-clamp Experimenten in hippocampalen Schnitten überprüft, ob Amph-AAK GABAerge synaptische Ströme direkt beeinträchtigen können. Zudem wurde untersucht, ob ein passiver Transfer von Amph-IgG, entsprechend zu den Beobachtungen für GAD65-AAK, angstähnliches Verhalten in Ratten induzieren kann. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine aktive Immunisierung zu SPS ähnlichen Symptomen wie nach passiv-Transfer der Patienten-AAK führt.

### 4.1. AAK gegen Amphiphysin beeinträchtigen die GABAerge synaptische Übertragung

Die Messungen wurden aus verschiedenen Gründen an Körnerzellen des hippocampalen Gyrus dentatus (GD) durchgeführt: zunächst sind die hier vorhandenen GABAergen Synapsen lokaler GABAerger Korbzellen in der Literatur ausführlich charakterisiert (Kraushaar and Jonas, 2000; Kerr *et al.*, 2008), so dass eine Vielzahl von Vergleichsdaten zur Verfügung steht. Außerdem sind die Netzwerkstrukturen des GD klar gegliedert, wodurch die Gefahr von Fehlinterpretation aufgrund komplexer Netzwerke vermieden wird. Zudem stellen die Körnerzellen aufgrund ihrer einfachen Morphologie und der somanahen GABAergen Synapsen ein ideales Untersuchungsobjekt für inhibitorische synaptische Ströme dar.

#### Normale inhibitorische postsynaptische Miniaturströme nach Amph-AAK-Inkubation

Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme (mIPSC) sind postsynaptische Ströme, die auf die Transmitterbindung des Inhaltes von meist nur einem präsynaptischen Vesikels zurückgehen. Sie können in Gegenwart von TTX oder bei sehr geringen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gemessen werden, da diese Bedingungen die Wahrscheinlichkeit für eine synchrone Vesikelfreisetzung vermindern. Frequenz, Amplitude und Kinetik der mIPSC hängen postsynaptisch vor allem von der Zahl der Rezeptoren, ihrer Bindungsaffinität und ihrer Öffnungswahrscheinlichkeit, sowie der Lokalisation der Synapse ab. Präsynaptisch beeinflussen vor allem die Menge an Transmitter pro Vesikel und die Freiset-



zungswahrscheinlichkeit die mIPSC. Zusätzlich spielen sowohl die Transmitterwiederaufnahmemechanismen und die Morphologie der Synapse eine Rolle. Starke Endozytosefehlfunktionen können zu Veränderungen von Quantalereignissen führen, wie z.B. in neuronalen Zellen eines Mausmodells mit Defizient für Dynamin (Ferguson *et al.*, 2007).

Die mIPSC, gemessen an den Körnerzellen des GD nach Inkubation der hippocampalen Schnitte mit humanen Amph-AAK in Gegenwart von TTX, unterschieden sich weder in ihrer Frequenz noch in ihrer Kinetik von den mIPSC in den Schnitten, die mit Kontroll-IgG behandelt wurden (Abbildung 4.1.A). Dies weist darauf hin, dass die Amph-AAK, zumindest nach kurzer Inkubation, keinen direkten Einfluss auf postsynaptische Rezeptoren, die Bildung von funktionstüchtigen Vesikeln und deren Freisetzung bei geringer synaptischer Aktivität haben.

### **Unveränderte spontane und evozierte IPSC nach Amph-AAK-Inkubation**

Im Gegensatz zu den mIPSC werden spontane und einzel-evozierte IPSC (sIPSC und eIPSC) unter Bedingungen gemessen, die eine normale axonale Reizweiterleitung und eine normale präsynaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit gewährleisten. Die sIPSC gehen überwiegend auf die synchrone Freisetzung von mehreren Vesikeln infolge eines präsynaptischen AP zurück. Ihre Amplitude, Frequenz und Kinetik hängt weitestgehend von den gleichen Faktoren ab, wie die mIPSC, wobei die Frequenz zusätzlich von der Gesamtaktivität der im Schnitt vorhandenen Netzwerke abhängig ist.

Bei eIPSC werden in präsynaptischen Neuronen bzw. in ihren Axonen Aktionspotentiale über kurze depolarisierende Ströme oder Spannungsveränderungen ausgelöst. Im Falle der hier verwendeten sogenannten Minimalstimulation geht man davon aus, dass im Idealfall nur ein Axon durch elektrische Stimulation angeregt wird, wodurch man eine gute Reproduzierbarkeit der Messung erreichen kann. Dabei ist aber zu beachten, dass die Zahl der Fehler (kein messbares IPSC nach Stimulation) neben synaptischen Fehlern auch auf Fehlstimulationen beruht, da die Stimulationsstärke nahe der Erregungsschwelle gewählt wird.

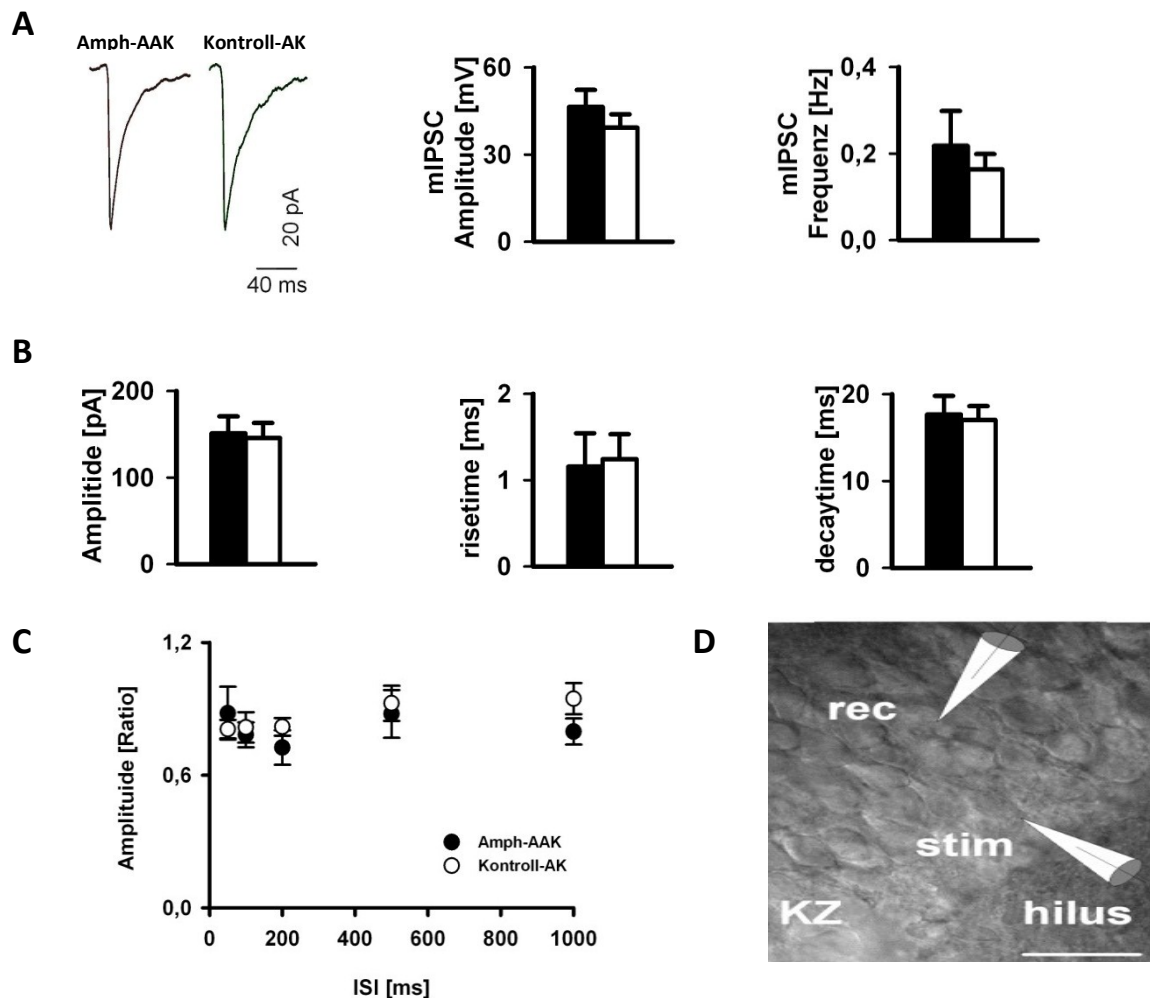
Sowohl sIPSC, als auch eIPSC wurden durch die Inkubation mit Amph-AAK nicht beeinflusst. Die Amplitude, die „risetime“ (Anstiegszeit) und die „decaytime“ (Zeit des Stromabfalls) unterschieden sich nicht zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 4.1.B).

### **Amph-AAK haben keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität bei geringer Aktivität**

Postsynaptische Ströme hängen auch von vorangegangener Aktivität ab. Ein Weg, um den Einfluss von vorheriger Aktivität auf die aktuelle synaptische Übertragung zu untersuchen, ist die Durchführung sogenannter Paarpuls-Experimente, bei denen die präsynaptische Zelle zweimal kurz hintereinander stimuliert wird. Dabei wird das Interstimulus-Intervall (ISI) variiert. Abhängig von der Synapse,

dem ISI und den Versuchsbedingungen kommt es dabei zu einer Depression (PPD) oder einer Fazilitierung (PPF) des zweiten PSC im Verhältnis zum Ersten. Dabei spielen präsynaptisch vor allem die Zahl der freisetzbaren Vesikel, ihre Freisetzungswahrscheinlichkeit und die Menge an intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  eine Rolle (Debanne *et al.*, 1996).

Im Falle der hier untersuchten GABAergen Synapsen wurde bei allen ISI eine PPD gefunden. Bei einem ISI von 1000ms wurden keine Unterschiede zwischen den Amplituden nach der 1. und der 2. Stimulation gefunden. Die Größe der PPD unterschied sich nicht zwischen den Zellen in Amph-AAK und Schnitten nach Behandlung mit Kontroll-IgG (Abbildung 4.1.C). Dies zeigt, dass Amph-AAK bei geringer Aktivität keinen Einfluss auf die Freisetzungswahrscheinlichkeit von präsynaptischen Vesikeln haben.

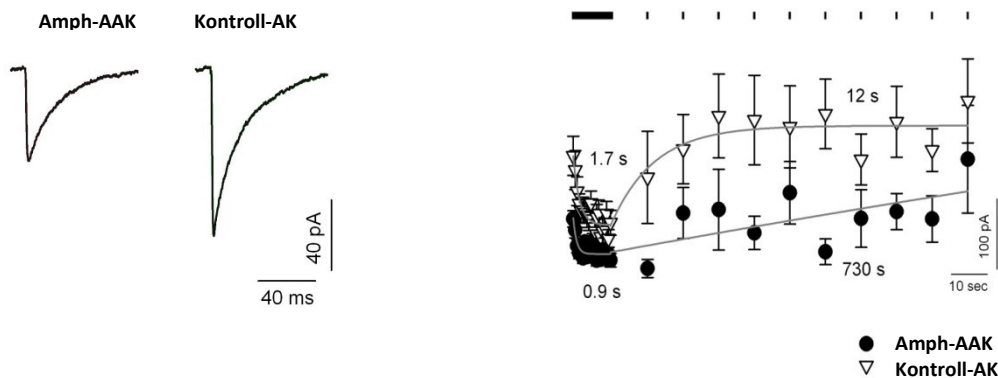


**Abbildung 4.1. mIPSC und IPSC werden durch Amph-AAK nicht beeinflusst**

Die Amplitude und die Häufigkeit der mIPSC verändert sich im hippocampalen Schnitt nicht durch die Inkubation mit Amph-AAK (A). Amplitude, Rise- und Decaytime unterscheiden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen (B). Auch die Kurzzeitplastizität ist unverändert, da die vergleichbaren Depressionen der zweiten Antworten in beiden Gruppen gemessen wurden (C). Die Patch-Clamp-Ableitungen wurden an Körnerzellen der Gyrus Dentatus durchgeführt. Die Minimalstimulation der GABAergen Afferenzen erfolgte im Abstand von 100-200 $\mu\text{M}$  (D).

## Amph-AAK-induzierte Störung der synaptischen Transmission bei erhöhter Aktivität

Zur Analyse der Robustheit der synaptischen Transmission bei fortdauernder Aktivität wurde eine repetitive Stimulation mit hoher Frequenz durchgeführt. Dieses Paradigma führt dazu, dass die Rate an ausgeschütteten Vesikeln die Menge an Vesikeln übersteigt, die aus dem Reservepool und der Wiedergewinnung durch Endozytose für die weitere Sicherstellung der synaptischen Übertragung bereit gestellt werden können. Bei einer Stimulation mit 10 Hz zeigten die Präparate, die mit Amph-AAK inkubiert waren, eine beschleunigte Depression der eIPSC Amplituden und eine verlangsamte Regeneration der eIPSC nach der hochfrequenten Stimulation (Abbildung 4.2). Diese Beobachtung ist mit der Hypothese einer gestörten Endozytose durch Amph-AAK und nachfolgend verminderter Bereitstellung von synaptischen Vesikeln für die synaptische Übertragung gut erklärt.



**Abbildung 4.2. Beeinträchtigung der synaptischen Transmission durch Amph-AAK bei hochfrequenter Stimulation**

Die Analyse der eIPSC während hochfrequenter Stimulation (10 Hz) ergab eine signifikant niedrigere Amplitude in Amph-AAK behandelten Schnitten während der ersten Phase der Stimulationsfolge ( $p < 0,001$  für Stimuli 10-20,  $p < 0,05$  für Stimuli 20-30) und ein der Erholungsphase (0,1 Hz;  $p < 0,05$ ; native-amphAB:  $n=7$ , control IgG:  $n=10$ ). Die Beispielspuren zeigen gemittelte Spuren von Experimenten während der hochfrequenten Stimulation. Während der hochfrequenten Stimulation sinken die Amplituden der GABAergen eIPSC in Amph-AAK behandelten Gehirnschnitten schneller als in mit Kontroll-AK behandelten Schnitten ( $\tau=0,9s$  vs.  $1,7s$ ). Außerdem erholten sich die eIPSC langsamer ( $\tau=730s$  vs.  $12s$ ).

## 4.2. Passiver Transfer von humanen Amphiphysin-AAK in Ratten induziert ängstähnliches Verhalten

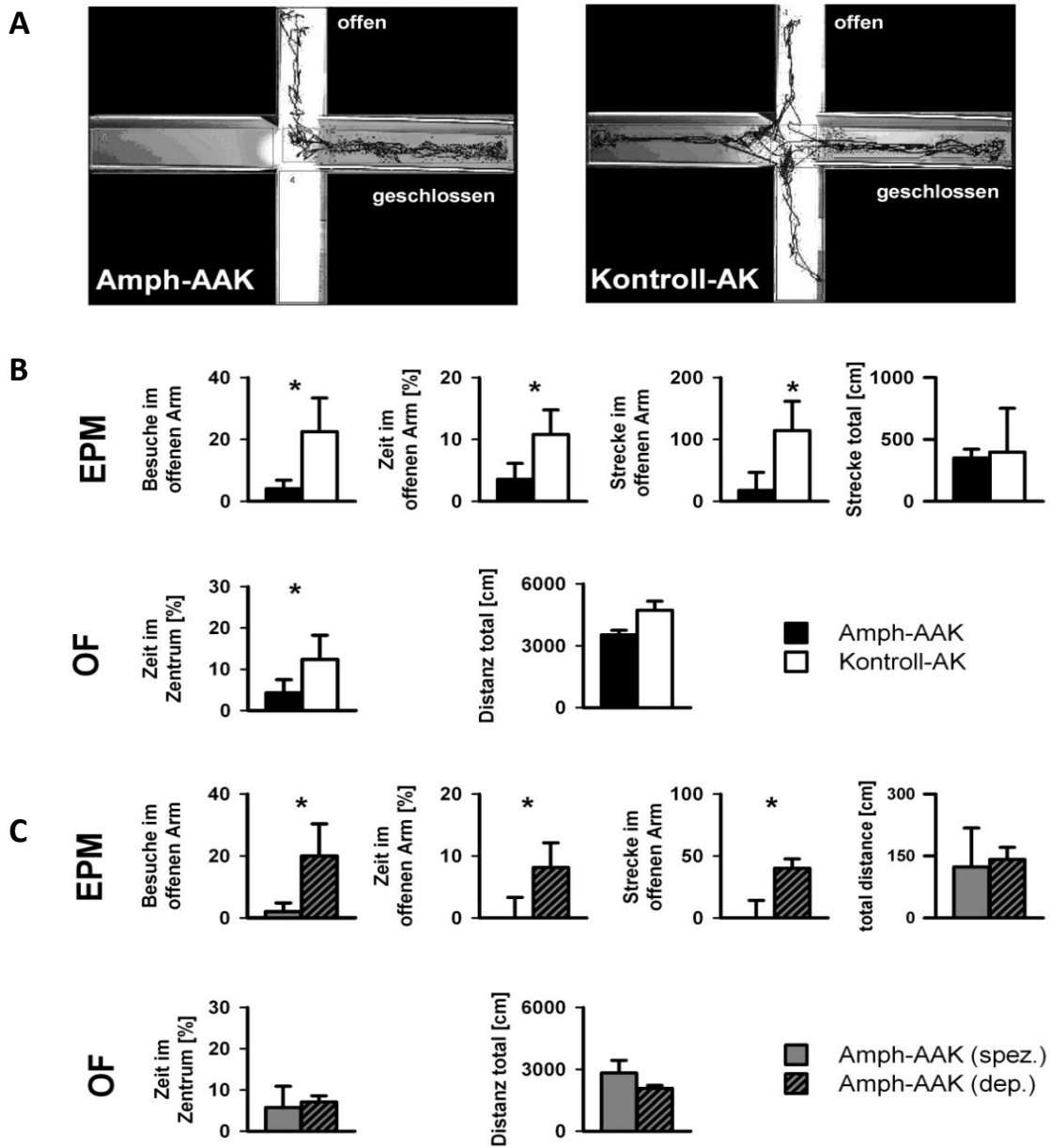
Angst und Phobien gehören neben der Muskelsteifheit und -spasmen zu den Kernsymptomen des SPS (Dalakas, 2009; Holmoy and Geis, 2011). Die Induktion von motorischen Symptomen in Versuchen durch passiven Transfer pathogener Amph-AAK von SPS Patienten wurde in 2 Modellen gezeigt (Sommer *et al.*, 2005; Geis *et al.*, 2010).

### **Amph-AAK können angstähnliches Verhalten in Ratten induzieren**

Zur Prüfung von angstähnlichem Verhalten wurde die Wirkung der nativen AAK-Fraktion einer SPS Patientin mit hohen Titern an Amph-IgG im Vergleich zu Kontroll-IgG in Versuchsratten untersucht. Die humanen Amph-AAK wurden selektiv mittels eines implantierten i.th. Katheters in den Subarachnoidalraum appliziert.

Tiere, die mit Patienten-AAK behandelt wurden besuchten seltener die offenen Arme im EPM, hielten sich kürzer in den offenen Armen auf und legten in diesen Armen auch eine geringere Strecke zurück. Außerdem hielten sich diese Tiere auch weniger im Zentrumsbereich des OF auf. Die grundlegende Aktivität unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen, da die während der Testung zurückgelegte Gesamtstrecke sowohl im EPM, als auch im OF vergleichbar war. Zusammengekommen weisen diese Befunde auf ein gesteigertes angstähnliches Verhalten hin, was durch den i.th. passiven Transfer von Patienten IgG verursacht wurde (Abbildung 4.3.A und B).

Um die Hypothese zu erhärten, dass die Amph-AAK der pathogene Teil der IgG-Fraktion sind, wurde eine Gruppe von Tieren mit affinitätsgereinigten Amph-AAK behandelt. Eine andere Gruppe von Versuchstieren wurde mit einer IgG Fraktion der SPS Patientin injiziert, die zuvor durch Affinitätschromatographie mit dem rekombinanten Antigen von Amph-AAK depletiert wurde. Auch hier zeigte sich eine signifikante Induktion von angstähnlichem Verhalten nur in der Versuchsgruppe, die Amph-AAK i.th. verabreicht bekam (Abbildung 4.2.C).



**Abbildung 4.3. Amph-AAK induzieren angstähnliches Verhalten in Ratten.**

Im EPM (Beispielspuren in A), besuchten die mit Amph-AAK behandelten Tiere den offenen Arm seltener, hielten sich kürzer in diesem auf und legten eine kürzere Strecke in diese zurück, was einen angst-ähnlichen Phänotyp anzeigt (\*  $p < 0,05$ ; B obere Zeile). Parallel dazu hielten sich die Amph-AAK behandelten Tiere auch weniger im Zentrum des OF auf. Die lokomotorische Aktivität, gemessen über die in der gesamten Versuchszeit zurückgelegte Strecke, unterschied sich nicht zwischen den beiden Behandlungsgruppen (B). Ratten die mit spezifischen Amph-AAK behandelt wurden zeigten einen ähnlichen Phänotyp, während Tiere, die mit der IgG-Fraktion des gleichen Patienten nach Depletion des Amph-AAK behandelt wurden, keinen angstlichen Phänotyp hatten (C).

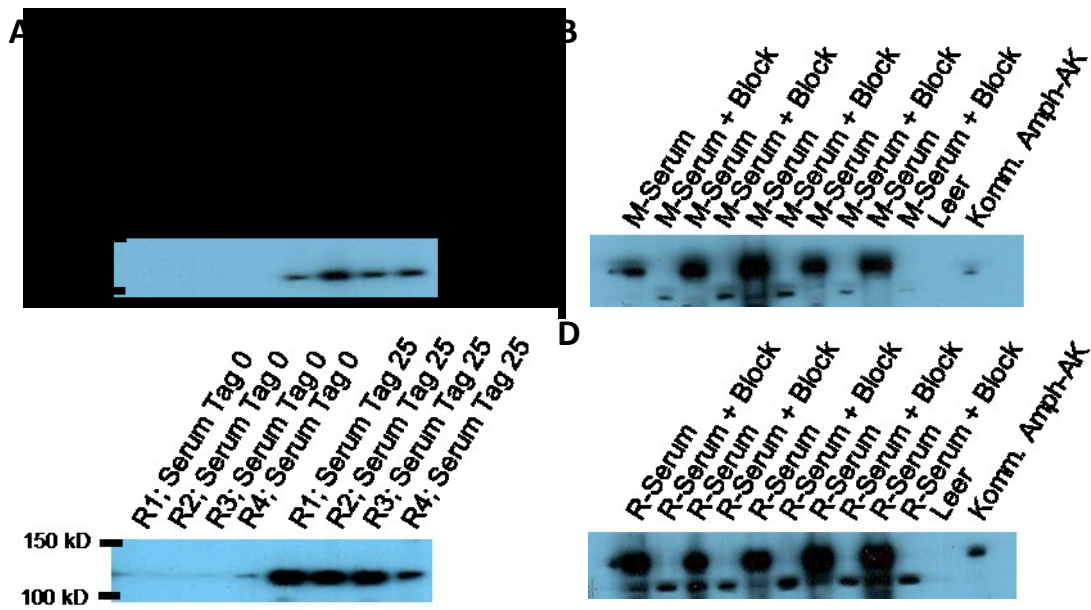
### **4.3. Aktive Immunisierung gegen Amphiphysin induziert subklinische Symptome in Mäusen**

Die Witebsky Postulate nach denen ein Krankheitsgeschehen als autoimmun-vermittelt definiert werden kann, fordert ein Tiermodell mit einer dem menschlichen Krankheitsbild analogen Symptomatik (Rose and Bona, 1993; Marmont, 1994). Für vermeintliche AAK-vermittelte Erkrankungen kann dieses Modell entweder über passiven Transfer der humanen AAK in Versuchstiere oder über aktive Immunisierung gegen das vermutete Antigen geschaffen werden. Die aktive Immunisierung bietet den Vorteil der leichteren Reproduzierbarkeit und ist unabhängig von humanem Patientenmaterial.

In Rahmen dieser Versuche wurden sowohl Ratten als auch Mäuse gegen das vollständige humane Protein Amphiphysin immunisiert. Die Immunisierung wurde mittels Westernblot und Immunhistochemie überprüft. Außerdem wurde das Verhalten der Tiere getestet und es wurde der H-Reflex gemessen, um mögliche Dysfunktionen der spinalen Hemmung nachzuweisen, die in den vorherigen Versuchen nach passivem Transfer von humanen Amph-AAK in Ratten detektierbar waren.

#### **Erfolgreiche Immunisierung von Ratten und Mäusen gegen humanes Amphiphysin**

Die Immunisierung wurde sowohl mit Ratten als auch mit Mäusen durchgeführt, um mögliche Artunterschiede in der Immunisierbarkeit und der Ausprägung biologischer Effekte zu erfassen. In beiden Spezies konnten nach erfolgter Immunisierung im Serum AAK gegen Amphiphysin nachgewiesen werden. Die Seren enthielten IgG, die ein Antigen mit der Amphiphysin entsprechenden Größe detektierten (Abbildung 4.4.A und C). Das Signal war weiterhin durch Präinkubation mit humanem Amphiphysin blockierbar (Abbildung 4.4.B und D), sodass man die Immunisierung gegen AmphP als erfolgreich werten kann.



**Abbildung 4.4. Serum-AK immunisierter Tiere bindet Antigen bei 128 kD.**

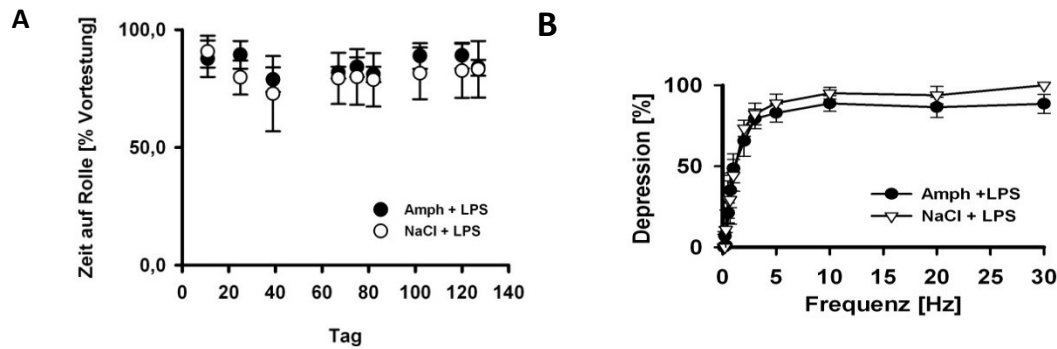
AK im Serum von immunisierten Mäusen (A) und Ratten (C) binden an Antigen mit einem Molekulargewicht von ungefähr 128 kD. Diese Bindung ist spezifisch, da ein Block der Immunreaktion durch Präinkubation mit dem zur Immunisierung verwendeten AmphP möglich ist (B: Mausseren; D: Rattenserum).

### Subklinische Symptome in immunisierten Mäusen

Die immunisierten Mäuse und die entsprechenden Kontrolltiere wurden vor und nach der Immunisierung, sowie nach erfolgter BHS-Öffnung mittels LPS-Behandlung auf ihre motorischen Fähigkeiten getestet. Die Testung auf angstähnliches Verhalten erfolgte nur nach der BHS-Öffnung um Kontamination durch Lerneffekte zu vermeiden.

Für die immunisierten Mäuse ergab sich weder bei den motorischen Testungen im Rotarod und bei der Ganganalyse, noch bei den psychiatrischen Testungen im OF und im EPM ein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Kontrolltieren (Abbildung 4.5.A).

Die Messung der frequenzabhängigen Depression des H-Reflexes hingegen ergab für die mit Amphiphysin immunisierten Mäuse hingegen eine unvollständige Depression der H-Antwort, selbst bei hohen Frequenzen. Während bei einer Stimulationsfrequenz von 30 Hz bei den Kontrolltieren immer eine 100%ige Depression gefunden wurde, lag diese bei den immunisierten Tieren nach BHS-Öffnung bei 88,5% (SEM: 5,8), die der Tiere ohne BHS-Öffnung bei etwa 94,1 (SEM: 4,4) (Abbildung 4.5.B). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Amph-AAK die synaptische Transmission im RM der Mäuse zu einem gewissen Grad beeinträchtigen, der aber nicht zu einer starken Einschränkung der Motorik bei den Verhaltensuntersuchungen führt.



**Abbildung 4.5. Normale Motorik aber veränderter H-Reflex in immunisierten Mäusen.**

Die Immunisierung gegen Amphiphysin und anschließende kurzzeitig Öffnung der BHS durch LPS induziert keine SPS-typischen Symptome und beeinträchtigt auch nicht die motorischen Fähigkeiten (A). Die frequenzabhängige Depression des H-Reflexes scheint zu einem gewissen Grad beeinträchtigt, da diese selbst bei sehr hohen Frequenzen in den gegen Amphiphysin immunisierten Tieren nie 100% erreicht (B).

### Starke Nebenwirkung der milden EAE zur BHS-Öffnung bei Ratten

Wie in den Methoden beschrieben, wurde bei den Immunisierungsversuchen mit Ratten versucht, die BHS mittels einer mild ausgeprägten EAE durch Injektion enzephalithogener T-Zell-Blasten zu öffnen. Hierzu konnte in Vorversuchen die nötige Anzahl an T-Zell-Blasten evaluiert werden, die zwar zu einer Öffnung der BHS führt, aber nur sehr geringgradige Symptome einer EAE hervorruft (Boettger et al., 2009). Bei der Mehrzahl der Tiere aller Behandlungsgruppen mit aktiver Immunisierung mit CFA führte die EAE-Induktion allerdings zu schwerwiegenden EAE-typischen Symptomen (höhergradige Paresen), die eine sinnvolle Auswertung der Daten hinsichtlich eines möglichen Amph-AAK-vermittelten Effekts unmöglich machten. Denkbar ist hier ein Zusammenhang der Stärke der Immunreaktion nach Induktion der EAE mit der zuvor erfolgten aktiven Immunisierung. Deshalb wurde bei Ratten auf die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen verzichtet.



## 5. Diskussion

In dieser Arbeit wurden mögliche autoimmun vermittelte Krankheitsmechanismen an zwei unterschiedlichen Krankheitsmodellen untersucht. Die JNCL ist eine hereditäre neurodegenerative Erkrankung, bei der AAK gegen GAD65 und  $\alpha$ -Fetoprotein identifiziert wurden (Jalanko and Braulke, 2009). Das Stiff Person Syndrom ist eine idiopathische oder paraneoplastische Erkrankung, bei der unter anderem AAK gegen GAD65 und Amphiphysin im Serum und Liquor von Patienten nachweisbar sind (Holmoy and Geis, 2011). Für beide Krankheiten gibt es Hinweise und Belege für eine pathogene Rolle der AAK bei Entstehung und Fortschreiten der Erkrankung. Weiterer Forschungsbedarf besteht außer der Klärung der pathogenetischen Relevanz der assoziierten AAK vor allem hinsichtlich der pathophysiologischen Mechanismen. Sowohl für das SPS als auch für die JNCL konnten in dieser Arbeit in experimentellen Modellen stichhaltige Befunde für AAK-vermittelte Dysfunktionen erarbeitet werden, die bei der Entstehung der Symptome beider Erkrankungen relevant sein können.

### 5.1. Diskussion der Experimente mit $cln3^{-/-}$ -Mäusen

In der  $cln3^{-/-}$ -Studie konnte die Beschreibung des Phänotyps dieses Mausmodells der JNCL in Ergänzung zu bereits publizierten Beobachtungen vertieft und signifikant ergänzt werden. Neben Beschreibung und Quantifizierung der begleitenden Ataxie konnten eine deutliche Steigerung des angstähnlichen Verhaltens und eine Reduktion des Angst-induzierten Lernens in der  $cln3^{-/-}$ -Maus gezeigt werden. Diese zusätzlichen Befunde sind ebenfalls Bestandteil des klinischen Symptomkomplexes der JNCL. Des Weiteren wurden die Funktion GABAerger Netzwerke im Rückenmark und dem Zerebellum durch elektrophysiologische Messungen analysiert. Spinal fanden sich keine Auffälligkeiten, wohingegen sich im Kleinhirn eine verminderte Regularität des Feuerverhaltens und eine Erhöhung der Entladungsfrequenz der Purkinje-Zellen zeigte, was einer verminderten lokalen GABAergen Hemmung attribuiert werden kann. Zur Prüfung, ob die AAK in der Entstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung eine Rolle spielen wurden 2 gegenläufige Versuchsansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurde die Durchlässigkeit der BHS durch eine Behandlung mit LPS gesteigert und somit den AAK der Zutritt zum ZNS Kompartiment erleichtert. Im zweiten Ansatz wurde die Produktion von AAK durch pharmakologische Depletion des Plasmazellen reduziert und die Auswirkung auf die Symptomatik der  $cln3^{-/-}$ -Maus analysiert.

#### **Angstähnliches Verhalten in der $cln3^{-/-}$ -Maus**

Neben den weithin bekannten Krankheitssymptomen der JNCL, wie Blindheit, Krampfanfälle und Verlust von motorischen und kognitiven Fähigkeiten, treten bei JNCL-Patienten auch regelmäßig psychi-

atrische Symptome auf. Dazu zählen gesteigerte Angst, aggressives Verhalten, Depressionen, Halluzinationen und psychotische Symptome. Die Komplexität und Variabilität der auftretenden Symptome spiegeln dabei die Vielzahl der in der Krankheit betroffenen Gehirnregionen wieder (Bäckman et al., 2005). Die psychiatrischen Symptome können im Verlauf der Krankheit unterbewertet bzw. sogar übersehen werden, da die Diagnose aufgrund der Sprachproblem und kognitiven Einschränkungen der Patienten schwierig ist und es keine umfassenden Studien zu dem psychiatrischen Symptomkomplex der JNCL gibt.

Die Analyse des angstähnlichen Verhaltens der  $cln3^{-/-}$ -Tiere ergab eine mit dem Alter zunehmende Ängstlichkeit und abnehmendes exploratives Verhalten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Des Weiteren wurde in Einklang mit vorherigen Experimenten, in denen ein lichtreiz-basierter T-maze verwendet wurde (Wendt et al., 2005), eine Reduktion des Angst-konditionierten Lernen bei den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen gefunden. Das hier erstmals beschriebene gesteigerte angstähnliche Verhalten der  $cln3^{-/-}$ -Mäuse zeigt, dass diese auch als Modell für bestimmte Teilbereiche des psychiatrischen Symptomkomplexes dienen kann. Das Angstverhalten wurde auch deshalb in den  $cln3^{-/-}$ -Tieren untersucht, weil psychiatrische Symptome, insbesondere gesteigerte Angst, auch in anderen mit GAD65-AAK assoziierten ZNS-Erkrankungen verbreitet sind, beispielsweise bei dem SPS und der anti-GAD65-AAK positiven Enzephalitis. Interessanterweise spiegeln diese Befunde die Veränderungen des angstähnlichen Verhaltens und der Lerndefizite in der GAD65 knockout Maus wieder (Kash et al., 1999; Stork et al., 2003; Sangha et al., 2009). Im Falle des GAD65-AAK assoziierten SPS scheint das gesteigerte Angstverhalten abhängig von der AAK-Wirkung im ZNS zu sein, da sich das angstähnliche Verhalten in Versuchstieren durch i.th. passiven Transfer humaner AAK reproduzieren lässt (Geis et al., 2011). Vor dem Hintergrund, dass GAD65-AAK im Serum von  $cln3^{-/-}$ -Mäusen die GAD-Aktivität *in vitro* zu senken (Chattopadhyay et al., 2002c), liegt die Hypothese nahe, dass die GAD65-AAK in den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen direkt zu der Steigerung des angstähnlichen Verhalten beitragen.

Ausgehend von den vorliegenden Untersuchungen kann nun versucht werden, zum einen die neurobiologischen Mechanismen des Angstverhaltens als auch mögliche Behandlungsverfahren in dem Modell der  $cln3^{-/-}$  Maus zu untersuchen. Erkenntnisse aus solchen Untersuchungen können in Zukunft einen Einfluss auf die Behandlung der JNCL-Patienten haben und vor allem zur Steigerung der Lebensqualität der schwer betroffenen jungen Patienten beitragen.

Die Lerndefizite der  $cln3^{-/-}$ -Maus, wie sie hier in Experimenten nach Angstkonditionierung gefunden wurden, scheinen vornehmlich das reizbedingte Lernen zu betreffen, während das umgebungsbedingte Lernen weniger stark eingeschränkt zu sein scheint. Letzteres beruht nach derzeitigem Forschungsstand eher auf hippocampalen Verarbeitungsprozessen, während das reizbedingte Lernen der Amygdala zugeschrieben wird. Ebenso wie beim angstähnlichen Verhalten scheint funktionell v.a. das Amygdalaareal betroffen zu sein, wobei beschrieben wurde, dass in der  $cln3^{-/-}$ -Maus

morphologische Veränderungen vor allem im Hippocampus auftreten (Pontikis et al., 2004). Basierend auf den geschilderten Befunden sollten die GABAergen hemmenden Netzwerke im Bereich der Amygdala in weiteren Projekten elektrophysiologisch untersucht und funktionell charakterisiert werden.

### **Motorische Defizite und elektrophysiologische Untersuchungen**

Die  $cln3^{-/-}$ -Mäuse entwickeln mit zunehmendem Alter motorische und koordinative Defizite. Um die zugrunde liegenden neuronalen Veränderungen zu identifizieren, wurde in einer Reihe von Experimenten versucht, die motorischen Defizite mit Defiziten der beteiligten Netzwerke zu korrelieren. Dazu erfolgten histologische und elektrophysiologische Analysen.

Den beobachteten verschlechterten Leistungen im RotaRod-Test und Klettertest können Dysfunktionen der spinalen inhibitorischen Netzwerke zugrunde liegen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die spinalen Netzwerke unter Verwendung elektrophysiologischer Ableitung in-vivo analysiert. Die Reizweiterleitung bis zu den Motoneuronen und die Modulation der Reflexe unterschieden sich nicht zwischen den wt- und den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen. Des Weiteren ergab die direkte Messung der DRP keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die DRP spiegeln die primäre afferente Depolarisation wieder, ein auf GABAerge, präsynaptische Synapsen zurückgehendes Potential. Entsprechend der elektrophysiologischen Befunde zeigten sich auch in den histologischen Untersuchungen der Interneuronpopulationen des RM keine Veränderungen, wie sie beispielweise für hippocampale Neuronenpopulationen beschrieben sind.

Demnach scheinen die gezeigten AAK-Ablagerungen keinen Einfluss auf die Funktionalität der spinalen GABAergen Netzwerke zu haben. Ob die AAK prinzipiell in der Lage sind, die GABAerge Inhibition im ZNS zu beeinflussen lässt sich daraus nicht erschließen. Eine denkbare Erklärung wäre, dass die spinalen Netzwerke unter den bestehenden Versuchsbedingungen nicht auf die AAK-bedingten, sicherlich inkompletten Veränderungen des GABA-Gehalts aus der von GAD65 katalysierten GABA-Synthese angewiesen sind, um die synaptische Transmission aufrecht zu erhalten. Dagegen scheinen die Amygdala-Hippocampus-Netzwerke vulnerabler für die Minderfunktion von GAD65 zu sein. Unterstützung erfährt diese Hypothese durch Ergebnisse aus passiv-transfer Experimenten mit GAD65-AAK von SPS-Patienten in Ratten. Diese AKK induzierten einen tiefen angst-ähnlichen Phänotyp in Versuchstieren, beeinflussten die spinalen inhibitorischen Netzwerke aber nicht (Geis et al., 2011). Interessanterweise scheinen auch bei GAD65 Knockoutmäusen mit kompletter GAD65 Dysfunktion die motorischen Einschränkungen eher gering zu sein, während eine deutliche Steigerung des angst-ähnlichen Verhaltens beschrieben ist (Kash et al., 1997; Kash et al., 1999; Stork et al., 2003). Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte die Funktionalität der GABAergen Systeme der Amygdala in den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen in Abhängigkeit von AAK direkt analysiert werden. Hierzu bieten sich Patch-Clamp Unter-

suchungen der GABAergen Neurone bzw. funktionelle Analysen der GABAergen Netzwerke in der Amygdala an (Kamprath et al., 2010; Sosulina et al., 2010).

Eine andere Erklärung für die progressive Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten und der Bewegungskoordination bei den  $cln3^{-/-}$ -Mäusen könnten auch Veränderungen innerhalb der zerebellären Netzwerke sein. Vor allem der Verlust von Projektionsneuronen in den tiefen zerebellären Kerngebieten, Veränderungen der Purkinjezellmorphologie und eine abnorme Entwicklung der Körnerzellschicht (Weimer et al., 2009) weisen auf solche pathologische Veränderungen des Zerebellums in der  $cln3^{-/-}$ -Maus hin. In den elektrophysiologischen Messungen des Feuerverhaltens der Purkinjezellen des Kleinhirnwurms in-vivo ergaben sich keine Auffälligkeiten. Auch die zusätzliche Steigerung der Durchlässigkeit der BHS induzierte keine entsprechenden Abweichungen im Feuerverhalten der Purkinjezellen. In den Messungen der spontanen und evozierten Purkinjezellaktivität in akuten zerebellären Schnitten ergab sich hingegen ein Unterschied, nachdem die Zugänglichkeit für AAK in das ZNS mittels LPS-Behandlung erhöht wurde. So wurde eine erhöhte, spontane AP-Frequenz gemessen und eine Störung der Synchronität des AP nach Stimulation der Parallelfasern. Beides könnte durch einen teilweisen Verlust der GABAergen Inhibition der Purkinjezellen erklärt werden. Im intakten zerebellären Kortex stimulieren aktive Parallelfasern nicht nur die PZ, sondern auch lokale inhibitorische Interneurone, die wiederum GABAerge Synapsen zu den PZ bilden. Ihre inhibitorischen Eingänge folgen in den PZ den direkten exzitatorischen Eingängen der Parallelfasern mit kleiner zeitlicher Verzögerung, so dass sie die Spanne der zeitlichen Summation der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale verkürzen und so zu einem synchronisierten Feuern der PZ nach Parallelfaserstimulation beitragen (Mittmann et al., 2005). Die beobachteten Veränderungen können deshalb am besten über eine Störung der lokalen inhibitorischen Netzwerke erklärt werden, wie sie auch in Mäusen ohne  $GABA_A$ R in Purkinjezellen beschrieben wurden (Wulff et al., 2009). Der Unterschied zwischen dem spontanen Feuerverhalten der PZ in-vivo und in-vitro kann durch mehrere Dinge begründet sein. Zum einen ist ein genereller Effekt der Narkose mit Ketamin möglich, was mit dem NMDA-Rezeptor interagiert, zum anderen kommt es durch die Schnittpräparation des Kleinhirns auch zur Unterbrechung aufsteigender Fasersysteme wie beispielsweise der Kletterfasern von der Olive und der spinocerebellären Affenzen auf die Körnerzellen, was wiederum die Aktivierung lokaler inhibitorischer Interneurone vermindern kann. Eine gezielte Stimulation der Parallelfasern, wie in-vitro durchgeführt, war in-vivo aufgrund des komplexen Versuchsaufbaus nicht möglich.

### **Hinweise auf autoimmun-vermittelte Pathomechanismen in der $cln3^{-/-}$ -Maus**

AAK sind im Serum von  $cln3^{-/-}$ -Mäusen nachweisbar und können aufgrund einer durchlässigen BHS in das ZNS der Mäuse eindringen, wo sie als Ablagerungen nachweisbar sind (Lim et al., 2007). Zum Nachweis einer pathogenetischen Rolle der AAK in einzelnen Individuen kann die Reduktion des AAK-

Titers mit hypothetischer nachfolgender Besserung der Symptomatik dienen. Dies kann bei Patienten über eine Plasmapherese oder Immunadsorption erreicht werden. Dies ist in Mäusen allerdings nicht anwendbar, außerdem erscheint bei der JNCL und dem entsprechenden Mausmodell angesichts der langsamen Krankheitsentwicklung eine langfristige Senkung des AAK-Titers notwendig. Deshalb wurde ein pharmakologischer Ansatz zur Minderung der AAK-Produktion in den Versuchstieren gewählt. Bortezomib ist ein Proteasominhibitor, der primär zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt wird, aber auch immunsuppressive Eigenschaften besitzt (Heine et al., 2011). In Tiermodellen für Lupus erythematodes und Myasthenia gravis führte die Behandlung der Tiere mit Bortezomib zur Senkung des Antikörpertiters und zu einer Besserung der Krankheitssymptomatik (Neubert et al., 2008; Gomez et al., 2011). Dabei scheint Bortezomib gezielt vor allem die kurz- und langlebigen Plasmazellen, die Hauptquelle zirkulierender AK, anzugreifen, während andere Immunzellen, beispielweise B- und T-Lymphozyten, in einem weit geringeren Maße beeinflusst werden. Diese Eigenschaft liegt darin begründet, dass v.a. Zellen mit hoher Proteinproduktion (hier IgG-Produktion) anfällig für die Inhibition des Proteasoms sind.

In  $cln3^{-/-}$ -Mäusen reduzierte die Behandlung mit Bortezomib hochsignifikant die CD138-positive Plasmazellen im Knochenmark und der Milz, was in gutem Einklang mit der Literatur steht. Außerdem konnte eine etwa 50%-ige Reduktion der Plasmazellen im ZNS und eine Reduktion der AK-Ablagerungen im ZNS behandelter Tiere beobachtet werden. Die Behandlung führte in der Folge auch zu einer Besserung der Krankheitssymptome. Zusammen mit weiteren Studien (Carson et al., 2010; Heine et al., 2011) legen diese Ergebnisse nahe, dass eine Behandlung mit Proteasominhibitoren ein neuer und vielversprechender Weg für die Behandlung von AAK vermittelten Erkrankungen sein könnte.

Zusätzlich ist die erfolgreiche Behandlung der  $cln3^{-/-}$ -Mäuse ein weiterer Hinweis für eine zumindest teilweise AAK-vermittelte Pathogenese der JNCL. Sie bestärkt Befunde aus einer kürzlich publizierten Studie, in der die Behandlung der  $cln3^{-/-}$ -Mäuse mit Mycophenolatmofetil zu einer transienten Verbesserung der Krankheitssymptome führte (Seehafer et al., 2011). In der gleichen Studie konnte ein ähnlicher positiver Effekt durch Rückkreuzung mit einem B-Zell-defizienten Mausstamm und daraus folgender Reduktion der IgG-Produktion gezeigt werden. Aus dieser Studie und den hier präsentierten Ergebnissen folgend scheint ein Zusammenhang von AAK und den motorischen Krankheitssymptomen in der  $cln3^{-/-}$ -Maus wahrscheinlich. Aus diesen Ergebnissen kann allerdings nicht geschlossen werden, welche AAK mit welcher Antigen-Spezifität wirklich kausale Wirkung besitzen. Auch kann nicht direkt unterschieden werden, ob die AAK eine direkte pharmakologische Wirkung haben oder nachgeschaltete neuroinflammatorische Prozesse aktiviert werden, die letztlich zu einem Funktions- bzw. Zellverlust führen.

## GAD65-AAK bei JNCL und anderen Erkrankungen

In der Diskussion um eine mögliche pathogene Wirkung der AAK bei der JNCL wird ein großer Fokus auf die AAK gegen GAD65 gelegt. Zwar scheinen einige Befunde auf eine erhöhte Vulnerabilität GABAerger Systeme in der JNCL und der *cln3*<sup>-/-</sup>-Maus zu deuten, die gut zur hypothetischen Wirkung von GAD65-AAK passen, aber stichhaltige Belege für diese Wirkung gibt es bislang nicht. Auch die hier aufgezeigten Parallelen im angstähnlichen Verhalten zwischen *cln3*<sup>-/-</sup>-Mäusen und GAD65-defizienten Mäusen sind als Hinweis auf einen möglichen kausalen Effekt der GAD65-AAK zu verstehen, ähnliches gilt für die AAK-Wirkung auf die zerebelläre Dysregulation.

GAD65-AAK wurden auch in weiteren neurologischen Erkrankungen, wie dem SPS, zerebellaren Ataxien (Honnorat et al., 2001), verschiedenen Enzephalitisformen (Blanc et al., 2009; Malter et al., 2010) und bei Patienten mit Epilepsie (Errichiello et al., 2009) gefunden. Des Weiteren weisen neuere Studien darauf hin, dass GAD65-AAK auch mit psychiatrischen Erkrankungen, wie Schizophrenie, Autismus und der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung assoziiert sein könnten (Najjar et al., 2012; Rout et al., 2012). Außerdem treten GAD65-AAK bei der Mehrzahl der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 auf (Pihoker et al., 2005). Ein experimenteller Hinweis eines kausalen Zusammenhangs zwischen den GAD65-AAK und neurologischen Symptomen konnte bisher nur für das SPS erbracht werden (Geis et al., 2011). Des Weiteren zeigte sich in in-vitro Versuchen, dass affinitätsgereinigte GAD65-AAK in der Lage sind die GABAerge, synaptische Eingänge von zerebellaren Purkinjezellen zu mindern (Ishida et al., 2008). Neben der Frage, ob GAD65-AAK überhaupt eine krankheitsbedingende Funktion haben können, ist auch die Frage ungeklärt, wie sich die Unterschiede in der Ausprägung der Symptome bei den unterschiedlichen Erkrankungen erklären lassen. Die meisten GAD65-AAK positiven Patienten mit Diabetes Typ 1 haben keine neurologischen Symptome. Als Erklärung werden vor allem die unterschiedliche Erreichbarkeit des zentralnervösen Antigens für die AAK und die sich unterscheidenden Zielepitope herangezogen. Man geht davon aus, dass die Bindung der AAK an unterschiedliche funktionelle Regionen des GAD65-Proteins unterschiedliche Auswirkungen auf die Funktion des Enzyms hat (Fenalti and Buckle, 2010).

Die *cln3*<sup>-/-</sup>-Maus eignet sich nur bedingt zur Klärung dieser Fragen. Zwar bietet die endogene Bildung der GAD65-AAK ein unbestreitbares Vorteil gegenüber anderen Tiermodellen, z.B. passiv-Transfer-Modellen, aber auch den großen Nachteil, dass GAD65 nicht das einzige neuronale Antigen zu sein scheint und auch die zelluläre Immunantwort im Krankheitsgeschehen eine Rolle spielt. Aus diesen Gründen können die Effekte einer pharmakologischen Manipulation der Autoimmunreaktion nur eingeschränkt den AAK mit einem bestimmten Antigen zugeschrieben werden. Dieses Problem könnte nur mit dem passiven Transfer von affinitätsgereinigten AAK der *cln3*<sup>-/-</sup>-Mäuse in ein wildtypische Empfängertiere gelöst werden. Dies ist aber auch aus tierschutzrechtlichen Gründen schwer realisierbar, da für die Gewinnung von AAK in ausreichender Menge sehr große Tierzahlen nötig wä-

ren. Humane AAK von JNCL-Patienten könnten zwar durch Plasmapherese in ausreichendem Maße gewonnen werden. Dieses Verfahren gehört aber nicht zu den Standardtherapien der JNCL und müsste langfristig angewendet werden, sodass die dadurch entstehenden Belastungen für Forschungszwecke bei ungewissem klinischem Effekt derzeit nicht in Kauf genommen werden können.

## 5.2. Diskussion der Experimente mit Autoantikörpern gegen Amphiphysin beim Stiff Person Syndrom

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere experimentelle Nachweise erbracht werden, dass AAK gegen Amphiphysin eine pathophysiologisch relevante Rolle bei der Entstehung des SPS haben.

Mittels Patch-Clamp Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die synaptische Übertragung von hippocampalen GABAergen Synapsen durch Amph-AAK induzierte Defekte in der Vesikelendozytose gestört wird. In Passiv-transfer Experimenten fanden wir, dass auch psychiatrische Symptome des SPS durch Amph-AAK induzierbar sind. Zusätzlich führte die aktive Immunisierung von Mäusen gegen Amphiphysin und die nachfolgende Öffnung der BHS zu subklinischen Veränderungen der spinalen Reflexverarbeitung

### **Amphiphysin-AAK beeinträchtigen die Vesikelendozytose**

Amphiphysin spielt eine zentrale Rolle in der Vesikelendozytose v.a. in präsynaptischen Terminalen. Die Störung der GABAergen synaptischen Transmission auf hippocampale Körnerzellen weist auf eine pharmakologische Wirkung der Amph-AAK hin. Die Beeinträchtigung der synaptischen Übertragung vor allem bei starker Beanspruchung entspricht Befunden in Modellen mit experimentell andersartig induzierter Amphiphysin-Dysfunktion. In der Riesensynapse des Neunauges konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Peptiden bzw. Antikörpern, die kompetitiv an funktionelle Regionen von Amphiphysin binden, die Vesikelendozytose in aktiven Synapsen stört (Shupliakov et al., 1997; Evergren et al., 2004). Amphiphysin scheint dabei nicht essentiell für die CVE zu sein, hat aber die Funktion die CVE zu beschleunigen, um bei starker Beanspruchung der Synapse die Wiedergewinnung der Vesikel an den gestiegenen Bedarf anzupassen. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch in Neuronen mit genetischer Defizienz für Amphiphysin (Di Paolo et al., 2002).

Die hier verwendeten Amph-AAK beeinträchtigen die synaptische Funktion in dem in dieser Arbeit gewählten Modell in vergleichbarer Weise. Bei geringer synaptischer Aktivität, d.h. niederfrequenter Stimulation oder ohne externe Stimulation, zeigt sich nach Behandlung mit Amph-AAK in keinem der gemessenen Parameter der IPSC eine Veränderung. Erst bei hochfrequenter Stimulation der präsynaptischen Zelle konnte eine substantielle Erniedrigung der GABAergen Übertragung und eine Verzögerung der Erholung der Synapsenfunktion beobachtet werden. Dies entspricht wiederum der

Hypothese einer verminderten Menge an freisetzbaren Vesikeln nach starker Beanspruchung der Synapse und einem verzögerten Membranrecycling durch eine Dysfunktion endozytotischer Mechanismen. Diese Befunde sind übereinstimmend mit FM-Dye Experimenten, die ebenso auf einen auf einen durch Amph-AAK ausgelösten Endozytosedefekt schließen lassen (Geis et al., 2010).

Neben der Beeinträchtigung der synaptischen Vesikelendozytose könnten die Amph-AAK auch die Funktion von membranständigen Rezeptoren, Kanälen und Transportern beeinflussen, da diese auch über endozytotische Prozesse reguliert werden (Beattie et al., 2000; Ceresa and Schmid, 2000; Kittler et al., 2000; Rao-Ruiz et al., 2011). In der Tat scheinen Amph-AAK die Menge an membranständigem Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup>-Kotransporter in embryonalen Motoneuronkulturen zu reduzieren und in der Folgend GABAerge Ca<sup>2+</sup>-Ströme zu beeinflussen (Geis et al., 2009).

### **Passiver Transfer von Amph-AAK induziert angstähnliches Verhalten**

Angst und Agrophobie gehören neben der generalisierten Tonuserhöhung der Muskulatur und intermittierenden Muskelkrämpfen zu den Hauptsymptomen des SPS und können das klinische Bild sogar dominieren (Ameli et al., 2005). Die Ergebnisse in den passiv-Transfer Experimenten weisen darauf hin, dass diese neuropsychologischen Symptome, ebenso wie die motorischen Symptome (Sommer et al., 2005; Geis et al., 2010), spezifisch auf die Wirkung der Amph-AAK zurückgehen, da sich auch mit affinitätsgereinigten AAK angstähnliches Verhalten induzieren ließ. Dies lässt den Schluss zu, dass sich auch in SPS Patienten die gesteigerte Ängstlichkeit direkt auf eine Wirkung der Amph-AAK zurückführen lässt und es sich nicht um einen sekundären Effekt in Folge der motorischen Unsicherheit und rezidivierenden Stürzen handelt. Außerdem scheinen die an der Angstentstehung beteiligten Gehirnregionen eine erhöhte Suszeptibilität für die Wirkung der Amph-AAK haben.

Spekulativ bleibt die Frage, ob der ängstliche Phänotyp auf eine verminderte GABAerge Inhibition in der Amygdala und/oder anderen angst-assoziierten Gehirnregionen zurückgeht. Die in den zuvor beschriebenen Experimenten gezeigte Minderung der GABAergen Transmission im Hippocampus lässt diese Hypothese aber plausibel erscheinen. Dies wäre zudem im Einklang mit der Induktion von gesteigertem angstähnlichen Verhalten in Ratten durch den passiven Transfer von GAD65-AAK von SPS-Patienten (Geis et al., 2011).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen grundlegend und über den vermuteten Mechanismus der Hemmung der Funktion von Amphiphysin hinaus, dass antineuronale AAK in der Lage sind psychiatrische Symptome, speziell Angst, hervorzurufen. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für die Erforschung psychiatrischer Erkrankungen und möglicherweise auch neue Behandlungsoptionen bei betroffenen Patienten, auch bei anderen Erkrankungen als dem SPS.



## **Aktive Immunisierung gegen Amphiphysin induziert eine Immunantwort und vermindert die Suppression des H-Reflex**

Aus den Ergebnissen der Immunisierung von Ratten und Mäusen gegen Amphiphysin können keine endgültigen Rückschlüsse auf die Pathogenität der AAK gezogen werden. In beiden Spezies hat die Immunisierung mit dem vollständigen humanen Protein zu einer ausgeprägten Bildung von Antikörpern gegen Amphiphysin im Serum geführt. Es wurden aber zu keinem Versuchszeitpunkt SPS-ähnliche Symptome bei den Versuchstieren beobachtet, auch nicht nach experimenteller Öffnung der BHS, wobei die Verhaltensbeurteilung bei den Ratten durch die starke Symptomausprägung der AT-EAE erschwert war.

Bei den immunisierten Mäusen konnte eine Minderung der frequenz-abhängigen Depression des H-Reflexes bei hohen Stimulationsfrequenzen (>10 Hz) beobachtet werden. Dies ist im Einklang mit den Befunden im Passiv-transfer-Modell (Geis et al., 2010), allerdings sind die Effekte nur bei hohen Stimulationsfrequenzen vorhanden, was von geringer Bedeutung zu sein scheint. Für die nur subklinischen Ausprägungen der Symptome bestehen verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zunächst ist es möglich, dass die erzielten AK-Titer im Serum nicht hoch genug waren, um krankheitsauslösend zu sein. Andere Adjuvanzien, ein anderer Mausstamm oder ein verändertes Immunisierungsprotokoll könnten eine stärkere Immunantwort auslösen. Auch ist es möglich, dass infolge der BHS-Öffnung durch LPS nicht genügend AAK über einen ausreichend langen Zeitraum in das ZNS gelangt sind. Grundsätzlich scheint die Öffnung der BHS mit LPS ausreichend, um durch Immunisierung gebildete AAK in das ZNS eindringen zu lassen. So entwickelten immunisierte Mäuse mit AAK gegen doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (dsDNA) als Modell für den zerebralen Lupus Krankheits-symptome nach Öffnung der BHS mit LPS (Kowal et al., 2004). Im Gegensatz zu den Amph-AAK scheinen die dsDNA-AAK aber nicht in die Zelle eindringen zu müssen, da sie mit dem NMDA-Rezeptor kreuzreagieren. Dies impliziert wiederum, dass sie in kürzerer Zeit pharmakologisch Wirken könnten. Für dsDNA-AAK könnte deshalb das Zeitfenster der LPS-induzierten BHS-Öffnung ausreichend sein, während die Amph-AAK über einen längeren Zeitraum mit höherem Titer vorhanden sein müssen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte eine ungenügende Spezifität der AAK im Modell sein. Aus grundlegenden Arbeiten ist bekannt, dass die SH3-Domäne und die Clathrin/AP2-Bindungsdomäne wichtige Funktionen bei der CVE haben (Shupliakov et al., 1997; Evergren et al., 2004). Sollten die bei der Immunisierung gebildeten AAK nicht mit den Funktionen dieser Domänen interferieren wäre es möglich, dass die AAK an Amphiphysin binden ohne dieses funktionell zu beeinflussen. Immunisierungen gegen spezifische Epitopbereiche mittels speziell synthetisierter Peptide könnten dieses Problem lösen. Welche dieser Erklärungsmöglichkeiten letztlich beigetragen haben, dass keine offensichtlichen Krankheitssymptome auftraten, bleibt in weiteren Versuchen zu eruieren.

Die BHS-Öffnung sollte bei den immunisierten Ratten über eine milde AT-EAE mit nur geringen EAE-bedingten Krankheitssymptomen ausgelöst werden (Boettger et al., 2009). Allerdings entwickelten sich nach der Induktion der BHS-Öffnung durch Transfer der MBP (myelin basic proteine)-spezifischen T-Zell Blasten eine stark ausgeprägte EAE. Aufgrund der deutlichen EAE-bedingten Symptome (Paraparese) war eine Analyse von SPS-spezifischen Symptomen nicht möglich. Es ist zu vermuten, dass die vorgegangene aktive Immunisierung der Tiere die Reaktion des Immunsystems auf die Injektion der T-Zell Blasten so verändert hat, dass die EAE-typischen Symptome unerwartet stark aufgetreten sind. Es ist aber auch möglich, dass die verwendeten stimulierten T-Zell Blasten besonders reaktiv waren und deshalb bei gleicher Dosierung eine über das gewünschte Maß hinausgehende Immunantwort induziert haben. Um diese Möglichkeit zu klären, sollte bei weiteren Versuchen jeweils eine Tiergruppe eingeschlossen werden, die nicht immunisiert wird, bei der aber eine AT-EAE ausgelöst wird.

Die Untersuchung von AAK-vermittelten Krankheitsmechanismen in immunisierten Tieren erscheint auf den ersten Blick einfach, da kein Patientenmaterial und keine aufwendigen passiv-transfer-Modelle nötig sind. Allerdings sind einige Punkte zu beachten, die auch bei der vorliegenden Studie problematisch sind. Die Menge und die Spezifität der AAK hängen stark von dem Zielantigen ab und eine optimale Immunantwort kann nicht immer erreicht werden. Bei zentralnervösen Antigenen ist speziell die BHS zu beachten. Pharmakologische oder immunologische Methoden die Durchlässigkeit der BHS zu erhöhen sind nicht nebenwirkungsfrei und zeitlich begrenzt. Verhaltensdaten sind somit immer mit Vorsicht zu betrachten und es ist nicht sichergestellt, dass eine ausreichende Menge an AAK über einen hinreichenden Zeitraum das Antigen erreichen kann.

## Referenzen

- Aberg L, Lauronen L, Hamalainen J, Mole SE, Autti T (2009) A 30-year follow-up of a neuronal ceroid lipofuscinosis patient with mutations in CLN3 and protracted disease course. *Pediatr Neurol* 40:134-137.
- Aberg L, Talling M, Harkonen T, Lonnqvist T, Knip M, Alen R, Rantala H, Tyynela J (2008) Intermittent prednisolone and autoantibodies to GAD65 in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurology* 70:1218-1220.
- Adams HR, Kwon J, Marshall FJ, de Blicke EA, Pearce DA, Mink JW (2007) Neuropsychological symptoms of juvenile-onset batten disease: experiences from 2 studies. *J Child Neurol* 22:621-627.
- Aiba A, Kano M, Chen C, Stanton ME, Fox GD, Herrup K, Zwingman TA, Tonegawa S (1994) Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 79:377-388.
- Alexopoulos H, Dalakas MC (2010) A critical update on the immunopathogenesis of Stiff Person Syndrome. *European Journal of Clinical Investigation* 40:1018-1025.
- Allen C, Stevens CF (1994) An evaluation of causes for unreliability of synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10380-10383.
- Ameli R, Snow J, Rakocevic G, Dalakas MC (2005) A neuropsychological assessment of phobias in patients with stiff person syndrome. *Neurology* 64:1961-1963.
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K (1997) Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6496-6499.
- Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R, Ji FY, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K (1996) Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem Biophys Res Commun* 229:891-895.
- Bäckman ML, Aberg LE, Aronen ET, Santavuori PR (2001) New antidepressive and antipsychotic drugs in juvenile neuronal ceroid lipofuscinoses--a pilot study. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A:163-166.
- Bäckman ML, Santavuori PR, Aberg LE, Aronen ET (2005) Psychiatric symptoms of children and adolescents with juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Intellect Disabil Res* 49:25-32.
- Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J, Szpirer C (2006) Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci* 9:220-226.
- Bauerfeind R, Takei K, De Camilli P (1997) Amphiphysin I Is Associated with Coated Endocytic Intermediates and Undergoes Stimulation-dependent Dephosphorylation in Nerve Terminals. *Journal of Biological Chemistry* 272:30984-30992.
- Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M, Malenka RC (2000) Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci* 3:1291-1300.
- Bennett JL, Lam C, Kalluri SR, Saikali P, Bautista K, Dupree C, Glogowska M, Case D, Antel JP, Owens GP, Gilden D, Nessler S, Stadelmann C, Hemmer B (2009) Intrathecal pathogenic anti-aquaporin-4 antibodies in early neuromyelitis optica. *Annals of Neurology* 66:617-629.
- Blanc F, Ruppert E, Kleitz C, Valenti MP, Cretin B, Humbel RL, Honnorat J, Namer IJ, Hirsch E, Manning L, de Seze J (2009) Acute limbic encephalitis and glutamic acid decarboxylase antibodies: A reality? *J Neurol Sci* 287:69-71.
- Blood PD, Voth GA (2006) Direct observation of Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-induced membrane curvature by means of molecular dynamics simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:15068-15072.

- Boettger MK, Weishaupt A, Geis C, Toyka KV, Sommer C (2009) Mild experimental autoimmune encephalitis as a tool to induce blood–brain barrier dysfunction. *Journal of Neural Transmission* 117:165-169.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, Adzemovic M, Bauer J, Berger T, Fujihara K, Itoyama Y, Lassmann H (2009) Neuromyelitis optica: Pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Annals of Neurology* 66:630-643.
- Brooks AI, Chattopadhyay S, Mitchison HM, Nussbaum RL, Pearce DA (2003) Functional categorization of gene expression changes in the cerebellum of a Cln3-knockout mouse model for Batten disease. *Molecular Genetics and Metabolism* 78:17-30.
- Butler MH, Hayashi A, Ohkoshi N, Villmann C, Becker CM, Feng G, De Camilli P, Solimena M (2000) Autoimmunity to gephyrin in Stiff-Man syndrome. *Neuron* 26:307-312.
- Carson KR, Beckwith LG, Mehta J (2010) Successful treatment of IgM-mediated autoimmune hemolytic anemia with bortezomib. *Blood* 115:915.
- Casal E, Federici L, Zhang W, Fernandez-Recio J, Priego EM, Miguel RN, DuHadaway JB, Prendergast GC, Luisi BF, Laue ED (2006) The crystal structure of the BAR domain from human Bin1/amphiphysin II and its implications for molecular recognition. *Biochemistry* 45:12917-12928.
- Castaneda JA, Pearce DA (2008) Identification of alpha-fetoprotein as an autoantigen in juvenile Batten disease. *Neurobiol Dis* 29:92-102.
- Ceresa BP, Schmid SL (2000) Regulation of signal transduction by endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* 12:204-210.
- Cestra G, Castagnoli L, Dente L, Minenkova O, Petrelli A, Migone N, Hoffmüller U, Schneider-Mergener J, Cesareni G (1999) The SH3 Domains of Endophilin and Amphiphysin Bind to the Proline-rich Region of Synaptojanin 1 at Distinct Sites That Display an Unconventional Binding Specificity. *Journal of Biological Chemistry* 274:32001-32007.
- Chattopadhyay S, Kriscenski-Perry E, Wenger DA, Pearce DA (2002a) An autoantibody to GAD65 in sera of patients with juvenile neuronal ceroid lipofuscinoses. *Neurology* 59:1816-1817.
- Chattopadhyay S, Ito M, Cooper JD, Brooks AI, Curran TM, Powers JM, Pearce DA (2002b) An autoantibody inhibitory to glutamic acid decarboxylase in the neurodegenerative disorder Batten disease. *Hum Mol Genet* 11:1421-1431.
- Chattopadhyay S, Ito M, Cooper JD, Brooks AI, Curran TM, Powers JM, Pearce DA (2002c) An autoantibody inhibitory to glutamic acid decarboxylase in the neurodegenerative disorder Batten disease. *Hum Mol Genet* 11:1421-1431.
- Chen L, Wang H, Vicini S, Olsen RW (2000) The gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABAA receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11557-11562.
- Cooper JD (2003) Progress towards understanding the neurobiology of Batten disease or neuronal ceroid lipofuscinosis. *Curr Opin Neurol* 16:121-128.
- Cooper JD, Russell C, Mitchison HM (2006) Progress towards understanding disease mechanisms in small vertebrate models of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* 1762:873-889.
- Cotman SL, Vrbanac V, Lebel LA, Lee RL, Johnson KA, Donahue LR, Teed AM, Antonellis K, Bronson RT, Lerner TJ, MacDonald ME (2002) Cln3(Deltaex7/8) knock-in mice with the common JNCL mutation exhibit progressive neurologic disease that begins before birth. *Hum Mol Genet* 11:2709-2721.
- Dalakas MC (2009) Stiff person syndrome: advances in pathogenesis and therapeutic interventions. *Curr Treat Options Neurol* 11:102-110.
- Dalakas MC, Fujii M, Li M, McElroy B (2000) The clinical spectrum of anti-GAD antibody-positive patients with stiff-person syndrome. *Neurology* 55:1531-1535.

- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR (2008) Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7:1091-1098.
- David C, Solimena M, De Camilli P (1994) Autoimmunity in Stiff-Man Syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins, Rvs167 and Rvs161. *FEBS Letters* 351:73-79.
- David C, McPherson PS, Mundigl O, de Camilli P (1996) A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:331-335.
- De Camilli P, Thomas A, Cofield R, Folli F, Lichte B, Piccolo G, Meinck HM, Austoni M, Fassetta G, Bottazzo G, et al. (1993) The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 178:2219-2223.
- Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM (1996) Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol* 491 ( Pt 1):163-176.
- DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B (2001) A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 7:1189-1193.
- Di Paolo G, Sankaranarayanan S, Wenk MR, Daniell L, Perucco E, Caldarone BJ, Flavell R, Picciotto MR, Ryan TA, Cremona O, De Camilli P (2002) Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* 33:789-804.
- Ding S-L, Tecedor L, Stein CS, Davidson BL (2011) A knock-in reporter mouse model for Batten disease reveals predominant expression of Cln3 in visual, limbic and subcortical motor structures. *Neurobiology of Disease* 41:237-248.
- Eccles JC, Schmidt RF, Willis WD (1962a) Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. *J Physiol* 161:282-297.
- Eccles JC, Magni F, Willis WD (1962b) Depolarization of central terminals of Group I afferent fibres from muscle. *J Physiol* 160:62-93.
- Eccles JC, Schmidt R, Willis WD (1963) Pharmacological Studies on Presynaptic Inhibition. *J Physiol* 168:500-530.
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B (1990) Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J Physiol* 430:213-249.
- Eliason SL, Stein CS, Mao Q, Tecedor L, Ding SL, Gaines DM, Davidson BL (2007) A knock-in reporter model of Batten disease. *J Neurosci* 27:9826-9834.
- Errichiello L, Perruolo G, Pascarella A, Formisano P, Minetti C, Striano S, Zara F, Striano P (2009) Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) in focal and generalized epilepsy: A study on 233 patients. *J Neuroimmunol* 211:120-123.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABA<sub>A</sub> receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1:563-571.
- Evergren E, Marcucci M, Tomilin N, Löw P, Slepnev V, Andersson F, Gad H, Brodin L, De Camilli P, Shupliakov O (2004) Amphiphysin is a Component of Clathrin Coats Formed During Synaptic Vesicle Recycling at the Lamprey Giant Synapse. *Traffic* 5:514-528.
- Fenalti G, Buckle AM (2010) Structural biology of the GAD autoantigen. *Autoimmunity Reviews* 9:148-152.
- Ferguson SM, Brasnjo G, Hayashi M, Wolfel M, Collesi C, Giovedi S, Raimondi A, Gong LW, Ariel P, Paradise S, O'Toole E, Flavell R, Cremona O, Miesenbock G, Ryan TA, De Camilli P (2007) A Selective Activity-Dependent Requirement for Dynamin 1 in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Science* 316:570-574.
- Gardiner M, Sandford A, Deadman M, Poulton J, Cookson W, Reeders S, Jokiaho I, Peltonen L, Eiberg H, Julier C (1990) Batten disease (Spielmeyer-Vogt disease, juvenile onset neuronal ceroid-lipofuscinosis) gene (CLN3) maps to human chromosome 16. *Genomics* 8:387-390.

- Geiger JR, Jonas P (2000) Dynamic control of presynaptic Ca<sup>2+</sup> inflow by fast-inactivating K<sup>+</sup> channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron* 28:927-939.
- Geiger JR, Bischofberger J, Vida I, Frobe U, Pfitzinger S, Weber HJ, Haverkamp K, Jonas P (2002) Patch-clamp recording in brain slices with improved slicer technology. *Pflugers Arch* 443:491-501.
- Geis C, Beck M, Jablonka S, Weishaupt A, Toyka KV, Sendtner M, Sommer C (2009) Stiff person syndrome associated anti-amphiphysin antibodies reduce GABA associated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise in embryonic motoneurons. *Neurobiol Dis* 36:191-199.
- Geis C, Weishaupt A, Grünewald B, Wulsch T, Reif A, Gerlach M, Dirx R, Solimena M, Perani D, Heckmann M, Toyka KV, Folli F, Sommer C (2011) Human Stiff-Person Syndrome IgG Induces Anxious Behavior in Rats. *PLoS One* 6:e16775.
- Geis C, Weishaupt A, Hallermann S, Grünewald B, Wessig C, Wulsch T, Reif A, Byts N, Beck M, Jablonka S, Boettger MK, Uceyler N, Fouquet W, Gerlach M, Meinck HM, Siren AL, Sigrist SJ, Toyka KV, Heckmann M, Sommer C (2010) Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain* 133:3166-3180.
- Getty AL, Pearce DA (2011) Interactions of the proteins of neuronal ceroid lipofuscinosis: clues to function. *Cell Mol Life Sci* 68:453-474.
- Gomez AM, Vrolix K, Martínez-Martínez P, Molenaar PC, Phernambucq M, van der Esch E, Duimel H, Verheyen F, Voll RE, Manz RA, De Baets MH, Losen M (2011) Proteasome Inhibition with Bortezomib Depletes Plasma Cells and Autoantibodies in Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis. *J Immunol* 186:2503-2513.
- Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC, De Camilli P (1997) The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* 272:13419-13425.
- Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB (1985) Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology* 35:538-543.
- Greenlee JE, Brashear HR (1983) Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinoma. *Ann Neurol* 14:609-613.
- Haltia M (2003) The neuronal ceroid-lipofuscinoses. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1-13.
- Haltia M (2006) The neuronal ceroid-lipofuscinoses: from past to present. *Biochim Biophys Acta* 1762:850-856.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hebb AL, Zacharko RM, Dominguez H, Trudel F, Laforest S, Drolet G (2002) Odor-induced variation in anxiety-like behavior in mice is associated with discrete and differential effects on mesocorticolimbic cholecystokinin mRNA expression. *Neuropsychopharmacology* 27:744-755.
- Heine A, Held SA, Bringmann A, Holderried TA, Brossart P (2011) Immunomodulatory effects of anti-angiogenic drugs. *Leukemia* 25:899-905.
- Henningsen P, Clement U, Kuchenhoff J, Simon F, Meinck HM (1996) Psychological factors in the diagnosis and pathogenesis of stiff-man syndrome. *Neurology* 47:38-42.
- Herrmann P, Druckrey-Fiskaaen C, Kouznetsova E, Heinitz K, Bigl M, Cotman SL, Schliebs R (2008) Developmental impairments of select neurotransmitter systems in brains of *Cln3Δex7/8* knock-in mice, an animal model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Journal of Neuroscience Research* 86:1857-1870.
- Hinshaw JE (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:483-519.
- Hobert JA, Dawson G (2007) A novel role of the Batten disease gene *CLN3*: association with BMP synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 358:111-116.
- Holmoy T, Geis C (2011) The immunological basis for treatment of stiff person syndrome. *J Neuroimmunol* 231:55-60.

- Holopainen JM, Saarikoski J, Kinnunen PKJ, Järvelä I (2001) Elevated lysosomal pH in neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs). *European Journal of Biochemistry* 268:5851-5856.
- Honnorat J, Saiz A, Giometto B, Vincent A, Brieva L, de Andres C, Maestre J, Fabien N, Vighetto A, Casamitjana R, Thivolet C, Tavalato B, Antoine JC, Trouillas P, Graus F (2001) Cerebellar Ataxia With Anti-Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies: Study of 14 Patients. *Arch Neurol* 58:225-230.
- Irani S, Lang B (2008) Autoantibody-mediated disorders of the central nervous system. *Autoimmunity* 41:55-65.
- Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, Peles E, Buckley C, Lang B, Vincent A (2010) Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133:2734-2748.
- Ishida K, Mitoma H, Mizusawa H (2008) Reversibility of cerebellar GABAergic synapse impairment induced by anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies. *J Neurol Sci* 271:186-190.
- Jalanko A, Braulke T (2009) Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* 1793:697-709.
- Jin H, Wu H, Osterhaus G, Wei J, Davis K, Sha D, Floor E, Hsu CC, Kopke RD, Wu JY (2003) Demonstration of functional coupling between gamma -aminobutyric acid (GABA) synthesis and vesicular GABA transport into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4293-4298.
- Kamprath K, Romo-Parra H, Häring M, Gaburro S, Doengi M, Lutz B, Pape H-C (2010) Short-Term Adaptation of Conditioned Fear Responses Through Endocannabinoid Signaling in the Central Amygdala. *Neuropsychopharmacology* 36:652-663.
- Kash SF, Tecott LH, Hodge C, Baekkeskov S (1999) Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1698-1703.
- Kash SF, Johnson RS, Tecott LH, Noebels JL, Mayfield RD, Hanahan D, Baekkeskov S (1997) Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14060-14065.
- Katz ML, Johnson GS, Tullis GE, Lei B (2008) Phenotypic characterization of a mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol Dis* 29:242-253.
- Katz ML, Shibuya H, Liu P-C, Kaur S, Gao C-L, Johnson GS (1999) A mouse gene knockout model for juvenile ceroid-lipofuscinosis (batten disease). *J Neurosci Res* 57:551-556.
- Kerr AM, Reisinger E, Jonas P (2008) Differential dependence of phasic transmitter release on synaptotagmin 1 at GABAergic and glutamatergic hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:15581-15586.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8:e1000412.
- Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H (1993) Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366:745-748.
- Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K (1991) A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin [mu] chain gene. *Nature* 350:423-426.
- Kittler JT, Delmas P, Jovanovic JN, Brown DA, Smart TG, Moss SJ (2000) Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *J Neurosci* 20:7972-7977.
- Kousi M, Lehesjoki A-E, Mole SE (2012) Update of the mutation spectrum and clinical correlations of over 360 mutations in eight genes that underlie the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Human Mutation* 33:42-63.
- Kowal C, DeGiorgio LA, Nakaoka T, Hetherington H, Huerta PT, Diamond B, Volpe BT (2004) Cognition and immunity; antibody impairs memory. *Immunity* 21:179-188.
- Kowal C, Degiorgio LA, Lee JY, Edgar MA, Huerta PT, Volpe BT, Diamond B (2006) Human lupus autoantibodies against NMDA receptors mediate cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19854-19859.

- Kraushaar U, Jonas P (2000) Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *J Neurosci* 20:5594-5607.
- Kunkel-Bagden E, Dai HN, Bregman BS (1993) Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 119:153-164.
- Kwon JM, Adams H, Rothberg PG, Augustine EF, Marshall FJ, deBlied EA, Vierhile A, Beck CA, Newhouse NJ, Cialone J, Levy E, Ramirez-Montealegre D, Dure LS, Rose KR, Mink JW (2011) Quantifying physical decline in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten disease). *Neurology*.
- Kyttala A, Lahtinen U, Bräulke T, Hofmann SL (2006) Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins. *Biochim Biophys Acta* 1762:920-933.
- Kyttala A, Ihrke G, Vesa J, Schell MJ, Luzio JP (2004) Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected nonneuronal and neuronal cells. *Mol Biol Cell* 15:1313-1323.
- Kyttala A, Yliannala K, Schu P, Jalanko A, Luzio JP (2005) AP-1 and AP-3 facilitate lysosomal targeting of Batten disease protein CLN3 via its dileucine motif. *J Biol Chem* 280:10277-10283.
- Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J (2010) Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 9:776-785.
- Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, Mata S, Kremens D, Vitaliani R, Geschwind MD, Bataller L, Kalb RG, Davis R, Graus F, Lynch DR, Balice-Gordon R, Dalmau J (2009) AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 65:424-434.
- Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J (2010) Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol* 9:67-76.
- Lang B, Dale RC, Vincent A (2003) New autoantibody mediated disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 16:351-357.
- Lang B, Newsom-Davis J, Wray D, Vincent A, Murray N (1981) Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet* 2:224-226.
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR (2005) IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202:473-477.
- Liao YJ, Safa P, Chen Y-R, Sobel RA, Boyden ES, Tsien RW (2008) Anti-Ca<sup>2+</sup> channel antibody attenuates Ca<sup>2+</sup> currents and mimics cerebellar ataxia in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:2705-2710.
- Lim MJ, Beake J, Bible E, Curran TM, Ramirez-Montealegre D, Pearce DA, Cooper JD (2006) Distinct patterns of serum immunoreactivity as evidence for multiple brain-directed autoantibodies in juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32:469-482.
- Lim MJ, Alexander N, Benedict JW, Chattopadhyay S, Shemilt SJ, Guerin CJ, Cooper JD, Pearce DA (2007) IgG entry and deposition are components of the neuroimmune response in Batten disease. *Neurobiol Dis* 25:239-251.
- Luiro K, Yliannala K, Ahtiainen L, Maunu H, Jarvela I, Kyttala A, Jalanko A (2004) Interconnections of CLN3, Hook1 and Rab proteins link Batten disease to defects in the endocytic pathway. *Hum Mol Genet* 13:3017-3027.
- Lyly A, von Schantz C, Heine C, Schmiedt ML, Sipila T, Jalanko A, Kyttala A (2009) Novel interactions of CLN5 support molecular networking between Neuronal Ceroid Lipofuscinosis proteins. *BMC Cell Biol* 10:83.
- Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG (2010) Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Annals of Neurology* 67:470-478.
- Mao Q, Xia H, Davidson BL (2003a) Intracellular trafficking of CLN3, the protein underlying the childhood neurodegenerative disease, Batten disease. *FEBS Lett* 555:351-357.
- Mao Q, Foster BJ, Xia H, Davidson BL (2003b) Membrane topology of CLN3, the protein underlying Batten disease. *FEBS Lett* 541:40-46.



- Marmont AM (1994) Defining criteria for autoimmune diseases. *Immunol Today* 15:388.
- Martinez-Gomez J, Lopez-Garcia JA (2005) Electrophysiological and pharmacological characterisation of ascending anterolateral axons in the in vitro mouse spinal cord. *J Neurosci Methods* 146:84-90.
- McKnight K, Jiang Y, Hart Y, Cavey A, Wroe S, Blank M, Shoenfeld Y, Vincent A, Palace J, Lang B (2005) Serum antibodies in epilepsy and seizure-associated disorders. *Neurology* 65:1730-1736.
- Micheva KD, Kay BK, McPherson PS (1997) Synaptotagmin Forms Two Separate Complexes in the Nerve Terminal. *Journal of Biological Chemistry* 272:27239-27245.
- Mitchison HM, Lim MJ, Cooper JD (2004) Selectivity and types of cell death in the neuronal ceroid lipofuscinoses. *Brain Pathol* 14:86-96.
- Mitchison HM, Bernard DJ, Greene ND, Cooper JD, Junaid MA, Pullarkat RK, de Vos N, Breuning MH, Owens JW, Mobley WC, Gardiner RM, Lake BD, Taschner PE, Nussbaum RL (1999) Targeted disruption of the *CLN3* gene provides a mouse model for Batten disease. The Batten Mouse Model Consortium [corrected]. *Neurobiol Dis* 6:321-334.
- Mittmann W, Koch U, Häusser M (2005) Feed-forward inhibition shapes the spike output of cerebellar Purkinje cells. *The Journal of Physiology* 563:369-378.
- Mizejewski GJ (2003) Levels of alpha-fetoprotein during pregnancy and early infancy in normal and disease states. *Obstet Gynecol Surv* 58:804-826.
- Mundigl O, Ochoa GC, David C, Slepnev VI, Kabanov A, De Camilli P (1998) Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:93-103.
- Najjar S, Pearlman D, Zagzag D, Golfinos J, Devinsky O (2012) Glutamic Acid decarboxylase autoantibody syndrome presenting as schizophrenia. *Neurologist* 18:88-91.
- Narayan SB, Rakheja D, Tan L, Pastor JV, Bennett MJ (2006) CLN3P, the Batten's disease protein, is a novel palmitoyl-protein  $\Delta$ -9 desaturase. *Annals of Neurology* 60:570-577.
- Neubert K, Meister S, Moser K, Weisel F, Maseda D, Amann K, Wiethe C, Winkler TH, Kalden JR, Manz RA, Voll RE (2008) The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med* 14:748-755.
- O'Sullivan GA, Kneussel M, Elazar Z, Betz H (2005) GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse. *European Journal of Neuroscience* 22:2644-2648.
- Ortler S, Leder C, Mittelbronn M, Zozulya AL, Knolle PA, Chen L, Kroner A, Wiendl H (2008) B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 38:1734-1744.
- Pears MR, Cooper JD, Mitchison HM, Mortishire-Smith RJ, Pearce DA, Griffin JL (2005) High Resolution 1H NMR-based Metabolomics Indicates a Neurotransmitter Cycling Deficit in Cerebral Tissue from a Mouse Model of Batten Disease. *Journal of Biological Chemistry* 280:42508-42514.
- Persaud-Sawin D-A, Mousallem T, Wang C, Zucker A, Kominami E, Boustany R-MN (2007) Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: A Common Pathway? *Pediatric Research* 61:146-152.
- Persaud-Sawin DA, McNamara JO, 2nd, Rylova S, Vandongen A, Boustany RM (2004) A galactosylceramide binding domain is involved in trafficking of CLN3 from Golgi to rafts via recycling endosomes. *Pediatr Res* 56:449-463.
- Peter BJ (2004) BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* 303:495-499.
- Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark Å (2005) Autoantibodies in Diabetes. *Diabetes* 54:S52-S61.
- Pontikis CC, Cella CV, Parihar N, Lim MJ, Chakrabarti S, Mitchison HM, Mobley WC, Rezaie P, Pearce DA, Cooper JD (2004) Late onset neurodegeneration in the *CLN3*<sup>-/-</sup> mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis is preceded by low level glial activation. *Brain Res* 1023:231-242.
- Praefcke GJ, McMahon HT (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:133-147.

- Raimondi A, Ferguson Shawn M, Lou X, Armbruster M, Paradise S, Giovedi S, Messa M, Kono N, Takasaki J, Cappello V, O'Toole E, Ryan Timothy A, De Camilli P (2011) Overlapping Role of Dynamin Isoforms in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neuron* 70:1100-1114.
- Raju R, Rakocevic G, Chen Z, Hoehn G, Semino-Mora C, Shi W, Olsen R, Dalakas MC (2006) Autoimmunity to GABAA-receptor-associated protein in stiff-person syndrome. *Brain* 129:3270-3276.
- Rakheja D, Narayan SB, Bennett MJ (2008) The function of CLN3P, the Batten disease protein. *Mol Genet Metab* 93:269-274.
- Rakheja D, Narayan SB, Pastor JV, Bennett MJ (2004) CLN3P, the Batten disease protein, localizes to membrane lipid rafts (detergent-resistant membranes). *Biochem Biophys Res Commun* 317:988-991.
- Ramirez-Montealegre D, Pearce DA (2005) Defective lysosomal arginine transport in juvenile Batten disease. *Hum Mol Genet* 14:3759-3773.
- Ramirez-Montealegre D, Chattopadhyay S, Curran TM, Wasserfall C, Pritchard L, Schatz D, Petitto J, Hopkins D, She J-X, Rothberg PG, Atkinson M, Pearce DA (2005a) Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase in the neurodegenerative disorder Batten disease. *Neurology* 64:743-745.
- Ramirez-Montealegre D, Chattopadhyay S, Curran TM, Wasserfall C, Pritchard L, Schatz D, Petitto J, Hopkins D, She JX, Rothberg PG, Atkinson M, Pearce DA (2005b) Autoimmunity to glutamic acid decarboxylase in the neurodegenerative disorder Batten disease. *Neurology* 64:743-745.
- Ramjaun AR, Micheva KD, Bouchelet I, McPherson PS (1997) Identification and Characterization of a Nerve Terminal-enriched Amphiphysin Isoform. *Journal of Biological Chemistry* 272:16700-16706.
- Rao-Ruiz P, Rotaru DC, van der Loo RJ, Mansvelter HD, Stiedl O, Smit AB, Spijker S (2011) Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nature Neuroscience* 14:1302-1308.
- Rogers SW, Andrews PI, Gahring LC, Whisenand T, Cauley K, Crain B, Hughes TE, Heinemann SF, McNamara JO (1994) AUTOANTIBODIES TO GLUTAMATE-RECEPTOR GLUR3 IN RASMUSSENS ENCEPHALITIS. *Science* 265:648-651.
- Rose NR, Bona C (1993) Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14:426-430.
- Rout UK, Mungan NK, Dhossche DM (2012) Presence of GAD65 autoantibodies in the serum of children with autism or ADHD. *Eur Child Adolesc Psychiatry*.
- Roux A, Uyhazi K, Frost A, De Camilli P (2006) GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* 441:528-531.
- Rudomin P (2009) In search of lost presynaptic inhibition. *Exp Brain Res* 196:139-151.
- Rudomin P, Schmidt RF (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129:1-37.
- Sangha S, Narayanan RT, Bergado-Acosta JR, Stork O, Seidenbecher T, Pape H-C (2009) Deficiency of the 65 kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase Impairs Extinction of Cued But Not Contextual Fear Memory. *J Neurosci* 29:15713-15720.
- Seehafer SS, Ramirez-Montealegre D, Wong AM, Chan CH, Castaneda J, Horak M, Ahmadi SM, Lim MJ, Cooper JD, Pearce DA (2011) Immunosuppression alters disease severity in juvenile Batten disease mice. *J Neuroimmunol* 230:169-172.
- Shin SL, Hoebeek FE, Schonewille M, De Zeeuw CI, Aertsen A, De Schutter E (2007) Regular patterns in cerebellar Purkinje cell simple spike trains. *PLoS One* 2:e485.
- Shupliakov O, Low P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L (1997) Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* 276:259-263.
- Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P (1990) Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 322:1555-1560.

- Solimena M, Folli F, Denis-Donini S, Comi GC, Pozza G, De Camilli P, Vicari AM (1988) Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in a patient with stiff-man syndrome, epilepsy, and type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* 318:1012-1020.
- Sommer C, Weishaupt A, Brinkhoff J, Biko L, Wessig C, Gold R, Toyka KV (2005) Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet* 365:1406-1411.
- Sosulina L, Graebenitz S, Pape HC (2010) GABAergic Interneurons in the Mouse Lateral Amygdala: A Classification Study. *Journal of Neurophysiology* 104:617-626.
- Storch S, Pohl S, Quitsch A, Falley K, Bräulke T (2007) C-terminal prenylation of the CLN3 membrane glycoprotein is required for efficient endosomal sorting to lysosomes. *Traffic* 8:431-444.
- Stork O, Yamanaka H, Stork S, Kume N, Obata K (2003) Altered conditioned fear behavior in glutamate decarboxylase 65 null mutant mice. *Genes Brain Behav* 2:65-70.
- Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P (1999) Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1:33-39.
- Tian N, Petersen C, Kash S, Baekkeskov S, Copenhagen D, Nicoll R (1999) The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma-aminobutyric acid release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12911-12916.
- TIBDC (1995) Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. The International Batten Disease Consortium. *Cell* 82:949-957.
- Toyka KV, Brachman DB, Pestronk A, Kao I (1975) Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science* 190:397-399.
- Tuxworth RI, Vivancos V, O'Hare MB, Tear G (2009) Interactions between the juvenile Batten disease gene, CLN3, and the Notch and JNK signalling pathways. *Hum Mol Genet* 18:667-678.
- Vincent A (2010) Autoimmune channelopathies: well-established and emerging immunotherapy-responsive diseases of the peripheral and central nervous systems. *J Clin Immunol* 30 Suppl 1:S97-102.
- Weimer JM, Benedict JW, Getty AL, Pontikis CC, Lim MJ, Cooper JD, Pearce DA (2009) Cerebellar defects in a mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Brain Res* 1266:93-107.
- Weishaupt A, Kreiss M, Gold R, Herrmann T (2004) Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by administration of cells expressing antigenic peptide covalently linked to MHC class II. *J Neuroimmunol* 152:11-19.
- Weishaupt A, Jander S, Brück W, Kuhlmann T, Stienekemeier M, Hartung T, Toyka KV, Stoll G, Gold R (2000) Molecular Mechanisms of High-Dose Antigen Therapy in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Rapid Induction of Th1-Type Cytokines and Inducible Nitric Oxide Synthase. *The Journal of Immunology* 165:7157-7163.
- Wendt KD, Lei B, Schachtman TR, Tullis GE, Ibe ME, Katz ML (2005) Behavioral assessment in mouse models of neuronal ceroid lipofuscinosis using a light-cued T-maze. *Behav Brain Res* 161:175-182.
- Wigge P, McMahon HT (1998) The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* 21:339-344.
- Wigge P, Köhler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D, Hunt SP, McMahon HT (1997) Amphiphysin Heterodimers: Potential Role in Clathrin-mediated Endocytosis. *Molecular Biology of the Cell* 8:2003-2015.
- Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW (1957) CHRONIC THYROIDITIS AND AUTOIMMUNIZATION. *Journal of the American Medical Association* 164:1439-1447.
- Wu Y, Matsui H, Tomizawa K (2009) Amphiphysin I and regulation of synaptic vesicle endocytosis. *Acta Med Okayama* 63:305-323.
- Wulff P, Schonewille M, Renzi M, Viltono L, Sassoe-Pognetto M, Badura A, Gao Z, Hoebeek FE, van Dorp S, Wisden W, Farrant M, De Zeeuw CI (2009) Synaptic inhibition of Purkinje cells mediates consolidation of vestibulo-cerebellar motor learning. *Nat Neurosci* 12:1042-1049.

- Wultsch T, Chourbaji S, Fritzen S, Kittel S, Grunblatt E, Gerlach M, Gutknecht L, Chizat F, Golfier G, Schmitt A, Gass P, Lesch KP, Reif A (2007) Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals. *J Neural Transm Suppl*:69-85.
- Yaksh TL, Rudy TA (1976) Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 17:1031-1036.
- Yamada H, Padilla-Parra S, Park SJ, Itoh T, Chaineau M, Monaldi I, Cremona O, Benfenati F, De Camilli P, Coppey-Moisan M, Tramier M, Galli T, Takei K (2009) Dynamic Interaction of Amphiphysin with N-WASP Regulates Actin Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 284:34244-34256.
- Yoshida Y, Kinuta M, Abe T, Liang S, Araki K, Cremona O, Di Paolo G, Moriyama Y, Yasuda T, De Camilli P, Takei K (2004) The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J* 23:3483-3491.

**Appendix A: Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1: Lokalisation und Funktion der SPS-Antigenen.	8
Abbildung 1.2: Domänenstruktur von Amphiphysin.	9
Abbildung 1.3: Inhibition der Amphiphysin-Dynamin-Interaktion stört die CVE.	11
Abbildung 3.1: Petrischalentest $cln3^{-/-}$ -Mäuse.	26
Abbildung 3.2: Angst-ähnliches Verhalten der $cln3^{-/-}$ -Maus.	28
Abbildung 3.3: vermindertes Reizlernen der $cln3^{-/-}$ -Mäuse.	29
Abbildung 3.4: Normale Koordination bei freiem Laufen.	30
Abbildung 3.5. Motorische Defizite der $cln3^{-/-}$ -Maus.	31
Abbildung 3.6. Histologische Analyse des Rückenmarks von $cln3^{-/-}$ -Mäusen.	32
Abbildung 3.7: Normale spinale inhibitorische Netzwerke in der $cln3^{-/-}$ -Maus.	34
Abbildung 3.8. Purkinjzellaktivität in-vivo und in-vitro.	36
Abbildung 3.9. Positive Wirkung von Bortezomib in der $cln3^{-/-}$ -Maus.	38
Abbildung 4.1. mIPSC und IPSC werden durch Amph-AAK nicht beeinflusst	41
Abbildung 4.2. Beeinträchtigung der synaptischen Transmission durch Amph-AAK bei hochfrequenter Stimulation	42
Abbildung 4.3. Amph-AAK induzieren angstähnliches Verhalten in Ratten.	44
Abbildung 4.4. Serum-AK immunisierter Tiere bindet Antigen bei 128 kD.	46
Abbildung 4.5. Normale Motorik aber veränderter H-Reflex in immunisierten Mäusen.	47

## **Appendix B: Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Die verschiedenen Formen der NCL.

4

## Appendix C: Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACK	Lysispuffer für Rote Blutzellen
algG	Autoantikörper
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AmphP	Amphiphysinprotein
AP	Aktionspotential
AP-5	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure
Calb	Calbindin
Parv	Parvalbumin
AT-EAE	experimentalen adoptive Autoimmunenzephalomyelitis
BHS	Blut-Hirn-Schranke
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Bspw.	beispeilsweise
Bzw.	beziehungweise
Ca <sup>2+</sup>	Wassergelöstes Calcium
Cln3 <sup>-/-</sup> -Maus	Cln3 Knockoutmaus
CLN3P	CLN3 Protein
CNQX	6-Cyano-7-Nitroquinoxaline-2,3-Dione
CS	Konditionierter Reiz
CV	Koeffizient der Varianz
CVE	Clathrin-vermittelte Endozytose
DRP	Dorsalwurzelpotential
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren
EAE	Experimentelle autoimmun Enzephalitis
EPM	Elevated Plus maze
EPSP	Exzitatorische postsynapsische Potentiale
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	inkomplettes Freundesches Adjuvans
FA	Inkomplettes Freundesches Adjuvans
FCM	Durchflusszytometrie (engl.: flow cytometry)
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GABA <sub>A</sub> R	GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren
GABARAP	GABA(A)-Rezeptor-Assoziierte-Protein
GAD65	65kD-Isoform der Glutamatdecarboxylase
GD	Gyrus Dentatus
GTPase	Guanosintriphosphatase
H-Reflex	Hofmann-Reflex
Hz	Herz (Einheit für Frequenz, Schwingungen pro Sekunde)
i.p.	intraperitoneal
i.th.	intrathekal
i.v.	Intravenös
IgG	Immunglobulin G
IgGk	Leichte Kette Kappa
IPSC	Inhibitorsiche postsynaptische Potentiale
IR	Infrarotlicht
ISI	Interstimulusintervall
ISpl	Interspikeintervall
JNCL	Juvenile Neuronale Ceroid-Lipofuszinose oder Batten Disease

---

K	Kilo (Einheitenvorsatz: $10^3$ )
KFA	Komplettes Freundsches Adjuvans
KG	Körpergewicht
KZ	Körnerzelle
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli (Einheitenvorsatz: $10^{-3}$ )
M	Mega (Einheitenvorsatz: $10^6$ ) oder Molare (Konzentration: 1mol/l)
mIPSC	Inhibitorische postsynaptische Miniaturströme
mm	Millimeter
NMDA	N-Methyl-D-Asparaginsäure
OF	Open Field
PAD	präsynaptische afferente Depolarisation
PBS	phosphatgepufferte Natriumchloridlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PF	Parallelfasern
PFA	Paraformaldehyd
PPD	Paarpulsdepression
PPF	Paarpulsfazilitierung
PZ	Purkinjezelle
RM	Rückenmark
s	Sekunde
sEL	saccharosehaltige, extrazelluläre Lösung
TTX	Tetrodotoxin
u/min	Drehzahl (Umdrehungen pro Minute)
U/min	Umdrehungen pro minute
UE	Untereinheit
US	Unkonditionierter Reiz
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem
CLAP	Clathrin/AP2-Bindungsstelle
PRD	prolinreiche Domäne
$\Omega$	Ohm, Maßeinheit für den elektrischen Widerstand



## **Affidavit & eidesstattliche Erklärung**

### **Affidavit**

I hereby confirm that my thesis entitled 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.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation 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.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## Danksagung/Acknowledgements

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Sommer für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die Möglichkeit diese in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und für die Unterstützung bei allen wissenschaftlichen und administrativen Fragen.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Prof. Heckmann für die wissenschaftliche Begleitung und fachliche Unterstützung..

Prof. Dr. Erich Buchner möchte ich für seine wissenschaftliche Ratschlägen während der jährlichen Meetings, sowie für seine Gutachtertätigkeit danken.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Toyka für die Einführung in die Elektromyographie, die wissenschaftliche und persönliche Unterstützung und das Einbinden in die wissenschaftliche Kooperation mit Baltimore.

Größter Dank gilt Dr. Christian Geis für die intensive Betreuung, die Unterstützung in allen Lebenslagen und die Dienste als Leibarzt.

Danken möchte ich auch allen Mitgliedern der AG Sommer für ihre Unterstützung, besonders meinen Mitdoktoranden Christian & Christian für die gemeinsame Arbeit am Stand, Barbara & Barbara für die Unterstützung bei Histo und Lösungen sowie Sonja für die PCR- und ELISA-Durchführung. Großer Dank gilt natürlich auch Lydia & Helga für die Hilfe bei den Tierversuchen. Natürlich danke ich auch Holger, Christian Ritter, Christoph, Christopher, Nandini und Anna für die nette Zusammenarbeit.

Dr. Andreas Weishaupt und Susi gilt mein Dank für die massive Unterstützung bei allen molekularbiologischen und immunologischen Fragen und Arbeiten.

Antonia Post und Sandy Popp, sowie ihren Chefs Prof. Lesch und Prof. Reif möchte ich für die Durchführung der Angst- und Lernstest danken.

Stefan Hallermann danke ich für die unentbehrliche Unterstützung beim Sichten und Auswerten der elektrophysiologischen Daten.

Meiner Freundin Lena danke ich für die Geduld, wenn's mal wieder später wurde oder doch ganz anders kam und für die ein oder andere Ermunterung, so dass auch die administrativen Arbeiten nicht übermäßig lange liegen blieben (zu mindestens meist). Außerdem möchte ich ihr für den täglichen Ausgleich zur Arbeit danken.

Allen meinen Freunden danke ich auch für die moralische Unterstützung und die Geduld und Treue, obwohl ich manchmal zu lange abgetaucht war.

Last but not least möchte ich meiner Familie für die Unterstützung in den letzten Jahren danken, ohne euch würde ich wahrscheinlich als krankenversicherungsloser Steuerbetrüger einsitzen und wüsste vermutlich noch nicht mal warum.

## Publikationsliste

### Fachzeitschriften mit Peer review; Originalarbeiten

1. Geis C\*, Grünewald B\*, Weishaupt A, Wultsch T, Toyka KV, Reif A, Sommer C (2012) Human IgG directed against amphiphysin induces anxiety behavior in a rat model after intrathecal passive transfer. *J Neural Transm.*; DOI: 10.1007/s00702-012-0773-3
2. Pan B, Grünewald B, Nguyen T, Farah M, Polydefkis M, McDonald J, Schramm LP, Toyka KV, Hoke A, Griffin JW (2012) The lateral thoracic nerve and the cutaneous maximus muscle - A novel in vivo model system for nerve degeneration and regeneration studies. *Exp Neurol.*; DOI: 10.1016/j.expneurol.2012.02.006,
3. Geis C, Weishaupt A, Grünewald B, Wultsch T, Reif A, Gerlach M, Dirx R, Solimena M, Perani D, Heckmann M, Toyka KV, Folli F, Sommer C (2011) Human stiff-person syndrome IgG induces anxious behavior in rats. *PLoS One* 6:e16775.
4. Geis C, Weishaupt A, Hallermann S, Grünewald B, Wessig C, Wultsch T, Reif A, Byts N, Beck M, Jablonka S, Boettger MK, Üçeyler N, Fouquet W, Gerlach M, Meinck HM, Siren AL, Sigrist SJ, Toyka KV, Heckmann M, Sommer C (2010) Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain* 133:3166-3180.

(\* bei Publikation 1 handelt es sich um eine geteilte Erstautorenschaft)

### Posterpräsentationen

1. Grünewald B., Geis C., Weishaupt A, Wultsch T., Post A., Reif A, Toyka K. V., Heckmann M., Sommer C. (2011) Altered motor behavior in a mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis is independent from GABAergic spinal inhibition, 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2011
2. Grünewald B., Geis C., Hallermann S., Weishaupt A., Toyka K., Heckmann M., Sommer C. (2010) Stiff person syndrome associated autoantibodies to amphiphysin disturb vesicular endocytosis and synaptic transmission in GABAergic synapses, *FENS Abstr.*, vol.5, 104.7
3. Grünewald B., Geis C., Hallermann S., Weishaupt A., Toyka K., Heckmann M., Sommer C. (2010) Autoantibodies against the amphiphysin SH 3 domain disturb synaptic transmission and vesicle endocytosis, *SfN* 2010