

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Paranodale und nodale Autoantikörper:
Charakterisierung der Anti-Neurofascin-Autoantikörper-assozierten Neuropathie
und Untersuchung des Effektes von Anti-Contactin-1-Autoantikörpern im
Zellkulturmodell**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Helena Maria Stengel

aus Buchdorf

Würzburg, März 2021



Referentin:

Priv.-Doz. Dr. Kathrin Doppler

Korreferentin:

Prof. Dr. Carmen Villmann

Dekan:

Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2021

Die Promovendin ist Ärztin.

*Meinen Eltern Marlene und Robert,
meiner Schwester Antonia,
meinem Opa Hans,
meiner Oma Mina
sowie meinen Minishetlandponys Lumpi und Strupi
gewidmet.*

1. Einleitung	1
1.1 Immunneuropathien.....	1
1.1.1 Systematik der Polyneuropathien	1
1.1.2 Immunneuropathien als behandelbare Unterform der Polyneuropathien.....	1
1.1.2.1 Definition und Unterformen des GBS	2
1.1.2.2 Definition und Unterformen der CIDP	3
1.1.3 Epidemiologie von GBS und CIDP	4
1.1.4 Pathophysiologie von Immunneuropathien mit speziellem Fokus auf Autoantikörpern.....	5
1.1.5 Klinische Manifestation von GBS und CIDP.....	6
1.1.6 Diagnostik bei GBS und CIDP in Form von Liquoranalyse, Elektrophysiologie und Histopathologie.....	8
1.1.7 Diagnose-Kriterien	10
1.1.7.1 Brighton-Diagnosekriterien	10
1.1.7.2 INCAT-Diagnosekriterien	12
1.1.8 Therapie bei GBS und CIDP	13
1.2 Ranvierscher Schnürring	18
1.2.1 Contactin-1	21
1.2.2 Neurofascin-155, -186 und -140.....	21
1.3 Immunglobuline	23
1.3.1 Vergleich IgG und IgM	24
1.3.2 Besonderheiten und Pathomechanismus von IgG4	25
1.4 (Para-)nodopathie als neue Krankheitsentität.....	26
1.4.1 Elektrophysiologische, histopathologische und experimentelle Zeichen der Schädigung Ranvierscher Schnürringe durch paranodale Autoantikörper.....	28
1.4.2 Studienlage zur Identifikation (para-)nodaler Autoantikörper sowie charakteristische klinische Phänotypen.....	29

1.4.3 Therapieansprechen bei PatientInnen mit paranodalen IgG4-Autoantikörpern	33
1.5 Zielsetzung der Arbeit	35
2 Materialien.....	36
2.1 Verwendete Reagenzien	36
2.2 Verwendete Lösungen und Puffer	40
2.3 Verwendete Proteine und Komplement.....	44
2.4 Verwendete Antikörper	44
2.5 Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	47
2.6 Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial	49
2.7 Verwendete Software	51
2.8 Verwendete Zellen und Gewebe	51
2.9 Verwendung geschlechtergerechter Sprache.....	52
3 Methoden.....	53
3.1 PatientInnen- und Kontrollkollektiv.....	53
3.1.1 Subgruppen des PatientInnenkollektives.....	53
3.1.2 Kontrollkollektiv	55
3.1.3 PatientInnen mit Contactin-1-IgG-Autoantikörpern	55
3.1.4 Verarbeitung der Proben.....	55
3.2 Bindungsassays an Zupfnervpräparaten	56
3.2.1 Herstellung von Zupfnervpräparaten.....	56
3.2.2 Durchführung von Bindungsassays	56
3.2.3 Mikroskopie der Zupfnervpräparate	58
3.3 Versuche mit HEK-293-Zellen.....	58
3.3.1 Zellkultur von HEK-293-Zellen	58
3.3.2 Transfektion von HEK-293-Zellen.....	59

3.3.3 Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen.....	60
3.3.4 Präinkubationsversuche an HEK-293-Zellen	62
3.4 ELISA-Untersuchungen	63
3.4.1 Proteinbeschichtung von ELISA-Platten.....	64
3.4.2 Durchführung ELISA	64
3.4.3 Auswertung ELISA	65
3.4.4 Bestimmung des Titers	66
3.4.5 Bestimmung der IgG-Subklasse	66
3.4.6 Präinkubation von Neurofascin-155-IgM Seren an ELISA-Platten.....	67
3.5 ELISA-basierte Komplementbindungsassays mit C1q	69
3.6 Versuche mit murinen Neuronen.....	70
3.6.1 Präparation und Zellkultur muriner cerebellärer Neurone	70
3.6.2 Präparation und Zellkultur muriner Spinalganglienneurone	73
3.6.3 Bindungsassays mit Seren an murinen Neuronen	75
3.6.3.1 Gesamt-IgG-Bindungsassays mit Seren an murinen cerebellären Neuronen und murinen Spinalganglienneuronen	75
3.6.3.2 Subklassenspezifische Bindungsassays an cerebellären murinen Neuronen	76
3.6.4 Inkubationsversuche mit murinen Neuronen.....	76
3.6.5 Immunhistochemische Färbungen von mit Seren inkubierten murinen Neuronen	78
3.6.6 Lysate von mit Seren inkubierten murinen Neuronen.....	79
3.6.7 Zytotoxizitätsassays an inkubierten murinen Neuronen.....	80
3.7 Western Blots	83
4 Ergebnisse.....	89
4.1 Neurofascin-IgG-Autoantikörper	89

4.1.1 Zwei Patienten mit Bindung am paranodalen Axon im Screening mittels Bindungsassays an murinen Ischiadicuszupfnervpräparaten	89
4.1.2 Testung auf IgG-Autoantikörper mittels ELISA	91
4.1.2.1 Nachweis von Neurofascin-155-IgG-Autoantikörpern bei zwei Patienten	91
4.1.2.2 Nachweis von Neurofascin-186-IgG-Autoantikörpern bei einem Patienten	92
4.1.2.3 Nachweis von Neurofascin-140-IgG-Autoantikörpern bei einem Patienten	93
4.1.2.4 Kein Nachweis von Contactin-1-IgG-Autoantikörpern	94
4.1.2.5 Zusammenfassungen der IgG-Autoantikörperdiagnostik mittels ELISA	95
4.1.3 Bestimmung des Neurofascin-IgG Autoantikörpertiters mittels ELISA.....	96
4.1.4 Bestimmung der Neurofascin-IgG Subklassen mittels ELISA und Bestimmung des Komplementbindungsverhaltens mittels Komplementbindungsassay.....	96
4.1.5 Bestätigung der Neurofascin-IgG-Autoantikörper mittels Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen	98
4.1.6 Weiterführende Bindungsassays.....	100
4.1.6.1 Bindung an cerebellären murinen Neuronen.....	101
4.1.6.2 Bindung an Rattenvorderwurzelzupfnervpräparaten.....	102
4.1.6.3 Bindung an Ischiadicuszupfnervpräparaten mit zuvor an transfizierten HEK-293-Zellen präinkubierten Seren.....	104
4.1.7 Klinisches Bild und Therapieansprechen von Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern.....	105
4.1.7.1 IgG-Patient 1	109
4.1.7.2 IgG-Patient 2	114
4.2 Neurofascin-IgM-Autoantikörper.....	115
4.2.1 Testung auf IgM-Autoantikörper mittels ELISA	116

4.2.1.1 Nachweis von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern bei drei PatientInnen.....	116
4.2.1.2 Kein Nachweis von Neurofascin-186- und Contactin-1-IgM-Autoantikörpern.....	118
4.2.2 Bestimmung des Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpertiters mittels ELISA	119
4.2.3 Nachweis der Spezifität von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern durch Präinkubation an ELISA-Platten	120
4.2.4 Bestätigung der Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper mittels Western Blot	121
4.2.5 Keine C1q-Bindung im ELISA-basierten Komplementbindungsassay	123
4.2.6 Klinisches Bild und Therapieansprechen von PatientInnen mit Neurofascin-IgM-Autoantikörpern	123
4.2.6.1 IgM-Patient 1	128
4.2.6.2 IgM-Patient 2	130
4.2.6.3 IgM-Patientin 3.....	131
4.2.6.4 IgM-Patient 4	133
4.2.6.5 IgM-Patient 5	134
4.3 Effekte von Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern verschiedener Subklassen auf cerebelläre Neurone und Spinalganglienneuronen	136
4.3.1 Klinische Aspekte und Autoantikörpernachweis bei CNTN-PatientInnen .	136
4.3.2 Bindungsassays an murinen Neuronen.....	137
4.3.2.1 Gesamt-IgG-Bindung an cerebellären Neuronen und Spinalganglienneuronen	137
4.3.2.2 Subklassenspezifische Bindung an cerebellären Neuronen.....	139
4.3.3 Einfluss von Inkubation mit Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern auf Proteinexpression in immunhistochemischen Färbungen	141

4.3.3.1	Verminderte zeitabhängige Contactin-1-Expression mit Regenerationstendenz.....	142
4.3.3.2	Unveränderte Neurofascin-Expression.....	146
4.3.3.3	Unveränderte Beta-III-Tubulin-Expression.....	148
4.3.4	Bestätigung der verminderten zeitabhängigen Contactin-1 Expression nach Inkubation mit Contactin-IgG-Patientenantikörpern in Western Blots.....	150
4.3.5	Signifikant erhöhte LDH Werte nach Inkubation mit Contactin-1-IgG4-Patientenantikörpern.....	154
5	Diskussion	158
5.1	Neurofascin-IgG-Autoantikörper bei (Para-)nodopathien.....	158
5.1.1	IgG-Patient 2 als typisches Beispiel der vielfach beschriebenen Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie	158
5.1.2	IgG-Patient 1 mit Pan-Neurofascin-IgG3 Autoantikörpern und außergewöhnlich schwerer Erkrankung	160
5.1.3	Autonome Symptomatik bei IgG-Patient 1 und 2	165
5.1.4	Einfluss von IgG-Subklasse, Komplementbindungsverhalten und Therapieansprechen	166
5.1.5	Möglicher Einfluss des Epitopes auf Schwere der Erkrankung	169
5.1.6	Ausblick Pan-Neurofascin-IgG3-(Para-)nodopathie als Subtyp der Neurofascin-(Para-)nodopathie	170
5.2	Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper bei (Para-)nodopathien.....	171
5.2.1	Vorkommen von IgM-Autoantikörpern bei inflammatorischen Polyneuropathien.....	172
5.2.2	Klinische, elektrophysiologische und histopathologische (Para-)nodopathie Merkmale der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern	173
5.2.3	Therapieansprechen auf Plasmapherese, Rituximab und IVIG unter Berücksichtigung der Komplementaktivierung.....	177
5.2.4	Epiphänomen oder pathogene Wirkung von Neurofascin-155-IgM?	178

5.3 Cerebelläre Beteiligung bei Neurofascin-(Para-)nodopathien	180
5.4 Pathophysiologische Wirkung von Contactin-1-IgG4- bzw. -IgG3- Patientenantikörpern im Zellkulturmodell	182
5.4.1 Spinalganglien und Cerebellum als mögliche Angriffspunkte paranodaler Autoantikörper und Bindung als experimentelles Korrelat	184
5.4.2 Veränderte Contactin-1-Proteinexpression nach Inkubation mit Contactin-1- IgG-Patientenantikörpern	186
5.4.3 Fraglicher zytotoxischer Effekt durch Contactin-1-IgG4-Patientenantikörper	188
5.4.4 Internalisierung von Contactin-1 als möglicher pathophysiologischer Mechanismus	189
5.4.5 Ideen für weitere Inkubationsversuche im Zellkulturmodell	193
6 Zusammenfassung und Relevanz der Ergebnisse.....	194
7 Literaturverzeichnis	196
I Abkürzungsverzeichnis	232
II Abbildungsverzeichnis.....	235
III Tabellenverzeichnis	238
IV Danksagung	240
V Lebenslauf.....	242
VI Veröffentlichungen, Auszeichnungen und Vorträge.....	243

1. Einleitung

1.1 Immunneuropathien

Die (Para)nodopathie ist eine spezielle Unterform der autoimmun vermittelten Immunneuropathien. Diese Arbeit setzt sich zum Ziel, die Wirkung der (para)nodalen Contactin-1- bzw. Neurofascin-Autoantikörper und ihren Einfluss auf das klinische Bild sowie das Therapieansprechen betroffener PatientInnen zu charakterisieren.

Im Folgenden werden aktuelle Daten zum Krankheitsbild der Polyneuropathie mit Fokus auf die Immunneuropathien dargestellt, wobei insbesondere auf aktuelle Daten zu Pathophysiologie und Therapieoptionen eingegangen wird.

1.1.1 Systematik der Polyneuropathien

Polyneuropathien sind definiert als Erkrankungen, die auf systemisch bedingte Schädigungen peripherer Nerven zurückzuführen sind. Die daraus resultierenden Symptome umfassen Paresen, Sensibilitätsstörungen mit Hyp-, Par- und Dysästhesien, Schmerzen sowie autonome Symptome wie beispielsweise eine Kreislaufregulationsstörung. Es gibt eine Vielzahl an möglichen Ätiologien für Polyneuropathien, unter anderem metabolische wie Diabetes mellitus, medikamentös-toxische, paraneoplastische und entzündliche. Die Polyneuropathien werden neben der Ätiologie auch nach Zeitverlauf (akut, chronisch), nach den betroffenen Nervenfasertypen (motorisch, sensibel, autonom) sowie nach dem Vorliegen einer primär axonalen oder primär demyelinisierenden Schädigung eingeteilt. Vor einigen Jahren wurde der Begriff der (Para-)nodopathie zur Bezeichnung von Neuropathien mit primärer Schädigung des Ranvierschen Schnürringes neu eingeführt (Uncini & Vallat, 2018).

1.1.2 Immunneuropathien als behandelbare Unterform der Polyneuropathien

Die Ätiologie der Immunneuropathie umfasst sowohl infektiöse als auch autoimmune Ursachen, wobei auch infektiöse Erreger einen autoimmunen Prozess anstoßen können. Die Immunneuropathie im engeren Sinne zeichnet sich dadurch aus, dass der Immunprozess entscheidend für die Pathogenese verantwortlich ist.

Immunneuropathien sind selten, dennoch ist die Diagnosestellung einer Immunneuropathie von direkter Relevanz für die PatientInnen, da diese im Gegensatz zu vielen anderen Polyneuropathien, bei denen die Symptomkontrolle im Vordergrund steht, häufig gut kausal behandelbar sind (Magy & Vallat, 2009).

Bei den Immunneuropathien ist für die Diagnosefindung der zeitliche Verlauf von hoher Relevanz. Schreiten die Symptome für höchstens vier Wochen fort, so liegt eine akute Neuropathie vor. Sind die Symptome dagegen über acht Wochen progredient, handelt es sich um eine chronische Neuropathie. Um die Lücke einer Symptomprogredienz zwischen vier bis acht Wochen zu schließen, wurde zusätzlich der Begriff subakut eingeführt (Oh et al., 2003).

Die häufigste Form der Immunneuropathien ist die chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (CIDP). Außerdem zählt auch die multifokale motorische Neuropathie (MMN), die sich durch eine asymmetrische motorische Neuropathie ohne sensible Beteiligung und die Assoziation mit GM1-IgM-Autoantikörpern auszeichnet, und die vaskulitischen Immunneuropathie zu den chronischen Immunneuropathien. Das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) ist die häufigste akute Immunneuropathie. Bei einzelnen PatientInnen, die zunächst eine GBS-artige Erkrankung zeigen, sind die Symptome allerdings über acht Wochen hinaus progredient, sodass dann die Diagnose einer CIDP gestellt wird. Bei diesen PatientInnen mit einer GBS-artig beginnenden CIDP können häufiger (para-)nodale Autoantikörper nachgewiesen werden (Burnor et al., 2018; Cortese et al., 2020; Devaux et al., 2016; Doppler et al., 2015b; Querol et al., 2013), worauf in Kapitel 1.4 näher eingegangen wird.

Da sich diese Promotion auf PatientInnen mit GBS und CIDP fokussiert, konzentrieren sich die folgenden Kapitel zunächst auf diese beiden Krankheitsbilder.

1.1.2.1 Definition und Unterformen des GBS

Das Guillain-Barré-Syndrom wurde 1916 von den französischen Ärzten Georges Guillain, Jean-Alexandre Barré und André Strohl zum ersten Mal bei zwei Soldaten mit akut aufgetretener Tetraparese mit folgender Erholung beschrieben. (Guillain, 1953; Guillain et al., 1999). Die häufigste Unterform des GBS stellt die akute inflammatorische demyelinisierende Neuropathie (AIDP) dar, bei der bereits 1969 fokale Demyelinisierung

mit begleitenden inflammatorischen Infiltraten nachgewiesen wurde (Asbury et al., 1969; Hughes & Cornblath, 2005). Daneben existieren seltenere axonale Unterformen. Die akute motorisch axonale Neuropathie (AMAN) zeichnet sich durch ein rein motorisches Defizit aus (McKhann et al., 1991), während bei der akuten motorisch-sensiblen axonalen Neuropathie (AMSAN) zusätzlich eine sensible Beteiligung besteht (Griffin et al., 1996). Das Miller-Fisher-Syndrom, das sich klassischerweise mit der Trias aus Ataxie, Areflexie und Ophthalmoplegie präsentiert (Fisher, 1956) und mit GQ1b-IgG-Autoantikörpern assoziiert ist (Wakerley et al., 2014), wird als Überlappungssyndrom des GBS angesehen (Hughes & Cornblath, 2005).

1.1.2.2 Definition und Unterformen der CIDP

Dyck führte für eine Gruppe von PatientInnen mit sensomotorischer Polyneuropathie und dem Nachweis einer durch Makrophagen induzierten segmentalen Demyelinisierung bei monophasischem, schubförmigen oder chronisch progredientem Verlauf den Begriff der CIDP ein (Dyck et al., 1975; Dyck et al., 1982). Im Gegensatz zum GBS ist die CIDP chronisch und schreitet über mindestens 8 Wochen fort.

Neben der klassischen CIDP wurden weitere atypische Unterformen definiert. Das Lewis-Sumner-Syndrom, das auch als multifokale erworbene demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie (MADSAM) bezeichnet wird, stellt eine Variante der CIDP mit asymmetrischer Verteilung und dem häufigen Auftreten von Leitungsblöcken dar (Lehmann et al., 2019; Lewis et al., 1982). Die Unterform der distal erworbenen demyelinisierenden symmetrischen Polyneuropathie (DADS) manifestiert sich vor allem distal an Hand- sowie Fußmuskulatur, geht elektrophysiologisch mit deutlich verlängerten distal motorischen Latenzen einher und ist mit IgM-Autoantikörpern gegen Myelin assoziiertes Glykoprotein (MAG) bei monoklonaler IgM-Gammopathie assoziiert, wobei sie beim Nachweisen eben dieser Autoantikörper dann auch als Anti-MAG-Neuropathie bezeichnet wird (Katz et al., 2000; Lehmann et al., 2019; Saperstein et al., 2001). Eine sehr seltene Unterform ist die CANOMAD-Neuropathie, was als Akronym für eine chronisch ataktische Neuropathie, assoziiert mit Ophthalmoplegie, IgM-Paraprotein, Kälteagglutininen sowie Disialosyl-Gangliosid-Autoantikörpern, steht (Lehmann et al., 2019; Willison et al., 2001). Weitere Unterformen sind die rein motorische bzw. rein sensible CIDP (Lehmann et al., 2019).

1.1.3 Epidemiologie von GBS und CIDP

Immunneuropathien sind insgesamt sehr seltene Erkrankungen. Für die Darstellung der Häufigkeit wird hier bei GBS als akute Erkrankung die Inzidenz und bei der CIDP als chronische Erkrankung die Prävalenz angegeben.

Das GBS tritt mit einer Inzidenz zwischen 0,8-2,0 pro 100.000 Einwohnern auf, wobei eine Zunahme der Inzidenz mit dem Alter nachgewiesen wurde (Chiò et al., 2003; Hughes & Cornblath, 2005; Rees et al., 1998; Sejvar et al., 2011a; Van Koningsveld et al., 2000). Bei den Unterformen zeigen sich regionale Unterschiede in der Inzidenz. Die AIDP tritt häufiger in Europa und Nordamerika auf, während die axonalen Formen AMAN und AMSAN in Asien häufiger vorkommen (Goodfellow & Willison, 2016; Griffin et al., 1995).

Die Prävalenz der CIDP zeigt in verschiedenen Studien eine Prävalenz zwischen 1,6-7,7 pro 100.000 Einwohnern (Chiò et al., 2007; Iijima et al., 2008; Lefter et al., 2017; Lunn et al., 1999; McLeod et al., 1999; Mygland & Monstad, 2001), wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter bei etwa 50 Jahren liegt (Nobile-Orazio et al., 2017; Vedeler et al., 2013).

Im Gegensatz zu vielen anderen Autoimmunerkrankungen sind sowohl bei der CIDP als auch beim GBS Männer deutlich häufiger betroffen als Frauen (Hughes & Cornblath, 2005; Iijima et al., 2008; McLeod et al., 1999; Sejvar et al., 2011a; Vallat et al., 2010).

Beim GBS, nicht aber bei der CIDP konnte eine deutliche Assoziation mit vorausgehenden Infekten nachgewiesen werden (Vallat et al., 2010; Winer et al., 1988). Die Infektsymptomatik vor dem Auftreten des GBS ist am häufigsten grippeartig oder gastrointestinal (GBS-Study-Group-Italy, 2000; Winer et al., 1988), wobei als mit dem GBS assoziierte Erreger *Campylobacter jejuni*, das Cytomegalie-, das Epstein-Barr-, das Zika-Virus sowie *Mycoplasma pneumoniae* identifiziert wurden (Cao-Lormeau et al., 2016; Jacobs et al., 1998).

1.1.4 Pathophysiologie von Immunneuropathien mit speziellem Fokus auf Autoantikörpern

Zur Schädigung des peripheren Nervensystems können sowohl humorale Mechanismen mit Autoantikörpern und Komplementaktivierung als auch zelluläre Effekte durch autoreaktive T-Zellen und Makrophagen beitragen (Dalakas, 2015). Durch autoreaktive T-Zellen, die Chemokine und Proteasen sekretieren, kommt es zu einem Zusammenbruch der Blutnervenschranke, sodass inflammatorische Zellen und Autoantikörper die nervalen Strukturen direkt schädigen können. (Kieseier et al., 2018).

Sowohl bei GBS- als auch CIDP-PatientInnen wurden in Suralisbiopsien inflammatorische Zellen mit Makrophagen und T-Zellen nachgewiesen, die die Nerven infiltrieren (Kiefer, 1998; Kiefer et al., 2001; Kieseier et al., 2018; Schmidt et al., 1996; Sommer et al., 2005). Die Makrophagen sezernieren proinflammatorische Zytokine und wirken als Effektor der Demyelinisierung (Dalakas, 2015; Kiefer et al., 2001; Mathey et al., 2015).

Die häufig schnelle Besserung von Immunneuropathien durch Plasmapherese oder intravenöse Immunglobuline (IVIG) legt nahe, dass humorale Faktoren wie Autoantikörper und Komplementaktivierung einen wichtigen Beitrag zur Pathogenese leisten (Kieseier et al., 2018). Allerdings ist der Einfluss der Autoantikörper bisher nur bei den axonalen GBS-Formen gut verstanden. Bei 80 % der PatientInnen mit AMAN oder AMSAN können Autoantikörper gegen die Ganglioside GM1, GD1a, GalNAc-GD1a oder GM1b nachgewiesen werden (Dalakas, 2015). Ganglioside sind Glykosphingolipide, die mit ihrem Fettanteil in der zellulären Membran verankert sind und einen verzweigten Zuckeranteil an der Zelloberfläche exponieren, wobei GM1 ein und GD1 zwei Sialinsäuremoleküle enthält (Hughes & Cornblath, 2005). Ganglioside kommen in allen Gewebearten vor, werden aber in Nerven besonders stark exprimiert (Hughes & Cornblath, 2005). Teilweise besteht eine Assoziation bestimmter Unterformen mit speziellen Gangliosid-Autoantikörpern. So ist die AMAN mit GM1- sowie GD1a-Autoantikörpern (Ho et al., 1999; Yuki & Kuwabara, 2007) und das Miller-Fisher-Syndrom mit GQ1b-Autoantikörpern assoziiert (Shahrizaila & Yuki, 2013; Wakerley et al., 2014). Gerade die axonalen GBS-Formen gehen häufig mit vorausgehenden Infektionen insbesondere mit *Campylobacter jejuni* einher (vgl. Kapitel

1.1.3). Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Epitope der Ganglioside GM1 und GQ1b auch in Lipopolysacchariden von *Campylobacter jejuni* vorhanden sind (Yuki, 1993; Yuki et al., 1994). Dadurch können die gegen den Erreger gebildeten Antikörper dann auch die nervalen Ganglioside erkennen, was in der Immunologie als Phänomen des molekularen Mimikry bezeichnet wird (Ang et al., 2004).

Es finden sich einige Hinweise, dass diese Gangliosid-Autoantikörper pathogen wirken. Bei einer Fallserie von sieben PatientInnen trat nach einer kommerziellen, damals therapeutischen Gangliosid-Infusion eine AMAN Erkrankung auf, wobei hochtitrig an den Ranvierschen-Schnürring bindende Gangliosid-IgG-Autoantikörper nachgewiesen wurden (Illa et al., 1995). Auch mit GM-1 immunisierte Tiere entwickelten eine mit AMAN vergleichbare Erkrankung sowie eine nachweisbare axonale Schädigung (Yuki et al., 2001) und in einem Tiermodell mit Gangliosid-Immunsierung konnte eine Zerstörung der Schnürringarchitektur gezeigt werden (Susuki et al., 2007b).

Bei den demyelinisierenden Immunneuropathien, der AIDP und der CIDP, konnten bisher bei einem geringen Prozentsatz der PatientInnen spezifische Autoantikörper gegen nervale Strukturen identifiziert werden (Kieseier et al., 2018). Allerdings konnte bei 43 % der GBS-PatientInnen und 30 % der CIDP-PatientInnen eine Bindung des Serums an Strukturen des Ranvierschen Schnürringes nachgewiesen werden (Devaux et al., 2012). Einige Proteine des Ranvierschen Schnürringes konnten als Zielantigene bei demyelinisierenden Immunneuropathien identifiziert werden (Querol & Illa, 2015; Stathopoulos et al., 2015; Tang et al., 2020; Vural et al., 2018), (siehe Kapitel 1.4).

1.1.5 Klinische Manifestation von GBS und CIDP

In diesem Kapitel werden die klinischen Merkmale von GBS und CIDP vergleichend gegenübergestellt.

Während sich die CIDP meist schleichend über Monate entwickelt und mindestens 8 Wochen progredient ist, nehmen die Symptome beim GBS innerhalb von Tagen zu, wobei spätestens nach 4 Wochen ein Symptomnadir erreicht wird (Kieseier et al., 2018). Allerdings beginnt die Erkrankung auch bei 2-18 % der CIDP-PatientInnen akut, womit diese Fälle in der Abgrenzung zur AIDP eine diagnostische Herausforderung darstellen (Mathey et al., 2015; Odaka et al., 2003; Ruts et al., 2010; Viala et al., 2010).

Sowohl CIDP als auch GBS zeichnen sich typischerweise durch im Vordergrund stehende motorische Symptome aus. Bei der CIDP treten allmählich zunehmende proximale sowie distale Paresen mit meist symmetrischer Verteilung auf (Dyck et al., 1975; Dyck & Tracy, 2018), während sich die Schwäche beim GBS rasch progredient und meist von distal aufsteigend symmetrisch manifestiert (Willison et al., 2016). Sowohl beim GBS als auch bei der CIDP zeigen sich in der klinischen Untersuchung abgeschwächte oder ausgefallene Reflexe (Dyck & Tracy, 2018; Fokke et al., 2014; McOmbe et al., 1987; Willison et al., 2016). Eine Hirnnervenbeteiligung tritt bei etwa 50 % der GBS-PatientInnen auf (Asbury & Cornblath, 1990; Fokke et al., 2014), während sie bei der CIDP mit etwa 10 % eher eine Rarität darstellt (Gorson et al., 1997; McOmbe et al., 1987).

Bei der CIDP treten bei etwa 70 % der PatientInnen sensible Symptome in Form von Hypästhesie, Pallhypästhesie, Parästhesien und eingeschränkter Propriozeption auf (Dyck & Tracy, 2018; Gorson et al., 1997; McOmbe et al., 1987). Beim GBS manifestiert sich die sensible Beteiligung meist mit Hyp- oder Parästhesien und ist nur mild ausgeprägt (Asbury & Cornblath, 1990; Willison et al., 2016). Schmerzen, häufig in Form von Rücken- oder Muskelschmerzen beschrieben, sind ein typisches Merkmal bei 54-89 % der GBS-PatientInnen, wobei die Schmerzen etwa bei einem Drittel der PatientInnen bereits den Lähmungen vorausgehen (Fokke et al., 2014; Ruts et al., 2010; Van Den Berg et al., 2014). Bei der CIDP werden Schmerzen als „untergeordnetes Merkmal“ beschrieben, können bei einzelnen PatientInnen aber dennoch stark ausgeprägt auftreten (Dyck & Tracy, 2018).

Autonome Symptome und Beatmungspflichtigkeit treten bei GBS-PatientInnen signifikant häufiger auf (Dionne et al., 2010). Beim GBS sind 20-30 % der PatientInnen auf eine Beatmung angewiesen (Fokke et al., 2014; Willison et al., 2016), während bei CIDP-PatientInnen eine Beatmungspflichtigkeit sehr selten ist (Dyck & Tracy, 2018). Eine autonome Symptomatik tritt bei bis zu zwei Dritteln der GBS-PatientInnen auf und manifestiert sich häufig in Form von kardiovaskulären Komplikationen mit Arrhythmien oder Hypotension (Kaur et al., 2021; Van Den Berg et al., 2014). Bei CIDP-PatientInnen ist die autonome Symptomatik, wenn dann sehr mild ausgeprägt und manifestiert sich am häufigsten durch eine pathologische Schweißsekretion (Figuroa et al., 2012; Stamboulis

et al., 2006). Ein Tremor kann bei den Immunneuropathien vorkommen, er gilt allerdings nicht als typisches klinisches Merkmal und ist meist mild ausgeprägt (Deuschl & Bergman, 2002; Wasielewska et al., 2013).

An einer GBS-Erkrankung versterben in Europa und Nordamerika 3-7 % der PatientInnen, wobei hierfür meist autonome oder pulmonale Komplikationen verantwortlich sind (Willison et al., 2016). Ein Jahr nach einer GBS-Erkrankung können 80 % der PatientInnen wieder eigenständig gehen und 60 % zeigen keine Paresen (Rajabally & Uncini, 2012). Auch 10 Jahre nach der GBS-Erkrankung leiden allerdings noch 14 % der PatientInnen an einer moderaten bis schweren Behinderung (Forsberg et al., 2012). Die GBS-Erkrankung verläuft per definitionem monophasisch, allerdings kommt es bei bis zu 6 % der PatientInnen zu Rezidiven (Kuitwaard et al., 2009). Eine CIDP-Erkrankung kann monophasisch, schubförmig oder chronisch progredient verlaufen (Vallat et al., 2010). Grundsätzlich ist der langzeitliche Verlauf der CIDP gut, wobei die individuelle Prognose je nach Alter und Verlaufsform deutlich variieren kann (Mygland et al., 2005; Vallat et al., 2010). Nach fünfjähriger Therapie zeigten in einer Studie 26 % der CIDP-PatientInnen eine komplette und 61 % eine partielle Remission, während 13 % weiterhin an einer schweren Behinderung litten (Kuwabara, 2006).

1.1.6 Diagnostik bei GBS und CIDP in Form von Liquoranalyse, Elektrophysiologie und Histopathologie

Die Diagnose einer CIDP bzw. GBS-Erkrankung stützt sich auf die Anamnese, die klinische Untersuchung sowie weitere Diagnostik, die in der Regel eine Liquoranalyse sowie eine elektrophysiologische Untersuchung umfasst. Laborchemische Untersuchungen dienen dem Ausschluss anderer Neuropathieursachen. Teilweise wird die Diagnostik durch die histopathologische Analyse einer Nervenbiopsie ergänzt.

In der Liquordiagnostik zeigt sich sowohl bei GBS- als auch bei CIDP-PatientInnen typischerweise eine zytalbuminäre Dissoziation. Darunter versteht man eine Erhöhung der Gesamteiweißwerte im Liquor > 50mg/dl bei allenfalls gering erhöhter Zellzahl bis 10 Zellen/ μ l, was auf eine Inflammation der Nervenwurzeln hinweist (Brettschneider et al., 2005; Vallat et al., 2010). Eine fehlende zytalbuminäre Dissoziation schließt inflammatorische demyelinisierende Erkrankungen allerdings auch nicht aus, da sie bei

GBS-PatientInnen insbesondere in den ersten zwei Wochen und auch bei bis zu 10 % der CIDP-PatientInnen fehlen kann (Goodfellow & Willison, 2016; Hughes & Cornblath, 2005; Vallat et al., 2010).

In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigen sich sowohl bei AIDP- als auch bei CIDP-PatientInnen typische Befunde der Demyelinisierung wie reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten, Leitungsblöcke, eine abnormale temporale Dispersion, verlängerte distal motorische Latenzen sowie verlängerte F-Wellen-Latenzen oder ausgefallene F-Wellen (American-Academy-of-Neurology, 1991; Dyck et al., 1975; Hughes & Cornblath, 2005; Van Den Bergh & Piéret, 2004). Meist sind die sensiblen Antworten von Nerven der oberen Extremität beim GBS deutlicher beeinträchtigt als der Nervus suralis an der unteren Extremität, was auch als Phänomen des „Sural nerve sparing“ bezeichnet wird (Albers et al., 1985; Derksen et al., 2014). Bei axonalen GBS-Formen zeigen sich hingegen Zeichen einer axonalen Schädigung wie verminderte motorische und/oder sensible Amplituden (Van Den Berg et al., 2014). Bei AMAN-PatientInnen finden sich außerdem häufig sehr schnell reversible Leitungsblöcke, die mit dem Vorhandensein von GM1-IgG-Autoantikörpern assoziiert sind und durch eine vorübergehende Leitungsstörung am Ranvierschen Schnürring erklärt werden (Kokubun et al., 2010; Kuwabara et al., 1998; Uncini et al., 2010). Bei ausgeprägter Demyelinisierung können bei AIDP und CIDP im Verlauf Zeichen einer sekundären axonalen Schädigung wie verminderte Amplituden in den Neurographien und Spontanaktivität sowie ein neurogenes Schädigungsmuster in der elektromyographischen Untersuchung auftreten, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Hadden et al., 1998; Hughes & Cornblath, 2005; Moss et al., 2020).

Zur Abgrenzung von einer vaskulitischen Neuropathie, kann die Diagnostik insbesondere bei atypischen CIDP-PatientInnen durch eine Suralisbiopsie ergänzt werden (Kieseier et al., 2018). Bei einem für die CIDP typischen Befund zeigen sich Zeichen der De- und Remyelinisierung mit Makrophagen assoziierter Demyelinisierung, Zwiebelschalenformationen, inflammatorische Infiltrationen mit T-Zellen und Makrophagenclustern insbesondere an endoneuralen Gefäßen, ein endoneurales Ödem und verschieden große Faszikel (Joint-Task-Force-of-the-EFNS-and-the-PNS., 2010). Allerdings sind positive Befunde nicht spezifisch und negative Befunde schließen die

CIDP-Diagnose explizit nicht aus (Joint-Task-Force-of-the-EFNS-and-the-PNS., 2010), insbesondere da bei der CIDP auch überwiegend proximale Nerven betroffen sein können, während in der Regel der distale Nervus suralis biopsiert wird (Dyck & Tracy, 2018). Bei GBS-PatientInnen wird im Rahmen der klinischen Diagnostik normalerweise keine Nervenbiopsie durchgeführt (Hughes & Cornblath, 2005).

1.1.7 Diagnose-Kriterien

Es gibt sowohl für das GBS als auch für die CIDP verschiedene Diagnose-Kriterien (American-Academy-of-Neurology, 1991; Asbury & Cornblath, 1990; Fokke et al., 2014; Sander & Latov, 2003; Van Den Bergh & Piéret, 2004). Hier werden die im Rahmen dieses Promotionsprojektes verwendeten Brighton-Diagnosekriterien für das GBS und die inflammatory neuropathy cause and treatment (INCAT) –Diagnosekriterien für die CIDP vorgestellt. Diese beiden Diagnosekriterien wurden ausgewählt, da sie auch im Promotionsprojekt von Dr. Luise Appeltshauser verwendet worden waren und es durch das Anwenden einheitlicher Diagnosekriterien möglich wurde das Patientenkollektiv beider Arbeiten beim gemeinsamen Erstellen einer Publikation zusammenzufassen.

1.1.7.1 Brighton-Diagnosekriterien

Die folgende Tabelle 1 zeigt die allgemeinen Brighton-Diagnosekriterien, Tabelle 2 die elektrophysiologischen Brighton-Diagnosekriterien für GBS-Unterformen. Die jeweiligen Diagnosekriterien wurden aus der Originalquelle übersetzt (Sejvar et al., 2011b).

Tabelle 1: Brighton-Diagnosekriterien für GBS übersetzt aus Sejvar et al., 2011b

Level 1 diagnostischer Sicherheit	
Klinische Symptomatik	beidseitige und schlaffe Paresen der Extremitäten
Reflexstatus	Hypo-oder Areflexie in paretischen Extremitäten
Verlauf	monophasisch; Zeitraum zwischen Krankheitsbeginn und Nadir zwischen 12 Stunden und 28 Tagen; folgendes klinisches Plateau, das mit Stabilisierung, Verbesserung oder Tod einhergeht
Elektrophysiologie	Befunde mit GBS zu vereinbaren
Liquoranalytik	zytalbuminäre Dissoziation mit erhöhtem Liquorprotein und Leukozytenzahl < 50 / μ l
Differentialdiagnosen	keine wahrscheinlichere Alternativdiagnose
Level 2 diagnostischer Sicherheit	
Klinische Symptomatik	beidseitige und schlaffe Paresen der Extremitäten
Reflexstatus	Hypo-oder Areflexie in paretischen Extremitäten
Verlauf	monophasisch; Zeitraum zwischen Krankheitsbeginn und Nadir zwischen 12 Stunden und 28 Tagen; folgendes klinisches Plateau, das mit Stabilisierung, Verbesserung oder Tod einhergeht
Elektrophysiologie und Liquoranalytik	entweder Liquoranalytik mit Leukozytenzahl < 50 / μ l bei erhöhtem oder normalem Liquorprotein oder wenn keine Liquoranalytik: elektrophysiologische Befunde mit GBS zu vereinbaren
Differentialdiagnosen	keine wahrscheinlichere Alternativdiagnose
Level 3 diagnostischer Sicherheit	
Klinische Symptomatik	beidseitige und schlaffe Paresen der Extremitäten
Reflexstatus	Hypo-oder Areflexie in paretischen Extremitäten
Verlauf	monophasisch; Zeitraum zwischen Krankheitsbeginn und Nadir zwischen 12 Stunden und 28 Tagen; folgendes klinisches Plateau, das mit Stabilisierung, Verbesserung oder Tod einhergeht
Differentialdiagnosen	keine wahrscheinlichere Alternativdiagnose

Tabelle 2: Elektrophysiologische Brighton-Diagnosekriterien für GBS-Unterformen übersetzt aus Sejvar et al., 2011b

AIDP	AMAN	AMSAN
mindestens eines der folgenden Kriterien in mindestens zwei Nerven oder mindestens zwei der Kriterien in mindestens einem Nerven, wenn alle anderen Nerven nicht ableitbar sind und das Summenaktionspotential > 10 % des unteren Grenzwertes liegt: - Nervenleitgeschwindigkeit < 90 % des unteren Grenzwertes - distal motorische Latenz > 110 % des oberen Grenzwertes - F-Wellen-Latenz > 120 % des oberen Grenzwertes - Verhältnis zwischen proximalem und distalem Summenaktionspotential < 0,5 und distales Summenaktionspotential > 20 % des unteren Grenzwertes	keines der AIDP Kriterien erfüllt außer ein demyelinisierendes Kriterium in einem Nerven erlaubt, wenn distales Summenaktionspotential < 10 % des unteren Grenzwertes und Amplituden des sensiblen Aktionspotentials normal	keines der AIDP Kriterien erfüllt außer ein demyelinisierendes Kriterium in einem Nerven erlaubt, wenn distales Summenaktionspotential < 10 % des unteren Grenzwertes und Amplituden des sensiblen Aktionspotentials < 10 % des unteren Grenzwertes

1.1.7.2 INCAT-Diagnosekriterien

Die folgende Tabelle 3 zeigt die INCAT-Diagnosekriterien, welche aus der Originalquelle übersetzt wurden (Hughes et al., 2001a).

Tabelle 3: INCAT-Diagnosekriterien übersetzt aus Hughes et al., 2001a

Klinische Symptomatik	motorische und sensible Dysfunktion an mehr als einer Extremität auf Grund einer Neuropathie; Einschränkung der Funktion von oberer und/oder unterer Extremität; entwickelt über mindestens zwei Monate; fortschreitend oder schubförmig; stabile oder fortschreitende Erkrankung ohne spontane Verbesserung.
Reflexstatus	Hypo- oder Areflexie
Liquoranalytik	< 10 Leukozyten / µl

Elektrophysiologische und histopathologische Kriterien	<p>Entweder 1.: Partieller Leitungsblock oder abnormale temporale Dispersion in mindestens zwei Nerven und signifikant reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit oder signifikant verlängerte distal motorische Latenz oder signifikant verlängerte F-Wellen-Latenz bzw. ausgefallene F-Wellen in mindestens einem weiteren Nerven</p> <p>oder 2.: Bei Abwesenheit von Leitungsblock oder abnormaler temporaler Dispersion, signifikant reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit oder signifikant verlängerte distal motorische Latenz oder signifikant verlängerte F-Wellen-Latenz bzw. ausgefallene F-Wellen in mindestens drei Nerven</p> <p>oder 3.: Bei signifikant abnormalen neurophysiologischen Werten in nur zwei Nerven, eindeutige histologische Evidenz für Demyelinisierung oder demyelinisierte Nervenfasern in einer Nervenbiopsie</p>
Elektrophysiologische Untersuchungstechnik	<p>Testung der Nerven auf beiden Seiten, an den jeweils in Klammern angegebenen Stellen; an jedem Nerven werden zehn aufeinanderfolgende F-Wellen und die minimal motorische Latenz gemessen:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Nervus medianus (Handgelenk, Ellenbeuge, Axilla) -Nervus ulnaris (Handgelenk, Ellenbogen, Axilla, Erb-Punkt) -Nervus peroneus (Knöchel, unterhalb sowie oberhalb des Fibularisköpfchens) -Nervus tibialis (Knöchel, Kniekehle)
Elektrophysiologische Definitionen	<p>Partieller Leitungsblock: $\geq 20\%$ Amplituden- und Flächendifferenz des Potentials zwischen proximaler und distaler Stimulation, bei $\leq 15\%$ Änderung der Potentialdauer zwischen proximaler und distaler Stimulationsstelle</p> <p>Abnormale temporale Dispersion und möglicher Leitungsblock: $\geq 15\%$ Änderung der Potentialdauer zwischen proximaler und distaler Stimulationsstelle und $\geq 20\%$ Amplituden- und Flächendifferenz des Potentials zwischen proximaler und distaler Stimulation</p> <p>Signifikant reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit: $\leq 80\%$ des unteren Grenzwertes; bzw. wenn Amplitude $< 80\%$ dann $< 70\%$ des unteren Grenzwertes</p> <p>Signifikant verlängerte distal motorische Latenz: $\geq 125\%$ des oberen Grenzwertes; bzw. wenn Amplitude $< 80\%$ dann $> 150\%$ des oberen Grenzwertes</p> <p>Signifikant verlängerte F-Wellen-Latenz: $\geq 120\%$ des oberen Grenzwertes; bzw. wenn Amplitude $< 80\%$ dann $> 150\%$ des oberen Grenzwertes</p>

1.1.8 Therapie bei GBS und CIDP

Sowohl GBS als auch CIDP-PatientInnen werden mit immunmodulatorischen Therapien behandelt.

Die Therapie von GBS-PatientInnen soll mit IVIG oder Plasmapherese erfolgen (Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018). Die hierbei von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) empfohlene Dosierung sowie Evidenz und Empfehlungsgrad sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Therapiestrategien für AIDP und AMAN unterschieden sich hierbei nicht (Kieseier et al., 2018). Glukokortikosteroide sollen bei GBS nicht verabreicht werden, da sie die Erholung verzögern (Hughes et al., 2016; Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018).

Tabelle 4: Therapieempfehlung GBS

GBS-Therapie	IVIG	Plasmapherese
Evidenz	Ib	Ib
Empfehlungsgrad	A	A
Dosierung	0,4 g pro kg Körpergewicht pro Tag an fünf Tagen oder 1 g pro kg Körpergewicht pro Tag an zwei Tagen	Vier Plasmaaustausche mit je eineinhalb bzw. einem Plasmavolumen über ein bis zwei Wochen

inhaltlich übernommen aus der DGN Leitlinie „Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden“ (Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018)

Für Plasmapherese konnte die Effektivität im Vergleich zu supportiver Therapie durch eine deutlich geringere Beatmungspflichtigkeit nach vier Wochen sowie eine häufigere Wiedererlangung der vollen Kraft nach einem Jahr nachgewiesen werden (Chevret et al., 2017; Hughes & Cornblath, 2005). Zwischen IVIG und Plasmapherese konnte unter anderem im Hinblick auf die Faktoren Beatmungspflichtigkeit, Tod und Gangfähigkeit nach einem Jahr kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Hughes et al., 2001b; Van Der Meché & Schmitz, 1992), sodass die Abwägung zwischen beiden Therapieoptionen individuell erfolgen kann. Es sollte ein regelmäßiges Monitoring insbesondere im Hinblick auf die respiratorische Vitalkapazität und auf kardiale Arrhythmien erfolgen, da insgesamt bei einem von drei GBS-PatientInnen eine intensivstationäre Versorgung notwendig wird (Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018; Wijdicks & Klein, 2017). Sowohl bei der Plasmapherese als auch bei IVIG handelt es sich um sehr kostenintensive Therapien. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Kosten für Plasmapheresen durch eine Vermeidung von Intensivaufenthalten und Verkürzung der Krankheitsdauer kompensiert werden (Cortese et al., 2011; Espérou et al., 2000; Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018; Wijdicks & Klein, 2017).

Eculizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den Komplementfaktor C5, wurde in Studien getestet, allerdings konnte bislang keine Überlegenheit gegenüber Placebo nachgewiesen werden (Davidson et al., 2016; Misawa et al., 2018).

Bei CIDP sind die vorrangig empfohlenen Therapieoptionen IVIG, Glukokortikosteroide sowie bei akuter Verschlechterung Plasmapherese, die bei 50-70 % der PatientInnen zu einem Ansprechen führen (Nobile-Orazio et al., 2017; Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018). Die jeweilige Evidenz, Empfehlungsgrad und das von der DGN empfohlene Therapieregime sind in folgender Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Therapieempfehlung CIDP

CIDP-Therapie	IVIG	Glukokortikosteroide	Plasmapherese
Evidenz	Ia	Ib	Ib
Empfehlungsgrad	A	A	A
Dosierung	2 g pro kg Körpergewicht als Initialdosis über zwei bis vier Tage, gefolgt von Erhaltungsdosen von 1 g pro kg Körpergewicht über ein bis zwei Tage in dreiwöchentlichem Abstand, unter Versuch der Dosisreduktion	Prednisolon-Äquivalent 1 mg pro kg Körpergewicht pro Tag oder Pulstherapie mit 500–1000 mg Methylprednisolon pro Tag an drei bis fünf Tagen, anschließende Reduktion auf orale Erhaltungsdosis. Ziel: nach drei bis vier Monaten unterhalb der Cushingschwelle oder Pulstherapie mit 500–1000 mg Methylprednisolon pro Tag an ein bis drei Tagen, Wiederholung vierwöchentlich	fünf bzw. zehn Plasmaaustausche über zwei bzw. vier Wochen

inhaltslich übernommen aus der DGN Leitlinie „Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden“ (Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018)

Meist werden bei CIDP-PatientInnen primär IVIG oder Glukokortikosteroide verabreicht, wobei die Entscheidung für eine der beiden Therapien individuell getroffen wird. IVIG ist im Vergleich zu Glukokortikosteroiden zwar schneller und etwas häufiger effektiv (Nobile-Orazio et al., 2012; Nobile-Orazio et al., 2017). Allerdings haben Glukokortikosteroide einen länger anhaltenden Effekt, wenn sie wirksam sind (Nobile-Orazio et al., 2012). IVIG sind für PatientInnen oft besser verträglich, sind jedoch mit

hohen Kosten verbunden (Nobile-Orazio et al., 2017). In der Erhaltungstherapie hat sich auch die Wirksamkeit von subkutanen Immunglobulinen gezeigt, die die PatientInnen sich selbst verabreichen können (Markvardsen et al., 2013; Van Schaik et al., 2018). Plasmapherese wird vor allem bei akuter Verschlechterung oder bei therapierefraktären CIDP-PatientInnen eingesetzt, da Plasmapherese zwar eine kurzfristige effektive Besserung bewirkt, durch die Invasivität aber auch mit einer höheren Nebenwirkungsrate einhergeht (Nobile-Orazio et al., 2017; Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018). Bei sehr schwer betroffenen therapierefraktären CIDP-PatientInnen wird trotz möglicher stärkerer Nebenwirkungen der Versuch einer Cyclophosphamid-Pulstherapie mit 0,6–1 g pro Quadratmeter Körperoberfläche in vierwöchigen Intervallen über eine Gesamtdauer von 6 Monaten empfohlen (Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018). Weitere immunsuppressive Medikamente wie Azathioprin oder Methotrexat werden vereinzelt eingesetzt, bislang konnte allerdings kein signifikanter Benefit nachgewiesen werden (Mahdi-Rogers et al., 2017; Oaklander et al., 2017). Rituximab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD-20, wird experimentell bei Therapierefraktärität eingesetzt und zeigte in einer Zusammenstellung von Fallberichten bei 17 von 22 CIDP-PatientInnen einen Benefit (Mahdi-Rogers et al., 2017). Insbesondere bei PatientInnen mit dem Nachweis paranodaler IgG4-Autoantikörper zeigte sich in Fallberichten ein sehr gutes Ansprechen auf Rituximab (Cortese et al., 2020; Doppler et al., 2015b; Querol et al., 2015). Die autologe Stammzelltransplantation bleibt als „Hochrisikoverfahren“ sehr schwer betroffenen CIDP-PatientInnen vorbehalten (Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018). In einer Studie wurde bei 60 CIDP-PatientInnen eine autologe Stammzelltransplantation durchgeführt, wobei sich sowohl das eigenständige Gehen und die Kraft als auch die elektrophysiologischen Werte der PatientInnen signifikant verbesserten, 80 % der PatientInnen nach einem Jahr ohne immunmodulierende Therapie waren und keine Therapie-assoziierten Todesfälle registriert wurden (Burt et al., 2020).

In Tabelle 6 und Tabelle 7 wird ein Überblick über Wirkmechanismen sowie Nebenwirkungen der bei GBS- und CIDP-PatientInnen am häufigsten verwendeten immunmodulatorischen Therapien gegeben.

Tabelle 6: Antiinflammatorische Wirkmechanismen von IVIG, Glukokortikosteroiden und Plasmapherese

Antiinflammatorische Wirkmechanismen		
IVIG	Glukokortikosteroide	Plasmapherese
-Bindung und Neutralisierung von Autoantikörpern -Inhibierung von aktiviertem Komplement -Unterdrückung von Zytokinen, Chemokinen und Metalloproteinasen -Absättigung von Fc Rezeptoren auf endoneuralen Makrophagen -T-Zell-Regulation (Dalakas, 2002; Jacob & Rajabally, 2009; Lehmann & Hartung, 2011)	-Unterdrückung der Transkription proinflammatorischer Gene (z.B proinflammatorische Zytokine und Chemokine) -Aktivierung der Transkription antiinflammatorischer Gene -Herabsetzung der Stabilität proinflammatorischer mRNA -Veränderung der T-Zellregulation und der Leukozytendifferenzierung (Barnes, 2017; Coutinho & Chapman, 2011)	-Entfernung des Patientenplasmas und Ersatz durch Spendeplasma/Plasmaersatz -dadurch Entfernung von Autoantikörpern, Immunkomplexen, Zytokinen und inflammatorischen Faktoren (Kieseier et al., 2018; Lehmann & Hartung, 2011)

Tabelle 7: Nebenwirkungen von IVIG, Glukokortikosteroiden und Plasmapherese

Bedeutende und am häufigsten auftretende Nebenwirkungen		
IVIG	Glukokortikosteroide	Plasmapherese
-grippeähnliche Symptome -Kopfschmerzen -Fieber -Hautreaktionen -aseptische Meningitis -leicht erhöhtes Risiko für thrombembolische Ereignisse -Anaphylaxie (sehr selten) (Dalakas, 2002; Nobile-Orazio et al., 2017; Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018)	-Hyperglykämie -Hypertension -gastrointestinale Blutung -Osteoporose -Glaukom -Gewichtszunahme -Depression (Coutinho & Chapman, 2011; Nobile-Orazio et al., 2017)	-Elektrolytstörungen (insbesondere Hypokalzämie sowie metabolische Alkalose und sich daraus ergebende Parästhesien und Muskelkrämpfe) -Kardiovaskuläre Komplikationen -Komplikationen des invasiven Zugangs (Thrombose, Infektion) -Anaphylaxie (insbesondere Reaktion gegen Albumin) (Kieseier et al., 2018; Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018)

Neben der immunmodulatorischen Therapie erfolgt auch eine supportive Therapie beispielsweise durch Schmerztherapie, eine physiotherapeutische Beübung und gegebenenfalls eine rehabilitative Behandlung der GBS- und CIDP-PatientInnen (Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018).

1.2 Ranvierscher Schnürring

In den vergangenen Jahren zeigte sich, dass der Ranviersche Schnürring einen bedeutsamen Angriffspunkt für Autoantikörper bei Immunneuropathien darstellt, weshalb hier der Aufbau des Ranvierschen Schnürringes erläutert wird.

Nervenfasern mit einem Durchmesser über 1 μm sind myelinisiert. Im peripheren Nervensystem sind die Axone hierbei durch Schwannzellen und im zentralen Nervensystem durch Oligodendrozyten umhüllt. Periodisch kommt es durch die Ranvierschen Schnürringe zu einer Unterbrechung des Myelins (Poliak & Peles, 2003; Salzer, 2003). Die Ranvierschen Schnürringe sind etwa 1-2 μm breit und die dazwischenliegenden Myelinsegmente, die als Internodien bezeichnet werden, sind meist das 100-fache des Durchmessers des Axons und damit bis zu 2 mm lang (Müller & Zeller, 2018; Salzer, 2003). Der Ranviersche Schnürring selbst zeigt einen nodalen, einen paranodalen und einen juxtapanodalen Bereich (Poliak & Peles, 2003; Rasband, 2011; Salzer, 2003), was in folgender Abbildung 1 dargestellt ist.

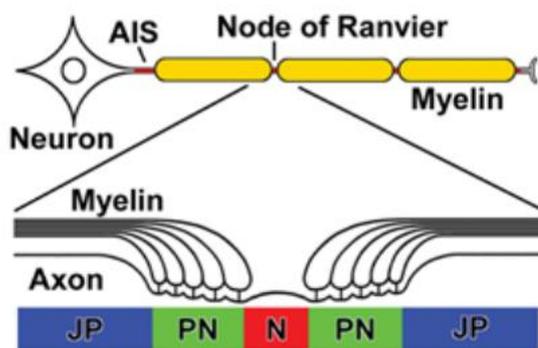


Abbildung 1: Ranvierscher Schnürring mit nodalem, paranodalem und juxtapanodalem Bereich, übernommen aus Susuki, 2013: „Node of Ranvier disruption as a cause of neurological diseases“

Dankenswerterweise von Susuki über eine Creative Common Liscence zur Verfügung gestellt (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>, zuletzt aufgerufen am 04.01.2020) und unverändert übernommen.

Node of Ranvier = Ranvierscher Schnürring, AIS = axonales Initialsegment, N = nodaler Bereich, PN = paranodaler Bereich, JP = juxtapanodaler Bereich

Der nodale Bereich ist durch eine sehr hohe Konzentration an spannungsabhängigen Natriumkanälen mit einer Dichte von bis zu 1.200 Natriumkanälen pro μm^2 gekennzeichnet, während im internodalen Bereich weniger als 25 Natriumkanäle pro μm^2 vorkommen (Müller & Zeller, 2018; Poliak & Peles, 2003; Uncini & Kuwabara, 2015;

Waxman & Ritchie, 1993). Die große Anzahl an spannungsabhängigen Natriumkanälen im nodalen Bereich und der hohe Widerstand der Myelinscheide ermöglichen eine saltatorische Erregungsweiterleitung, was bedeutet, dass das elektrische Nervensignal nicht kontinuierlich weitergeleitet wird, sondern von einem Ranvierschen Schnürring zum nächsten Ranvierschen Schnürring springt (Salzer, 2003). Dies führt im Vergleich zur kontinuierlichen Leitung des Nervensignals zu einer vielfach höheren Nervenleitgeschwindigkeit (Salzer, 2003). Das initiale Nervenaktionspotential wird im Initialsegment generiert, welches in seinem Aufbau stark dem der Ranvierschen Schnürringe ähnelt (Rasband, 2010). Die saltatorische Erregungsweiterleitung wird durch eine komplexe Architektur der Ranvierschen Schnürringe sichergestellt, welche in Abbildung 2 sichtbar ist und im Folgenden erläutert wird.

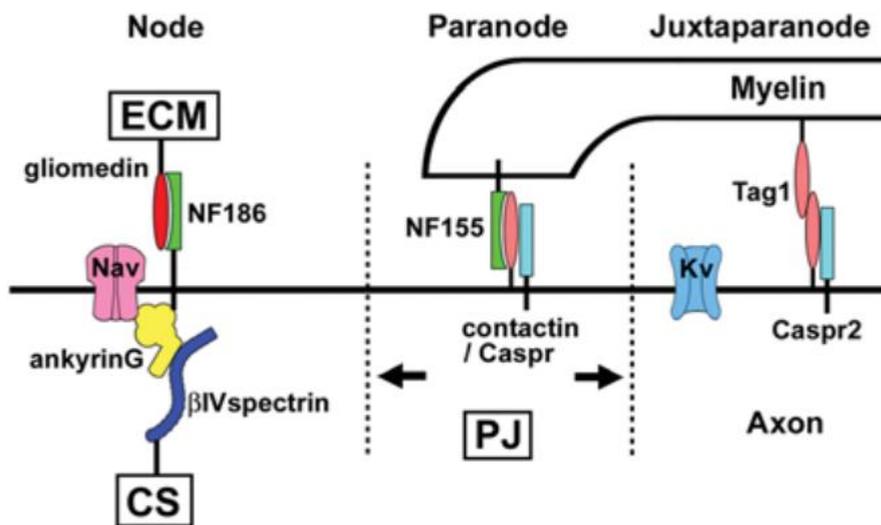


Abbildung 2: Proteine des Ranvierschen Schnürrings, übernommen aus Susuki, 2013: „Node of Ranvier disruption as a cause of neurological diseases“

Dankenswerterweise von Susuki über eine Creative Common Liscence zur Verfügung gestellt (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>, zuletzt aufgerufen am 04.01.2020) und unverändert übernommen.

Nav = spannungsabhängiger Natriumkanal, Kv = spannungsabhängiger Kaliumkanal, ECM = extrazelluläre Matrix, CS = Zytoskelett, PJ = paranodale Junction

Im nodalen Bereich steht das Axon in direktem Kontakt mit dem Extrazellulärraum. Hier ist das Zelladhäsionsmolekül Neurofascin-186, das transmembranär am Axon exprimiert ist, für die Verankerung der Natriumkanäle verantwortlich. Neurofascin-186 bindet an der Membraninnenseite an Ankyrin G, welches wiederum über eine Interaktion mit β IV-Spektrin für eine Bindung an das Cytoskelett sorgt (Berghs et al., 2000; Stathopoulos et

al., 2015; Vural et al., 2018). Extrazellulär interagiert Neurofascin-186 im zentralen Nervensystem mit Matrixproteinen wie Brevican und Versican V2 (Rasband & Peles, 2016; Vural et al., 2018). Im peripheren Nervensystem wird der Extrazellulärraum mit Mikrovilli der Schwann-Zellen ausgefüllt und Neurofascin-186 bindet an NrCAM (Neuronales Zelladhäsionsmolekül) auf der Oberfläche der Schwannzellen und an von den Schwannzellen sezerniertes Gliomedin (Eshed et al., 2005; Susuki, 2013; Vural et al., 2018).

Im paranodalen Bereich bildet die Myelinmembran Zytoplasma gefüllte gliale Schleifen, die sich helikal um das Axon winden (Poliak & Peles, 2003). Ein aus Contactin-1, Contactin-associated-Protein-1 (CASPR-1) und Neurofascin-155 bestehender Komplex bildet als enge Verbindung zwischen Myelinschleifen und Axon sogenannte „Septate like junctions“, wobei sich der Begriff von den Septate junctions bei Interzellulärkontakten von *Drosophila* ableitet, die dort essentiell für die Bluthirnschranke sind (Poliak & Peles, 2003; Stathopoulos et al., 2015). Auf Grund ihrem Erscheinungsbild unter dem Elektronenmikroskop werden die „Septate like junctions“ auch als transversale Banden bezeichnet (Vural et al., 2018). Die beiden axonalen Proteine CASPR-1 und Contactin-1 binden über einen lateralen cis-Komplex aneinander, wobei Contactin-1 wiederum über eine trans-Bindung mit Neurofascin-155 verbunden ist (Peles, 1997; Volkmer et al., 1998). Die Verbindung ist hierbei so eng, dass die verbleibende Lücke lediglich 3 nm beträgt und so die laterale Diffusion von axonalen Membranproteinen verhindert wird (Rasband & Peles, 2016). Der paranodale Komplex bildet dadurch eine Grenze zwischen nodalem und juxtapanodalem Bereich und stellt durch die Trennung von Natrium- und Kaliumkanälen auch eine elektrische Barriere dar (Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013). Im Mausmodell zeigt sich für den Knockout für jedes der drei Proteine Contactin-1, CASPR-1 und Neurofascin-155 eine Zerstörung der paranodalen Architektur und eine deutliche Verminderung der peripheren Nervenleitgeschwindigkeit (Bhat et al., 2001; Boyle et al., 2001; Sherman et al., 2005). Dies zeigt die essentielle Bedeutung der paranodalen Proteine für die Ermöglichung der saltatorischen Erregungsweiterleitung. Auch die im Bereich der Ranvierschen Schnürringe in hoher Konzentration vorkommenden Ganglioside, die als Glykosphingolipide in der Zellmembran lokalisiert sind, haben eine wichtige Funktion für die Stabilisierung der axo-glialen Interaktion (Sheikh et al., 1999; Susuki et al., 2007a). Mäuse mit einem Knockout der Ganglioside GM1 und GD1a zeigen

eine veränderte Aggregation paranodaler Proteine sowie Demyelinisierung peripherer Nerven und axonale Degeneration (Susuki et al., 2007a).

Im juxtaparanodalen Bereich kommen in hoher Konzentration spannungsabhängige Kaliumkanäle vor, deren Funktion es ist die eintretende Erregung zu dämpfen sowie das internodale Ruhepotential wiederherzustellen und zu erhalten (Poliak et al., 2003). Die Kaliumkanäle sind mit CASPR-2 und TAG-1 (Transiently-expressed-axonal-Glykoprotein-1), welches wiederum an Contactin-2 bindet, assoziiert, wobei der Komplex für die Gruppierung von Kaliumkanälen im juxtaparanodalen Bereich essentiell ist (Poliak et al., 2003).

Auf die Proteine Contactin-1 sowie die verschiedenen Neurofascin-Isoformen wird im Folgenden noch weitergehend eingegangen, da in dieser Promotion Antikörper gegen diese Proteine des Ranvierschen Schnürringes untersucht wurden.

1.2.1 Contactin-1

Contactin-1 ist ein 130 kDa schweres, über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker an der Zellmembran fixiertes Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, das sowohl auf Neuronen als auch auf Oligodendrozyten, nicht aber auf Schwann-Zellen exprimiert wird (Einheber et al., 1997; Ranscht, 1988). Contactin-1 besteht aus sechs Immunglobulin-Domänen (Ig-Domäne) sowie vier Fibronectin-Domänen (Fn-Domänen) III und verfügt über eine Vielzahl an Glykosylierungsstellen (Poliak & Peles, 2003; Reid et al., 1994). Über die Ig-Domäne wird die Interaktion mit CASPR-1 und Neurofascin-155 vermittelt, die für die Ausbildung des paranodalen Komplexes essentiell ist (Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013). Contactin-1 ist außerdem für den Transport von CASPR-1 an die Membranoberfläche verantwortlich, da im Zellkulturmodell nur bei Kotransfektion der Zellen mit Contactin-1 und CASPR-1 ein effektiver Transport von CASPR-1 an die Zellmembran erfolgt (Boyle et al., 2001; Faivre-Sarrailh et al., 2000).

1.2.2 Neurofascin-155, -186 und -140

Neurofascin ist ein Zelladhäsionsmolekül der L1-Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie, wobei das Neurofascin-Gen dem Mechanismus des alternativen Splicing unterliegt (Hassel et al., 1997; Volkmer et al., 1992). Die Produkte sind das gliale Neurofascin-155, das axonale Neurofascin-186 sowie das vor allem in der embryonalen

Entwicklungsphase stark exprimierte Neurofascin-140, wobei die Zahl hinter der jeweiligen Isoform das Molekulargewicht in kDa angibt (Davis & Bennett, 1993; Tait et al., 2000; Zhang et al., 2015). Die drei Neurofascin-Isoformen bestehen jeweils aus den gleichen sechs Ig-Domänen und unterscheiden sich durch unterschiedliche Fn-Domänen, wobei die Fn3-Domäne nur in Neurofascin-155 und die Fn5- sowie die Mucin-Domäne nur in Neurofascin-186 vorkommen. Alle Domänen von Neurofascin-140 sind auch in den anderen beiden Isoformen Neurofascin-155 und -186 enthalten (siehe Abbildung 3).

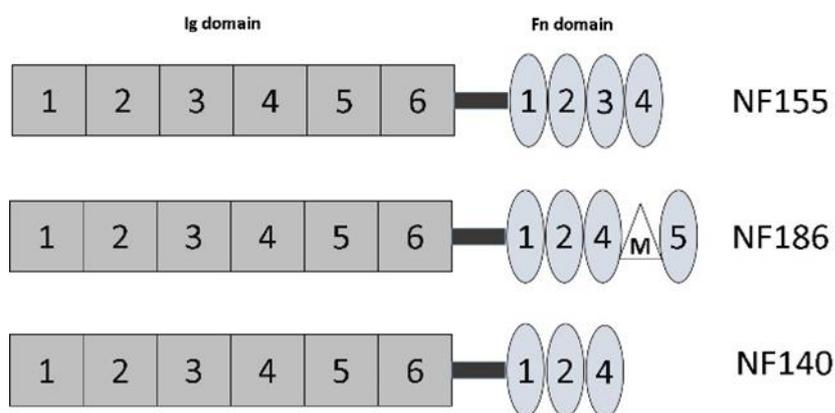


Abbildung 3: Aufbau der Neurofascin-Isoformen

Ig = Immunglobulin, Fn = Fibronektin, M = Mucin. Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. und PD. Dr. Kathrin Doppler. Die Abbildung wurde von PD. Dr. Kathrin Doppler erstellt und in modifizierter Form in dem Paper „Anti-pan-neurofascin IgG3 as a marker of fulminant autoimmune neuropathy“ veröffentlicht (Stengel et al., 2019).

Neurofascin-186 findet sich sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem an Neuronen des Hippocampus und den Purkinjezellen, wobei es am Axon im nodalen Bereich sowie am axonalen Initialsegment lokalisiert ist (Tait et al., 2000). Mäuse mit Neurofascin-186-Knockout zeigen eine Auflösung der Architektur des nodalen Bereiches mit Verlust der spannungsabhängigen Natriumkanäle (Thaxton et al., 2011).

Neurofascin-155 findet sich im zentralen Nervensystem auf Oligodendrozyten, dem Corpus Callosum sowie der weißen Substanz des Cerebellums und im peripheren Nervensystem wird es von den Schwannzellen exprimiert, wobei es im paranodalen Bereich sowie an den Schmidt-Lantermann-Einkerbungen lokalisiert ist (Tait et al., 2000). Neurofascin-155 bildet den glialen Teil des paranodalen Komplexes und interagiert über die Ig-Domänen 5 und 6 mit Contactin-1 (Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013; Thaxton et al., 2010). Mäuse mit einem Neurofascin-155-Knockout zeigen schwere

Paresen, Ataxie sowie keine Ausbildung paranodaler Junctions mit einer dramatischen Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit und einer Degeneration myelinisierter Axone (Pillai et al., 2009). Außerdem zeigte sich auch bei der Ausschaltung von Neurofascin-155 in adulter myelinisierter Glia eine unorganisierte paranodale Architektur (Pillai et al., 2009).

Neurofascin-140 wird vor allem während der embryonalen Entwicklung neuronal exprimiert (Davis & Bennett, 1993). Bisher fand die Funktion von Neurofascin-140 nur wenig Beachtung in der Literatur, weshalb alle hier nun folgende Punkte aus einem Paper von Zhang stammen (Zhang et al., 2015). Genau wie Neurofascin-186 ist Neurofascin-140 im nodalen Bereich und am axonalen Initialsegment lokalisiert. Während der Ausbildung der Ranvierschen Schnürringe nimmt die Expression von Neurofascin-140 ab. Es finden sich jedoch Hinweise, dass Neurofascin-140 nach der Embryonalphase in der Lage ist die Funktion der anderen beiden Isoformen Neurofascin-186 und Neurofascin-155 zu ersetzen. So wird Neurofascin-140 in Läsionen der weißen Substanz von PatientInnen mit Multipler Sklerose reexprimiert, während es sich in der weißen Substanz gesunder Kontrollpersonen nur in sehr niedriger Konzentration findet. In Mäusen, die weder Neurofascin-155 noch Neurofascin-186 exprimierten, konnte durch die Expression von Neurofascin-140 die Architektur des nodalen Bereiches normal ausgebildet werden und auch die Nervenleitgeschwindigkeit verbesserte sich bei diesen Mäusen durch die Expression von Neurofascin-140.

1.3 Immunglobuline

Die Immunglobuline (Ig) IgA, IgD, IgE, IgG und IgM sind von Plasmazellen produzierte Proteine, die an Antigene binden können. Die Monomere der Immunglobuline besitzen ein Y-förmiges Grundgerüst, das aus zwei schweren und zwei leichten Ketten mit jeweils einer konstanten und einer variablen Region bestehen, die über eine Disulfidbrücke verbunden werden (Hmiel et al., 2015; Schroeder & Cavacini, 2010). Mittels Papain können die Immunglobuline in das Antigen bindende Fab-Fragment, das variable antigenspezifische sowie konstante Regionen enthält, und in das Fc-Fragment, das vom konstanten Teil der schweren Kette gebildet wird, aufgespalten werden (Schroeder & Cavacini, 2010).

1.3.1 Vergleich IgG und IgM

Da im Rahmen des Promotionsprojektes gegen Neurofascin gerichtete IgG-Autoantikörper verschiedener Subklassen und auch IgM-Autoantikörper detektiert wurden, wird hier kurz auf Besonderheiten von verschiedenen IgG Subklassen sowie von IgM eingegangen. Während IgG meist als Monomer vorkommt, bildet IgM meist Pentamere, wobei fünf Momomere durch eine J-Kette verbunden werden (Mader et al., 2013; Niles et al., 1995). In deutlich geringerem Ausmaß kommen IgM auch als Monomere oder Hexamere vor (Mader et al., 2013). Der schematische Aufbau eines IgG-Monomeres und eines IgM-Pentameres wird in Abbildung 4 dargestellt.

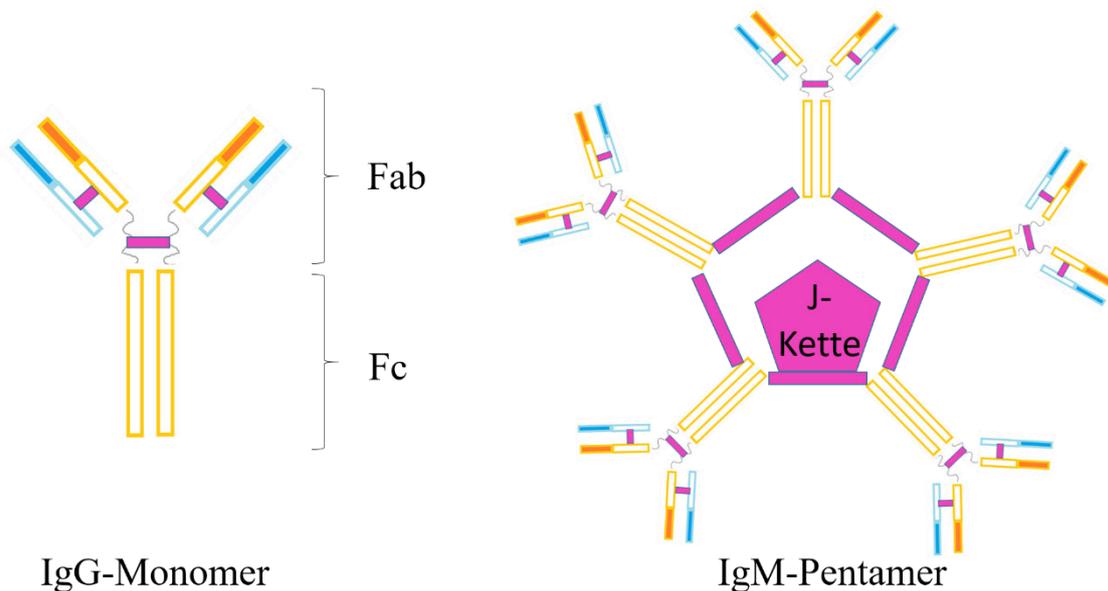


Abbildung 4: Schematischer Aufbau IgG-Monomer und IgM-Pentamer

Die schweren Ketten sind orange und die leichten Ketten blau dargestellt. Die variable Region ist mit Farbe ausgefüllt, während die konstanten Regionen ohne Füllung dargestellt sind. Disulfidbrücken werden durch pink gefüllte Rechtecke dargestellt. Die J-Kette wird durch ein pinkes Fünfeck dargestellt.

IgM spielt eine wichtige Rolle in der primären und der adaptiven humoralen Immunantwort (Mader et al., 2013). IgM-Antikörper sind im Vergleich zu IgG zwar weniger spezifisch und zeigen den Antigenen gegenüber eine geringere Affinität, aber durch die pentamere Struktur mit dem Vorhandensein von insgesamt 10 Bindungsstellen weisen sie eine hohe Bindungsstärke auf (Mader et al., 2013; Sathe & Cusick, 2020). Außerdem zeigt IgM eine ausgeprägte Komplementaktivierungsaktivität. C1q muss im Rahmen der Komplementaktivierung zwei Fc-Regionen binden und, da IgM als Pentamer

sogar über fünf Fc-Regionen verfügt, wird eine schnelle Komplementaktivierung ermöglicht (Racine & Winslow, 2009; Sathe & Cusick, 2020). IgG-Antikörper zeigen eine hohe Antigen-Affinität und werden bei Infektionen durch einen Klassenswitch von IgM zu IgG gebildet (Murphy & Weaver, 2018, Seiten: 226 ff., 554 ff.). IgG kann in vier Subklassen eingeteilt, die nach absteigender Häufigkeit nummeriert werden (Aalberse et al., 2009). Auch wenn die vier Subklassen in 90 % ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen, unterscheiden sie sich in ihren Eigenschaften teilweise deutlich (Vidarsson et al., 2014). In folgender Tabelle 8 werden einige Eigenschaften von IgM und den vier IgG-Subklassen vergleichend gegenübergestellt.

Tabelle 8: Eigenschaften von IgM und den verschiedenen IgG-Subklassen

	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Struktur	Meist Pentamer	Monomer			
Anteil an Gesamtserum-immunoglobulinen	10 %	75 %			
		67 % des Gesamt-IgG	22 % des Gesamt-IgG	7 % des Gesamt-IgG	4 % des Gesamt-IgG
Molekulargewicht in kDa	950 (Pentamer)	146	146	170	146
Halbwertszeit in Tagen	5-10	21	21	7	21
Komplementaktivierung	++++	++	+	+++	/

(Mader et al., 2013; Schroeder & Cavacini, 2010; Vidarsson et al., 2014)

1.3.2 Besonderheiten und Pathomechanismus von IgG4

Da bei den Autoantikörpern gegen paranodale Proteine bisher überwiegend die Subklasse IgG4 beschrieben wurde, wird hier näher auf die Besonderheiten dieser Subklasse eingegangen. IgG4 wird häufig nach wiederholter oder lang anhaltender Antigenexposition gebildet (Vidarsson et al., 2014). Grundsätzlich gilt IgG4 als wenig pathogen und bei Allergien zeigt es sogar die Entwicklung von Toleranz an (Aalberse et al., 2009; Koneczny, 2018; Lighaam & Rispens, 2016). IgG4 liegt überwiegend als bispezifischer Antikörper vor, da eine große stereometrische Flexibilität die Dissoziation in zwei Halbmoleküle mit jeweils einer schweren und einer leichten Kette erlaubt, sodass es zum Fab-Arm Austausch kommen kann (Koneczny, 2020). Deshalb kann IgG4 keine

Endozytose über Crosslinkung vermitteln, da die hierfür benötigte bivalente Bindung durch das monovalente IgG4 nicht möglich ist (Koneczny, 2020). Außerdem kann durch IgG4 das Komplementsystem nicht aktiviert werden (Bindon et al., 1988; Schumaker et al., 1976; Tao et al., 1993; Vidarsson et al., 2014). Dennoch konnte bereits bei einigen Erkrankungen wie bei der Myasthenia gravis mit Autoantikörpern gegen die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) oder dem Pemphigus vulgaris mit Desmoglein-3-Autoantikörpern die pathogene Wirkung durch IgG4 nachgewiesen werden (Koneczny, 2020). Auch die Immunneuropathien mit paranodalen IgG4-Autoantikörpern gegen Contactin-1 oder Neurofascin-155 zählen zu den von Koneczny klassifizierten „Klasse 1 Erkrankungen“ mit nachgewiesener Pathogenität durch IgG4 (Koneczny, 2020). Als Pathomechanismus der IgG4 vermittelten Erkrankungen wird ein blockierender Effekt auf Protein-Protein-Interaktionen angenommen und sowohl für Contactin-1- als auch für CASPR-1-IgG4-Patientenantikörper konnte in Zellaggregationsassays an transfizierten Zellen gezeigt werden, dass die Interaktion des Contactin-1-/CASPR-1-Komplexes mit Neurofascin-155 durch IgG4 vermindert wird (Cortese et al., 2020; Koneczny, 2020; Labasque et al., 2014). Eine weitere klinisch relevante Eigenschaft ist, dass die Titer von IgG4 unter Rituximabtherapie sehr stark abfallen (Diaz-Manera et al., 2012). Auch PatientInnen mit paranodalen IgG4-Autoantikörpern zeigen unter Rituximabtherapie eine deutliche Besserung (Querol et al., 2015).

1.4 (Para-)nodopathie als neue Krankheitsentität

Traditionell werden Polyneuropathien in axonal und demyelinisierend eingeteilt. Bei axonalen Formen des GBS mit Gangliosid-Autoantikörpern zeigen sich allerdings häufig innerhalb von wenigen Tagen reversible Leitungsblöcke (Kuwabara et al., 1998), wobei die schnelle Reversibilität weder mit einer Remyelinisierung noch mit einer axonalen Regeneration zu erklären ist (Uncini et al., 2013). Sowohl in histopathologischen Studien als auch im Tiermodell konnte eine komplementabhängige Zerstörung der Architektur des Ranvierschen Schnürringes mit Ablösung der paranodalen Myelinschleifen und Aufweitung der nodalen Region nachgewiesen werden (Griffin et al., 1996; Susuki et al., 2007b; Susuki et al., 2012). Auch die als Störung der Fortleitung eines Aktionspotentials definierten Leitungsblöcke, die zuvor meist als typisches Zeichen einer Demyelinisierung angesehen wurden, können durch eine Beeinträchtigung des erregbaren Axolemmes der

nodalen Region hervorgerufen werden (Uncini & Kuwabara, 2015). So wurde die dichotome Einteilung der Polyneuropathien um die Kategorie der (Para-)nodopathien ergänzt (Uncini et al., 2013). Schnell wurde dieser Begriff auch auf weitere Ätiologien, die zu einer Schädigung des Ranvierschen Schnürringes führen, ausgeweitet (Uncini & Kuwabara, 2015). Uncini legte sechs Kriterien fest, die eine (Para-)nodopathie definieren, welche hier übersetzt dargestellt werden (Uncini & Kuwabara, 2015):

1. Verschiedene Ätiologien führen letztendlich zum gemeinsamen Pathomechanismus mit Beeinträchtigung/Zerstörung des erregbaren Axolemm der nodalen Region.
2. Es zeigt sich ein pathophysiologisches Kontinuum vom vorübergehenden Leitungsblock bis zur axonalen Degeneration.
3. Der Leitungsblock wird durch Ablösung des paranodalen Myelins und Aufweitung des nodalen Bereichs, Dysfunktion oder Zerstörung der Natriumkanäle, beeinträchtigte Homöostase von Wasser und Ionen sowie abnormale segmentale Polarisation des Axolemm hervorgerufen.
4. Die Leitungsblöcke können schnell reversibel sein, ohne dabei eine temporale Dispersion als Zeichen der De- und Remyelinisierung auszubilden, oder können persistieren.
5. Je nach spezifischer Erkrankung und Schwere folgt auf den Leitungsblock eventuell axonale Degeneration.
6. In der klinischen Praxis kann die elektrophysiologische Diagnose durch mehrere Messungen gestellt werden, die während der akuten Erkrankung einen schnell reversiblen Leitungsblock oder eine Leitungsverlangsamung ohne Ausbildung von temporaler Dispersion oder ein Fortschreiten vom Leitungsblock bis zur axonalen Degeneration zeigen kann. Bei der chronischen Erkrankung können andauernder Leitungsblock und Zeichen der axonalen Degeneration gemeinsam auftreten.

In einer Vielzahl an Studien fanden sich in den vergangenen Jahren Autoantikörper gegen die (para-)nodalen Proteine Neurofascin-155, Contactin-1, CASPR-1 und Neurofascin-186. Uncini und Vallat postulierten daraufhin, dass diese PatientInnen zwar überwiegend als CIDP-PatientInnen klassifiziert würden, aber besser in die Kategorie der (Para-)nodopathien passen würden, da der Pathomechanismus auf den Ranvierschen

Schnürring fokussiert ist und sich deutlich von dem Pathomechanismus der CIDP mit inflammatorisch bedingter De- und Remyelinisierung unterscheidet (Uncini & Vallat, 2018). Im folgenden Kapitel soll dies im Hinblick auf die bisherigen Erkenntnisse zur pathogenen Wirkung paranodaler Autoantikörper näher dargestellt werden.

1.4.1 Elektrophysiologische, histopathologische und experimentelle Zeichen der Schädigung Ranvierscher Schnürringe durch paranodale Autoantikörper

In den elektrophysiologischen Studien zeigen sich bei PatientInnen mit paranodalen Autoantikörpern demyelinisierende Zeichen mit verminderten Nervenleitgeschwindigkeiten, verlängerten distal motorische Latenzen sowie F-Wellen, Latenzen, Leitungsblöcken, aber auch verminderte Amplituden und Spontanaktivität in der Elektromyographie (Devaux et al., 2016; Doppler et al., 2015b; Ogata et al., 2015; Querol et al., 2014; Querol et al., 2013; Tang et al., 2020). Insgesamt ergibt sich ein scheinbar demyelinisierendes Bild, sodass die elektrophysiologischen Diagnosekriterien der CIDP bei PatientInnen mit paranodalen Autoantikörpern zumeist erfüllt sind (Tang et al., 2020; Uncini & Vallat, 2018).

Allerdings findet sich in den Suralisbiopsien von PatientInnen mit paranodalen Autoantikörpern eine axonale Schädigung, wobei die typischen Kennzeichen der CIDP wie De- bzw. Remyelinisierung in Form von dünn bemarkten Fasern oder Zwiebelschalenformationen fehlen (Devaux et al., 2016; Doppler et al., 2016; Doppler et al., 2015b). Außerdem zeigten sich bei PatientInnen mit paranodalen Autoantikörpern sowohl in Suralisbiopsien als auch in myelinisierten Fasern von Hautbiopsien verlängerte Ranviersche Schnürringe mit einer Dispersion paranodaler Proteine (Doppler et al., 2016; Doppler et al., 2015b). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen von PatientInnen mit paranodalen Autoantikörpern finden sich eine Ablösung der terminalen Myelinschleifen mit einer abnormalen Aufweitung des Raumes zwischen Axon und Myelin sowie verbreiterte nodale Bereiche (Koike et al., 2017; Vallat et al., 2017).

Diese Diskrepanz zwischen scheinbar demyelinisierender Elektrophysiologie und axonaler Histopathologie kann durch eine Beeinträchtigung der Funktion des Ranvierschen Schnürringes aufgelöst werden, da die Autoantikörper zu einer

Beeinträchtigung des paranodalen Komplexes mit folgender Ablösung des paranodalen Myelins, Aufweitung der nodalen Region und damit Störung der saltatorischen Erregungsleitung zu einer Leitungsverlangsamung führen, die nicht durch Demyelinisierung sondern durch eine Störung der Architektur des Ranvierschen Schnürringes zu erklären ist (Uncini & Vallat, 2018).

Auch experimentell konnte die Beeinträchtigung Ranvierscher Schnürringe durch paranodale IgG-Patientenantikörper bereits nachgewiesen werden. Durch Passiv-Transfer-Experimente von Contactin-IgG4-Patientenantikörper in mit P2 Peptid immunisierten Ratten kam es zum Verschwinden des Komplexes aus Contactin-1, CASPR-1 und Neurofascin-155 im paranodalen Bereich, wobei der nodale Bereich verlängert war (Manso et al., 2016). Und auch in myelinisierten Spinalganglien-Kulturen, die mit Contactin-1-IgG4-Patientenantikörpern inkubiert wurden, war CASPR-1 im paranodalen Bereich vermindert nachweisbar und der nodale Bereich signifikant verlängert (Labasque et al., 2014). In einer weiteren Studie mit Contactin-IgG-Patientenantikörpern zeigte sich in Serum, das überwiegend die Subklasse IgG3 enthielt, im Vergleich zu IgG4 ein stärker ausgeprägter Effekt, wobei in Passiv-Transfer-Experimenten mit IgG3 reversible Leitungsblöcke und eine paranodale Komplementablagerung nachgewiesen werden konnten (Doppler et al., 2019). Die Ergebnisse der Passiv-Transfer-Experimente mit Neurofascin-155-IgG4-Patientenantikörpern unterschieden sich von denen mit Contactin-1-Patientenantikörpern, da bei adulten Tieren die nodale Architektur nicht beeinträchtigt und lediglich Neurofascin-155 vermindert nachweisbar war (Manso et al., 2019). In neonatalen Tieren verhinderten Neurofascin-155-IgG4-Patientenantikörper allerdings die Ausbildung des paranodalen Komplexes (Manso et al., 2019).

1.4.2 Studienlage zur Identifikation (para-)nodaler Autoantikörper sowie charakteristische klinische Phänotypen

Die Erstbeschreibung von Neurofascin-Autoantikörpern erfolgte 2007 durch Mathey bei Multiple-Sklerose-PatientInnen und 2012 durch Ng bei CIDP- und GBS-PatientInnen (Mathey et al., 2007; Ng et al., 2012). Bei den Immuneuropathien gibt es mittlerweile eine Vielzahl an Studien zum Nachweis (para-)nodaler Autoantikörper und es zeigen sich bei etwa 10 % der CIDP-PatientInnen und wenigen GBS-PatientInnen (para-)nodale

Autoantikörper, die überwiegend der Subklasse IgG4 angehören (Vural et al., 2018). Hier soll ein kurzer tabellarischer Überblick über die Studienlage bei GBS- und CIDP-PatientInnen zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Contactin-1 in Tabelle 9, gegen CASPR-1 in Tabelle 10 und gegen die verschiedenen Neurofascin-Isoformen in Tabelle 11 gegeben werden. Anschließend wird der sich in den Studien herauskristallisierte charakteristische klinische Phänotyp dargestellt.

Tabelle 9: Studien mit Nachweis von Contactin-1-IgG-Autoantikörpern

Studie zu Contactin-1-Autoantikörpern	CIDP-PatientInnen	Dominierende IgG-Subklasse(n)	GBS-PatientInnen	Dominierende IgG-Subklasse(n)
Querol et al., 2013	3/46	IgG4 (3x)	0/48	/
Miura et al., 2015	13/533	IgG4 (13x)	0/200	/
Doppler et al., 2015b	4/53	IgG4 (2x) IgG3 (2x)	0/51	/
Mathey et al., 2017	3/44	IgG4 (3x)	/	/
Delmont et al., 2017	2/246	keine Angabe	0/26	/
Koike et al., 2017	1/131	IgG4 (1x)	/	/
Cortese et al., 2020	3/342	IgG4 (2x) IgG3/IgG4 (1x)	/	/
Appeltshauser et al., 2020	2/23 (1x kombiniert mit CASPR-1-IgG)	IgG2/IgG4 (1x) IgG3 (1x) (ebenfalls CASPR-1-IgG2/3-Autoantikörper)	1/114	IgG2 (1x)
Delmont et al., 2020	10/1500	IgG4 (10x) mit IgM (2x)		

Die Angaben wurden größtenteils aus Vural et al., 2018 übernommen und mit eigener Recherche ergänzt.

PatientInnen mit Nachweis von Contactin-1-IgG4-Autoantikörpern zeigen als charakteristischen Phänotyp einen (sub)akuten Beginn mit schwerer Symptomatik, motorisch betonte Symptome, teilweise einen Tremor, eine frühe axonale Schädigung, ein schlechtes Ansprechen auf IVIG-Therapie und im Vergleich zu CIDP-PatientInnen ohne Autoantikörpernachweis ein höheres Lebensalter bei Beginn der Erkrankung (Appeltshauser et al., 2020; Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2017; Doppler et al., 2015b; Koike et al., 2017; Mathey et al., 2017; Miura et al., 2015; Querol et al., 2013). Außerdem findet sich bei PatientInnen mit Contactin-IgG-Autoantikörpern teilweise ein zeitgleich mit der Immunneuropathie auftretendes nephrotisches Syndrom, was am ehesten dadurch erklärt wird, dass Contactin-1 auch auf Podozyten der Niere exprimiert

wird (Cortese et al., 2020; Doppler et al., 2015b; Hashimoto et al., 2018; Reid et al., 1994; Sistani et al., 2013; Taieb et al., 2019).

Tabelle 10: Studien mit Nachweis von CASPR-1-IgG-Autoantikörpern

Studie zu CASPR-1-Autoantikörpern	CIDP-PatientInnen	Dominierende IgG-Subklasse(n)	GBS-PatientInnen	Dominierende IgG-Subklasse(n)
Doppler et al., 2016	1/35	IgG4(1x)	1/22	IgG3 (1x)
Delmont et al., 2017	2/246	keine Angabe	0/26	/
Cortese et al., 2020	6/342	IgG4 (3x) IgG1 (2x) kein Subklassennachweis (1x)	/	/
Appeltshauser et al., 2020	2/23 (1x kombiniert mit Contactin-1-IgG)	IgG3 (1x) IgG2/3→IgG4 im Verlauf (1x) (ebenfalls Contactin-1-IgG3-Autoantikörper)	1/114	IgG3
Delmont et al., 2020	2/1500	IgG3/IgG4 (2x)		

Die Angaben wurden größtenteils aus Vural et al., 2018 übernommen und mit eigener Recherche ergänzt.

PatientInnen mit CASPR-1-IgG-Autoantikörpern zeichnen sich durch einen (sub)akuten Beginn, motorisch betonte Symptome und ein schlechtes Ansprechen auf IVIG-Therapie aus, wobei die ursprünglich als charakteristisch angesehenen neuropathischen Schmerzen nicht bei allen PatientInnen auftreten (Appeltshauser et al., 2020; Cortese et al., 2020; Doppler et al., 2016).

Tabelle 11: Studien mit Nachweis von Neurofascin-Autoantikörpern

Studie zu Neurofascin-Autoantikörpern	CIDP-PatientInnen	Isoformenreaktivität, IgM bzw. dominierende IgG- Subklasse(n)	GBS-PatientInnen	Isoformenreaktivität, IgM bzw. dominierende IgG-Subklasse(n)
Ng et al., 2012	4/119	NF-155-IgG4 (2x) mit IgM NF-155-IgG3 (1x) mit IgM NF-155/186-IgG3 (1x) mit IgM	3/115	NF-155-IgG1 (1x) NF-186-IgG1 (1x) NF-155/186-IgG1/IgG3 (1x)
Querol et al., 2014	2/53 2/8 (IVIG resistente CIDP)	NF-155-IgG4 (4x)	0/51	/
Ogata et al., 2015	9/50	NF-155-IgG4 (9x)	1/26	IgG1 (1x)
Devaux et al., 2016	39/533	NF-155-IgG4 (38x) NF-155-IgG3 (1x)	0/200	/
Cortese et al., 2016	1/26	NF-155-IgG4 (1x)	/	/
Kadoya et al., 2016	15/191	NF-155-IgG4 (15x)	/	/
Mathey et al., 2017	3/44	NF-155-IgG4 (3x)	/	/
Delmont et al., 2017	10/246	NF-155-IgG4 (5x) NF-186-IgG4 (1x) NF-155/186/140-IgG4 (3x) NF-155/186/140-IgG3 (1x)	0/26	/
Garg et al., 2018	3/55	NF-155-IgG4 (3x)	/	/
Burnor et al., 2018	5/40	NF-155-IgG4 (2x) NF-155-IgG4/IgM (1x) NF-155/186-IgG4 (1x) NF-186-IgM (1x)	3/14	NF-155-IgM (1x) NF-186-IgM (2x)
Vallat et al., 2018	Fallbericht	NF-155/186/140-IgG3	/	/
Zhang et al., 2019	7/29	NF-155-IgG4 (6x) NF-186-IgG4 (1x)	/	/
Cortese et al., 2020	9/342	NF-155-IgG4 (7x) NF-155-IgG3 (1x) NF-155-Subklasse nicht detektierbar (1x)	0/31	/
Delmont et al., 2020	15/1500	NF-155-IgG4 (15x), mit IgM (14x)	/	/
Tard et al., 2020	/	/	Fallbericht	NF-155/186/140-IgM

Ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Die Studien von Doppler et al., 2018 sowie Stengel et al., 2019, die Daten aus diesem Promotionsprojekt enthalten, sind hier noch nicht aufgeführt. Auch Fallberichte, die für diese Promotion als nicht relevant angesehen werden, sind aus Gründen der Übersichtlichkeit hier nicht aufgeführt. NF = Neurofascin

Wie in Tabelle 11 ersichtlich konzentrierten sich die Studien zu Neurofascin-Autoantikörpern bisher stark auf PatientInnen mit Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern und es zeigte sich ein charakteristischer klinischer Phänotyp mit jungem Erkrankungsalter zwischen 20 und 30 Jahren, einem subakuten und schwerem Krankheitsbeginn, einem behinderndem Tremor, sensibler sowie cerebellärer Ataxie, distal betonter Schwäche und einem schlechten Ansprechen auf IVIG-Therapie (Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2020; Devaux et al., 2016; Garg et al., 2018; Kadoya et al., 2016; Mathey et al., 2017; Ogata et al., 2015; Querol et al., 2014). Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern auf genetischer Ebene mit dem HLA-Typ DRB1*15 assoziiert ist (Martinez-Martinez et al., 2017). Über Neurofascin-Autoantikörper der Immunglobulinklasse IgM, andere IgG-Subklassen oder auch gleichzeitige Reaktivität gegen alle drei Neurofascin-Isoformen 155/186/140 und die damit assoziierten klinischen Eigenschaften der PatientInnen ist bisher allerdings nur wenig bekannt.

1.4.3 Therapieansprechen bei PatientInnen mit paranodalen IgG4-Autoantikörpern

Wie im vorausgehenden Kapitel beschrieben sprechen viele PatientInnen mit Neurofascin-155-, CASPR-1 oder Contactin-1-IgG4-Autoantikörpern nicht auf IVIG-Therapie an, auch wenn diese zu den Standardtherapien sowohl bei dem GBS als auch bei der CIDP zählt. In einer Studie sprachen nur drei von elf PatientInnen mit Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern auf eine IVIG-Therapie an, während von den 46 PatientInnen ohne paranodale Autoantikörper 42 von der IVIG-Therapie profitierten (Kadoya et al., 2016; Vural et al., 2018). Dies wird dadurch erklärt, dass die Inhibition der Komplementaktivierung zu den Hauptmechanismen der IVIG-Therapie zählt und IgG4 nicht über eine Aktivierung des Komplementsystems wirkt (Appeltshausen et al., 2017; Querol et al., 2014). Viele PatientInnen mit Neurofascin-155-, CASPR-1- oder Contactin-1-IgG4-Autoantikörpern zeigen hingegen ein sehr gutes Ansprechen auf eine Rituximabtherapie (Cortese et al., 2020; Doppler et al., 2016; Doppler et al., 2015b; Querol & Illa, 2015). Für PatientInnen mit Contactin-1- bzw Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern ist eine doppelt-verblindete, randomisierte sowie Placebo-kontrollierte

Studie zur Effektivität und Sicherheit von Rituximab geplant (Shimizu et al., 2020). In Tabelle 12 wird ein Überblick über das Medikament Rituximab gegeben.

Tabelle 12: Rituximab-Therapie

Rituximab			
Einsatzgebiete	Wirkmechanismus	Mögliches Therapieschema	Nebenwirkungen (bedeutende und häufige)
-Non-Hodgkin-Lymphom -Chronisch-lymphatische Leukämie -Rheumatoide Arthritis -Granulomatose mit Polyangiitis -Pemphigus vulgaris -Myasthenia gravis (off-label) -mit monoklonaler IgM-Gammopathie assoziierte Neuropathie (off-label) -(Para-)nodopathie mit IgG4 (off-label) (European-Medicines-Agency, 2020; Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018; Whittam et al., 2019)	-monoklonaler Antikörper gegen CD20 -dadurch Depletion von CD20 tragenden B-Zellen (Plasmazellen und Stammzellen nicht, da kein CD20) -verschiedene Mechanismen der Depletion (z.B Apoptose, Antikörper vermittelte Zytotoxizität, Komplement vermittelte Zytotoxizität)	375 mg pro m ² Körperoberfläche intravenös einmal wöchentlich über vier Wochen oder 1000 mg intravenös zwei Mal im Abstand von zwei Wochen; Wiederholung nach Anstieg der B-Zellen im peripheren Blut, meist nach ca. zwölf Monaten Entnommen aus Therapieempfehlung für IgM-assoziierte Neuropathie der DGN Leitlinie	-allergische Reaktion -grippeähnliche Symptome -gering erhöhtes Infektionsrisiko
	(Linker & Kieseier, 2008; Voso et al., 2002)	(Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018)	(Sommer & Kommission-Leitlinien-der-DGN, 2018)

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die (Para-)nodopathie ist eine Unterform der Polyneuropathie, die mit einer Beeinträchtigung des Ranvierschen Schnürringes einhergeht. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an Studien und Fallberichten mit dem Nachweis von (para-)nodalen Autoantikörpern, wobei sich die Literatur stark auf Neurofascin-155-Autoantikörper insbesondere der Subklasse IgG4 fokussierte. Autoantikörper der Immunglobulinklasse IgM, Autoantikörper mit anderer IgG-Subklasse oder anderer Neurofascin-Isoformen-Reaktivität wurden in einzelnen Fallberichten erwähnt, aber bisher noch nicht weitergehend erforscht. Auch beim Pathomechanismus fokussierte sich die Literatur stark auf die Wirkung am Ranvierschen Schnürring. Eine Beteiligung insbesondere von Spinalganglienneuronen und cerebellären Neuronen wurde auf Grund der klinischen Symptomatik der PatientInnen zwar vermutet, bis dato aber noch nicht nähergehend untersucht. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit folgende Fragen zu untersuchen:

1. Sind neben den häufig beschriebenen Neurofascin-155-IgG4 Autoantikörpern auch andere Formen von Neurofascin-Autoantikörpern nachweisbar? Welche Rolle spielen andere Subklassen und die Isoformen-Reaktivität? Zeigt sich für diese PatientInnen auch im Vergleich zu Fallberichten aus der Literatur ein spezifischer klinischer Phänotyp?
2. Sind bei CIDP und GBS-PatientInnen neben häufig beschriebenen IgG-Autoantikörpern auch Autoantikörper der Immunglobulinklasse IgM gegen Contactin-1 oder Neurofascin-155 nachweisbar? Welchen klinischen Phänotyp zeigen diese PatientInnen? Liegt bei diesen PatientInnen ebenfalls eine (Para-)nodopathie vor?
3. Wie wirken Contactin-1-IgG-Patientenantikörper verschiedener Subklassen auf Neurone des peripheren und des zentralen Nervensystems? Lassen sich daraus Rückschlüsse auf den Pathomechanismus von Contactin-1-IgG-Autoantikörpern ziehen?

Die Beantwortung dieser drei Fragen spiegelt sich auch in der Dreigliederung von Ergebnis- sowie Diskussionsteil wider, wo diese Fragen in derselben Reihenfolge wie hier vorgestellt behandelt werden.

2 Materialien

2.1 Verwendete Reagenzien

Tabelle 13: Verwendete Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Materialnummer	Verwendungszweck
Aceton	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland (DE)	32201	Fixierung von Zupfnerven
Ammonium- peroxodisulfat	Merck KgaA, Darmstadt, DE	101201	Herstellung von Gelen für Western Blot
Ampuwa steriles pyrogenfreies Aqua	Fresenius Kabi, Sèvres, Frankreich	1080181	Herstellung von Lösungen
Aqua ad iniectabilia	Berlin-Chemie Menarini, Berlin, DE	Zul.-Nr. 2559.99.99	Steriles Wasser für Zellkultur
Aqua Spüllösung (steril und pyrogenfrei)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE	0082479E	Herstellung von Lösungen
Bicinchoninic acid solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, United States of America (USA)	B9643	BCA-Assay zur Proteinbestimmung
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A4503-50G	Herstellung von Blocklösungen
Bromphenol Blue	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B8026	Herstellung von Probenpuffer für Western Blot
B-27 Supplement (50x)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	17504-044	Zusatz für Neuronen-Medium
CaCl ₂	Merck KgaA, Darmstadt, DE	1.02382	Herstellung von CaCl ₂ Lösung
Catalyst	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz	11644793001	Teil des Cytotoxicity Detection Kit
Copper(II) sulphate solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C2284	BCA-Assay zur Proteinbestimmung
CytoBuster Protein Extraction Reagent	Merck Millipore, Billerica, USA	71009	Lyse von Zellen
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz	04744926001	Durchführung von Zytotoxizitätsassays

Desoxyribonuklease I (DNase)	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA	LK003170	Teil des Papain Dissociation Systems
Developer for medical x-ray film processing	AGFA, Mortsel, Belgien	G153	Entwicklungslösung für Western Blots
D-(+)-Glucose wasserfrei, >99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	HN06.3	Herstellung von 2x HBS-Puffer
Dodecyl Sulfate Sodium Salt (SDS)	Merck KgaA, Darmstadt, DE	113760	Herstellung von Puffern und Gelen für Western Blot
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D8537	Steriles PBS für Zellkultur
Dye solution	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz	11644793001	Teil des Cytotoxicity Detection Kit
Earle's Balanced Salt Solution (EBSS)	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA	LK003188	Teil des Papain Dissociation Systems
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F7524	Herstellung von HEK-Zell-Medium
Glycerin, ROTIPURAN® ≥99,5 %, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	3783.1	Herstellung von Probenpuffer für Western Blot
Glycine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	50046	Herstellung von Puffern für Western Blot
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	14175095	Herstellung von Präparationsmedium für cerebelläre Neurone
Horse Serum, Heat Inactivated	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	26050-070	Zellkultur Spinalganglienneurone
H2SO4 1M (2N)	Fluka® Analytical, Honeywell International Inc, Morristown, USA	35276-1L	Stoppen der Farbreaktion beim ELISA
KCl >99,5 %	Merck KgaA, Darmstadt, DE	4935.1000	Herstellung von 2x HBS-Puffer
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	25030-024	Herstellung von HEK-Zell-Medium und Neuronen-Medium

L-Lactate Dehydrogenase (LDH)	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz	10107085001	Substanzkontrolle Zytotoxizitätsassay
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M3148	Herstellung von Probenpuffer für Western Blots
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	32213	Herstellung von Blottingpuffer für Western Blots
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	T145.2	Herstellung von Blockpuffer für Western Blot
Minimal essential medium 1x (MEM)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	21090-022	Herstellung von HEK-Zell-Medium
Mowiol® 4-88	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	0713.1	Eindeckmittel für immunhistochemische Färbungen von Zellen
NaCl > 99 %	Th. Geyer GmbH & Co. KG; Renningen, DE	1367.1000	Herstellung von diversen Lösungen
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S7795	Herstellung von Carbonatpuffer
NaHCO ₃ > 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	6885.1	Herstellung von Carbonatpuffer
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt, DE	1.06580	Herstellung von Stammlösung A, Herstellung von 2x HBS-Puffer
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	Merck KgaA, Darmstadt, DE	1.06345	Herstellung von Stammlösung B
NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	30620	Herstellung von 2x HBS-Puffer
Neurobasal Medium (1x)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	21103-049	Herstellung von Medium für Neurone
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T9281	Herstellung von Gelen für Western Blot
Normal Goat Serum (NGS)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	X0907	Herstellung von Blocklösungen
Ovomucoid Inhibitor-Albumin	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA	LK003182	Teil des Papain Dissociation Systems

Papain	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA	LK003176	Teil des Papain Dissociation Systems
Papain Dissociation System	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA	LK003150	Gewinnung muriner cerebellärer Neurone
Paraformaldehyde	Merck KgaA, Darmstadt, DE	1.04005.1000	Fixierung von Nerven sowie Neuronen
Penicillin/ Streptomycin 10000U/ml (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	15140122	Herstellung von HEK- Zellmedium und Neuronen- Medium
Poly-D-Lysine hydrobromide (PDL)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P6407-5MG	Beschichtung von Coverslips für Zellkultur
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	1610394	Proteinleiter für Western Blots
2-Propanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	AE73.1	Glätten der Masse beim Gießen von Gelen für Western Blots
Protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz	11697498001	Proteaseinhibitor für Zelllyse
Rapid Fixer for medical x-ray film processing	AGFA, Mortsel, Belgien	G354	Fixierlösung für Entwicklung von Western Blots
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1): Acrylamid- stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	3029.1	Herstellung von Gelen für Western Blot
TE Puffer (100X) pH 8.0	PanReac AppliChem, Illinois Tool Works Inc., Glenview, USA	A0973	Transfektion von HEK-Zellen
TMB Substrate Solution 1x	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	00-4201-56	Verantwortlich für Farbreaktion bei ELISA
Tris	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz	10708976001	Herstellung von Puffern und Gelen für Western Blot
Triton X 100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T8787	Herstellung von Blocklösung für Zupfnerven
Trypan Blue solution 0.4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T8154	Anfärben von Zellen für leichtere Auszählbarkeit in der Zählkammer

Trypsin-EDTA (0.05 %)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	25300-054	Lösen von Zellverbänden in der Zellkultur
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE	9127.1	Herstellung von Blocklösung und Waschpuffer
VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI 1.5 µg/ml	Vector Laboratories, Burlingame, USA	H-1200	Eindeckmittel für Immunhistochemie
Western Lightning Plus-ECL Enhanced Luminol Reagent Plus	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA	NEL103E001EA	Chemilumineszenzreagenz für Western Blot
Western Lightning Plus-ECL Oxidizing Reagent Plus	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA	NEL103E001EA	Chemilumineszenzreagenz für Western Blot

2.2 Verwendete Lösungen und Puffer

Tabelle 14: Verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Herstellung	Verwendungszweck
10 % Ammoniumperoxodisulfatlösung	100 g Ammoniumperoxodisulfat wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst.	Herstellung von Gelen für Western Blot
Blocklösung für ELISA	200 ml PBS wurden mit 6,66 ml 10 % BSA/PSB sowie 100 µl Tween 20 versetzt.	Verminderung unspezifischer Bindungen bei ELISA
Blockpuffer für Western Blot	In 100 ml Waschpuffer wurden 5 g Milchpulver gelöst.	Verminderung unspezifischer Bindung bei Färbungen von Western Blots
Blocklösung für Zupfnerven	400 µl NGS wurden mit 400 µl FBS sowie 30 µl Triton X 100 in 9170 µl PBS gelöst.	Verminderung unspezifischer Bindung bei Bindungsassays an Zupfnerven
1x Blottingpuffer	Zu 100 ml 10x Blottingpuffer wurden 200 ml Methanol und 700 ml destilliertes Wasser gegeben.	Verwendung für Blotting bei Western Blots
10x Blottingpuffer	In 1 l destilliertem Wasser wurden 144 g Glycin sowie 30,3 g Tris gelöst.	Herstellung von 1x Blottingpuffer
BSA/PBS 1 %	5 ml von 2 % BSA/PBS wurden zu 5 ml PBS gegeben und die Lösung gut vermischt.	Waschschritt nach dem Blocken bei immunhistochemischen Färbungen von Zellen
BSA/PBS 2 %	200 µl BSA wurden in 9,8 ml PBS gegeben und die Lösung gut vermischt.	Verdünnung des Sekundärantikörpers bei immunhistochemischen Färbungen von Zellen

BSA/PBS 10 %	1 ml BSA wurde in 9 ml PBS gegeben und die Lösung gut vermischt.	Verwendung zum Blocken bei immunhistochemischen Färbungen von Zellen
CaCl ₂ -Lösung	2,5 M CaCl ₂ wurden in destilliertem sterilem Wasser gelöst und auf pH=7 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert.	Transfektion von HEK-Zellen
Carbonatpuffer	4,2 g NaHCO ₃ und 1,78 g Na ₂ CO ₃ wurden zu 500 ml destilliertem Wasser gegeben und auf pH=9,4 titriert.	Verdünnung von Contactin-1 Protein für Proteinbeschichtung von ELISA-Platten
Catalyst-Lösung	Der lyophilisierte Catalyst wurde in 1 ml Aqua ad iniectionem für 10 ml gelöst und anschließend wurde gut geschüttelt.	Herstellung der Reaktionslösung für Zytotoxizitätsassays
DNase-Lösung	In das Vial mit lyophilisierter DNase wurden vorsichtig 0,5 ml EBSS gegeben, sodass die Lösung 2000 Units DNase pro ml enthielt.	Zellkultur cerebellärer Neurone
2x HBS-Puffer	12 mM Glucose-Pulver sowie 10 mM KCl, 280 mM NaCl und 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O wurden in destilliertem sterilem Wasser gelöst. Mit NaOH wurde mit Hilfe des pH-Meters pH=6,95 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert. Aliquots wurden bei -20°C gelagert und wurden nicht mehrmals aufgetaut.	Transfektion von HEK-293-Zellen
HEK-Zell-Medium	Zu 500 ml MEM-Medium wurden 5 ml L-Glutamin, 5 ml Pen/Strep und 50 ml hitzeinaktiviertes FBS gegeben und steril filtriert.	Medium für HEK-293-Zellen
1x Laufpuffer	Zu 100 ml 10x Laufpuffer wurde 1 l destilliertes Wasser gegeben.	Laufpuffer für Western Blot
10x Laufpuffer	Zu 1 l destilliertem Wasser wurden 10 g SDS, 30,3 g TRIS sowie 144,1 g Glycin gegeben.	Herstellung von 1x Laufpuffer für Western Blot
5M NaCl	146,1 g NaCl wurden in 500 ml destilliertem Wasser gelöst.	Herstellung von PBS

Neuronen-Medium	100 ml Neurobasal Medium wurden mit 1 ml L-Glutamin, 1 ml B-27 Supplement (50x) sowie 2 ml Pen/Strep versetzt und anschließend steril filtriert.	Medium für cerebelläre Neurone sowie Spinalganglienneurone
Ovomucoid Inhibitor-Albumin-Lösung	In das Vial mit dem lyophilisiertem Ovomucoïd-Inhibitor-Albumin wurden 32 ml EBSS gegeben, sodass die Lösung eine Konzentration von 10 mg/ml Albumin sowie 10 mg/ml Ovomucoïd-Inhibitor enthält. Bei 2-8 °C konnte die Lösung mehrere Wochen aufbewahrt werden.	Verantwortlich für Dichtegradient bei Zellkultur cerebellärer Neurone
Papain-Lösung	In das Vial mit dem lyophilisiertem Papain wurden 5 ml EBSS gegeben, sodass die Lösung 20 Units Papain pro ml in 1 mM L-Cystein mit 0,5 mM EDTA enthielt. Anschließend wurden 250 µl der DNase-Lösung hinzugefügt, sodass insgesamt 0,005 % DNase in der Papain-Lösung enthalten waren.	Verantwortlich für Auflösung des Zellverbandes bei Zellkultur cerebellärer Neurone
Paraformaldehyde (PFA) 4 %	4 g PFA 95 % wurden mit 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer vermischt.	Fixierung von entnommenem Nervengewebe, Fixation von Zellen
PDL-Lösung	1 mg Poly-D-Lysin wurde in 10 ml sterilem, destilliertem Wasser gelöst.	Beschichtung von Coverslips für Zellkultur
0,1 M Phosphate Buffered Saline (PBS)	800 ml der basischen Stammlösung A wurden mit 160 ml der sauren Stammlösung B vermischt. Anschließend wurde mit Hilfe der Stammlösung B auf pH=7,4 titriert. Es wurden 60 ml 5M NaCl hinzugegeben und mit destilliertem Wasser auf 2 l aufgefüllt.	Herstellung von Blocklösungen und Waschpuffern, Waschen von Zellen bei immunhistochemischen Färbungen
0,05 M Phosphatpuffer	0,1 M Phosphatpuffer wurde 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt.	Schutz des entnommenen Nervengewebes vor Austrocknung während Verarbeitung

0,1 M Phosphatpuffer	405 ml 0,2 M Stammlösung A und 95 ml Stammlösung B wurden vermengt und ein pH=7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe von destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.	Kurzzeitige Lagerung entnommenen Nervengewebes
Präparationsmedium für Cerebella	In 1 l HBSS Lösung wurden 6 g D-(+)-Glucose gelöst.	Präparation und kurzzeitige Aufbewahrung für Cerebella
Proteaseinhibitor-Lösung	1 Tablette Proteaseinhibitor cocktail tablets wurde in 2 ml Aqua ad iniectabilia gelöst.	Herstellung von Lysaten cerebellärer Neurone
Reaktionslösung für Zytotoxizitätsassay	250 µl der Catalyst-Lösung wurden mit 11,25 ml der Dye solution vermischt. Die Lösung wurde erst kurz vor Verwendung zubereitet und war jeweils für 100 Proben ausreichend.	Messung der LDH-Aktivität mittels Zytotoxizitätsassay
10 % SDS	100 g SDS wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst.	Herstellung von Lösungen und Gelen für Western Blot
4x SDS-Probenpuffer	Zu 75 ml destilliertem Wasser wurden 6,25 ml 1 M Tris mit pH=6,8 gegeben. Es wurden 8 g SDS, 15 ml Glycerin sowie 3 ml Mercaptoethanol und eine Spatelspitze Bromphenolblau hinzugefügt.	Probenpuffer für Western Blot
Stammlösung A	In 1 l destilliertem Wasser wurden 35,6 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O gelöst.	Herstellung weiterer Lösungen
Stammlösung B	In 1 l destilliertem Wasser wurden 31,2 g NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O gelöst.	Herstellung weiterer Lösungen
0,1x TE-Puffer	TE wurde in der Konzentration 1:10.000 in sterilem Wasser verdünnt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert.	Transfektion von HEK-Zellen
1 M Trislösung	121 mg Tris wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst und auf einen pH=6,8 austitriert.	Herstellung von Puffern und Gelen für Western Blots
1,5 M Trislösung	181,5 mg Tris wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst und es wurde auf einen pH=8,8 austitriert.	Herstellung von Puffern und Gelen für Western Blots
Waschpuffer	1 l PBS wurde mit 500 µl Tween 20 versetzt.	Waschen von Wells der ELISA-Platten, Waschen von Western Blots

2.3 Verwendete Proteine und Komplement

Tabelle 15: Verwendete Proteine und Komplement

Bezeichnung	Hersteller	Materialnummer	Verwendungszweck
Complement component C1q from human serum > 95 %	Merck KgaA, Darmstadt, DE	80295-33-6	Komplementfaktor bei Komplementbindungsassay
Full-length human neurofascin-155 protein	Nicht kommerziell (Edgar Meinl, München, DE)	nicht kommerziell	Proteinbeschichtung von ELISA-Platten mit Neurofascin-155
Full-length human neurofascin-186 protein	Nicht kommerziell (Edgar Meinl, München, DE)	nicht kommerziell	Proteinbeschichtung von ELISA-Platten mit Neurofascin-186
Recombinant human CNTN1/ Contactin-1 protein	Sino Biological Inc., Beijing, China	10383-H08H	Proteinbeschichtung von ELISA-Platten mit Contactin-1
Recombinant human NF-140 protein	Sino Biological Inc., Beijing, China	15694-H08H-50	Proteinbeschichtung von ELISA-Platten mit Neurofascin-140

2.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 16: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Materialnummer	Verwendungszweck
Alexa-Fluor 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	703-545-155	Sekundäntikörper für Positivkontrolle immunhistochemische Färbung Neurofascin transfizierten HEK-293-Zellen
Anti-Beta III Tubulin antibody, polyclonal chicken anti-human/ rat/ mouse	abcam®, Cambridge, Großbritannien	ab41489	Primäntikörper für immunhistochemische Färbungen von Neuronen
Anti-Complement C1q Antibody (HRP), polyclonal Sheep IgG	LifeSpan BioSciences, Seattle, USA	LS-C41845	Sekundäntikörper für Komplementbindungsassay

Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/ rat/ mouse	abcam®, Cambridge, Großbritannien	ab105582	Primärantikörper für Positivkontrolle Contactin-1-ELISA, Primärantikörper für Positivkontrolle Contactin-1 transfizierte HEK-293-Zellen
Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin	abcam®, Cambridge, Großbritannien	ab31457	Primärantikörper für Western Blot
CyTM3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	705-165-147	Sekundärantikörper für Positivkontrolle Contactin-1 transfizierte HEK-Zellen, Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbung von Neuronen
CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	103-165-155	Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbung von Neuronen
CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	109-165-003	Sekundärantikörper für Bindungsassays an Zupfnerven, Sekundärantikörper für Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen, Sekundärantikörper für Bindungsassays an Neuronen
CyTM3-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	315-165-003	Sekundärantikörper für Positivkontrolle Contactin-1 transfizierte HEK-293-Zellen
Donkey Anti-Goat IgG (H&L), Secondary Antibody, HRP conjugated	abcam®, Cambridge, Großbritannien	ab205723	Sekundärantikörper für Positivkontrolle Contactin-1-ELISA
GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	MA5-15738	Primärantikörper für Ladekontrolle Western Blot
Goat anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugated	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	PA1-28798	Sekundärantikörper für Positivkontrolle Neurofascin-ELISA

Human/Mouse/Rat Contactin-1 Antibody, Antigen Affinity- purified, polyclonal Goat IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF904	Primärantikörper für Positivkontrolle Contactin-1- ELISA, Primärantikörper für Positivkontrolle Contactin-1 transfizierte HEK-Zellen, Primärantikörper für immunhistochemische Färbung von inkubierten Neuronen, Primärantikörper für Western Blot
Human/ Mouse/ Rat Neurofascin Antibody, Antigen Affinity- purified Polyclonal Chicken IgY	R&D Systems, Minneapolis, USA	AF3236	Primärantikörper für Positivkontrolle Neurofascin- ELISA, Primärantikörper für Positivkontrolle Komplement- bindungsassay, Primärantikörper für Positivkontrolle Neurofascin transfizierte HEK-293-Zellen, Primärantikörper für immunhistochemische Färbungen an inkubierten Neuronen
Monoclonal anti-human IgG3-FITC antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F4641	Sekundärantikörper gegen IgG3 bei subklassenspezifischen Bindungsassays an cerebellären Neuronen
Mouse anti-Human IgG1 Fc Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	A-10648	Sekundärantikörper gegen IgG1-Autoantikörper im ELISA
Mouse anti-Human IgG4 Fc Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	A-10654	Sekundärantikörper gegen IgG4-Autoantikörper im ELISA
Mouse monoclonal HP6014 antihuman IgG2 Fd gamma (FITC)	abcam®, Cambridge, Großbritannien	ab99788	Sekundärantikörper gegen IgG2 bei subklassenspezifischen Bindungsassays an cerebellären Neuronen
Mouse monoclonal HP6025 antihuman IgG4 Fc (FITC)	abcam®, Cambridge, Großbritannien	ab99821	Sekundärantikörper gegen IgG4 bei subklassenspezifischen Bindungsassays an cerebellären Neuronen

Mouse monoclonal [4E3] Secondary Antibody to Human IgG1- hinge heavy chain (FITC)	abcam®, Cambridge, Großbritannien	ab99772	Sekundäntikörper gegen IgG1 bei subklassenspezifischen Bindungsassays an cerebellären Neuronen
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti- Goat IgG (H+L)	Jackson Immuno- Research, West Grove, USA	705-035-003	Sekundäntikörper für Western Blot
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti- Mouse IgG (H+L)	Jackson Immuno- Research, West Grove, USA	715-035-150	Sekundäntikörper für Positivkontrolle Contactin-1- ELISA, Sekundäntikörper für Western Blot
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti- Rabbit IgG (H+L)	Jackson Immuno- Research, West Grove, USA	711-035-152	Sekundäntikörper für Positivkontrolle Contactin-1- ELISA, Sekundäntikörper für Western Blot
Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody to Human IgG2	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	05-0520	Sekundäntikörper gegen IgG2-Autoantikörper im ELISA
Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody to Human IgG3	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	05-3620	Sekundäntikörper gegen IgG3-Autoantikörper im ELISA
Polyclonal Rabbit Anti- Human IgG/ HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	P0214	Sekundäntikörper gegen IgG- Autoantikörper im ELISA
Polyclonal Rabbit Anti- Human IgM/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	P0215	Sekundäntikörper gegen IgM-Autoantikörper im ELISA, Sekundäntikörper für Western Blot

2.5 Verwendetes Verbrauchsmaterial

Tabelle 17: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller/ Fachhandel	Materialnummer	Verwendungszweck
Blotting Paper	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DE	GB33	Papier für Blotting von Western Blots
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht, DE	83.1830	Schaber für Zelllyse

CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 75 cm ²	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich	658 175	Sterile Zellkulturflaschen für HEK-Zellen
CELLSTAR® Serologische Pipette, 10 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich	607 180	Sterile Pipetten für Zellkultur
CELLSTAR® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich	188 271	Sterile Tubes für Zellkultur
CELLSTAR® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich	227 261	Sterile Tubes für Zellkultur
Cell Strainer, 70 µm Nylon	Biosciences, Durham, USA	352350	Zellsieb
CoverGrip Sealant	Biotium, Fremont, USA	23005	Umrandung von Deckgläschen, um Verdunstung von Eindeckmittel zu minimieren
Cover Slips, 12 mm dia	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	A67761333	Coverslips für Zellkultur
Coverslips 12 mm round, Poly-D-Lysine/Laminin Cellware	Corning, Inc., Corning, USA	354087	Coverslips für Neurone
Glass Pasteur Pippetes	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, DE	7477 20	Titrierung von Spinalganglien
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht, DE	67.742	Einsatz bei Messung des Proteingehaltes in Lysaten
Liquid Blocker-Super PAP-Pen	Science Services GmbH, München, DE	N71310	Umrandung von Zupfnerven für Immunhistochemie
Nitrocellulose Western Blotting Membranes	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckingham-shire, Großbritannien	10600002	Nitrocellulose Membran für Blotting von Western Blots
Nunc-Immuno Plate F96 Maxisorp	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	442404	96-Well Platten für ELISA und Zytotoxizitätsassay

Nunclon™ Delta Surface 24 Well	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	142475	Sterile 24 Well Platten für Zellkultur
Nunclon™ Delta Surface 96 Well	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	167008	Sterile 96 Well Platten für Zellkultur
Nunclon™ Dish 35x10	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	150318	Sterile Schalen für Zellkultur
Rapid-Flow Bottle Top Filter	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	291-4520	Sterile Filter für Lösungen
Universalfilm Super RX- N	Fujifilm Holdings K.K., Tokio, Japan	47410-19284	Röntgenfilm für Entwicklung von Western Blots

2.6 Verwendete Geräte und Gebrauchsmaterial

Tabelle 18: Verwendete Geräte und Gebrauchsmaterial

Gerät	Hersteller	Artikelbezeichnung
Bio-Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, DE	6131 23891
Bunsenbrenner Gasprofi 1 SCS micro	WLD-TEC GmbH, Arenshausen, DE	6.004.000
Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE	5426 05212
Dry Block Thermostat	Biosan, Riga, Lettland	Bio TDB-100
Entwicklungsmaschine CURIX 60	AGFA, Mortsel, Belgien	9462/106
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE	Axio Imager.M2
Fluoreszenzmikroskopkamera	SPOT Imaging Solutions, Burroughs, USA	Pursuit™ USB 1.4 Mp SLIDER
Glasplatten Mini-PROTEAN® Short Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	1653308
Glasplatten Mini-PROTEAN® Spacer Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	1653311

Hamilton-Mikroliterspritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz	705N
Heizplatte	Medax Nagel GmbH, Kiel, DE	SP13
Holzboxen für feuchte Kammer	Technischer Dienst der Neurologie UKW, Würzburg, DE	nicht kommerziell, (Sonderanfertigung für die Histologie der Neurologie)
Hypercassette RPN13642 18x24 cm	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckingham-shire, Großbritannien	RPN13642
Infinite M200 Pro ELISA Reader	Tecan GmbH, Männedorf, Schweiz	30050303
Inkubator Heracell	Kendro Laboratory Products, Hanau, DE	Heracell 51013568
Magnetplatte MR Hei-Mix-L	Heidolph, Schwabach, DE	505-00000-00-0
Mini-PROTEAN® Tetra System für Western Blot	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	Mini Trans-Blot® Cell
Mini Rocker-Shaker	Grant Instruments, Cambridgeshire, Großbritannien	PMR-30
Multiscan FC ELISA Reader	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	51119000
Objektiv Fluoreszenzmikroskop x20	Zeiss, Oberkochen, DE	Plan-Apochromat 20x/0,8 Ph2 M27
Objektiv Fluoreszenzmikroskop x40	Zeiss, Oberkochen, DE	Plan-Apochromat 40x/0,95 Korr Ph3 M27
PH Meter FiveEasy F20	Mettler-Toledo GmbH, Columbus, USA	30266658
PH Meter Sonde LE438	Mettler-Toledo, Columbus, USA	51340242
PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	041BR69325
PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA	043BR35949

Präparationsmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE	Stemi2000 450043
Rotina 46 R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, DE	4610
Sterilbank Heraeus HS 18	Kendro Laboratory Products, Hanau, DE	51012199
Wasserbad WNB 7	Memmert GmbH, Schwabach, DE	8419 8998
Zählkammer Neubauer Improved	Assistent, Sondheim vor der Rhön, DE	40442
Zellkulturmikroskop CKX53	Olympus, Tokyo, Japan	6G40227 2012607
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Osterode, DE	75003060

2.7 Verwendete Software

Tabelle 19: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller	Version
Endnote	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA	X9
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA	8.4.3
ImageJ	National Institutes of Health, USA	1.53 c und 1.49 b
Microsoft Office Home and Business 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA	15.0.5275.1000
VisiView	Visitron Systems, Puchheim, DE	2.1.1

2.8 Verwendete Zellen und Gewebe

Tabelle 20: Verwendete Zellen und Gewebe

Zellen- bzw. Gewebetyp	Mäuse- bzw. Zellart, Mäuse bzw. Zelllieferant	Verwendungszweck
Cerebelläre Körnerzellen	Aus C57BL/6 Mäusen, 5 Tage postnatal	Bindungs- und Inkubationsversuche mit Autoantikörper enthaltenden Seren
N. ischiadicus	Aus adulten weiblichen C57BL/6 Mäusen	Bindungsassays an Ischiadicuszupfnerven

HEK-293-Zellen	ATCC®CRL-1573™ ATCC, Wesel, DE (von Prof. Dr. Carmen Villmann zur Verfügung gestellt)	Bindungsassays und Präinkubationsversuche mit Autoantikörper enthaltenden Seren
Spinalganglienneurone	Aus murinen C57BL/6 Embryonen, 13-15 Tage post conceptionem	Bindungs- und Inkubationsversuche mit Autoantikörper enthaltenden Seren
Vorderwurzeln	Aus adulten weiblichen Lewis Ratten, Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld, DE	Bindungsassays an Vorderwurzel-zupfnervpräparaten

2.9 Verwendung geschlechtergerechter Sprache

Eine Gruppe von Patienten unterschiedlichen Geschlechtes wird im Rahmen dieser Monographie als PatientInnen bezeichnet, um gemäß dem Leitfaden der Universität Würzburg das Gleichstellungskonzept in Form von geschlechtergerechter Sprache umzusetzen. Bei Gruppen von Patienten, die sich aus rein männlichen oder rein weiblichen Individuen zusammensetzten, werden die Begriffe Patienten bzw. Patientinnen verwendet. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit, werden die Begriffe „Patientenantikörper“, „Patientenserum“ und „Patientenmaterial“ unabhängig vom Geschlecht der Individuen verwendet. Außerdem werden in Abbildungsbeschriftungen die beiden weiblichen Patientinnen IgM-Patientin 3 und CNTN-Patientin 2 als „Patient“ bezeichnet, um die Abbildungen möglichst übersichtlich gestalten zu können.

3 Methoden

3.1 PatientInnen- und Kontrollkollektiv

Zwischen Juli 2016 und Juli 2018 wurden 264 PatientInnen (179 Männer, 83 Frauen, 2 anonymisierte Proben mit unklarem Geschlecht) mit unterschiedlichen Formen von Polyneuropathien in die Studie eingeschlossen. Die Mehrzahl der Patientenseren wurden von den behandelnden ÄrztInnen zu diagnostischen Zwecken eingesandt, einzelne Patienten wurden prospektiv auf den Stationen der Neurologischen Klinik für die Studie rekrutiert und willigten nach entsprechender Aufklärung schriftlich in die Studienteilnahme ein. Seropositive Patienten willigten ebenfalls nach schriftlicher Aufklärung in die Verwendung des Serums für die Studie ein. Das Durchschnittsalter des PatientInnenkollektives betrug 59,3 Jahre. Kontrollpersonen wurden prospektiv rekrutiert und willigten nach entsprechender Aufklärung schriftlich in die Studienteilnahme ein. Eine Befürwortung der Studie erfolgte durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Würzburg (Nr. 278/13 sowie Nr. 225/13).

3.1.1 Subgruppen des PatientInnenkollektives

Von ÄrztInnen verschiedener Kliniken wurden Seren von PatientInnen mit Verdacht auf Immunneuropathie mit der Frage, ob Autoantikörper gegen (para-)nodale Antigene vorliegen, zu diagnostischen Zwecken sowie Forschungszwecken eingesandt. Neben den 140 Seren aus dem Universitätsklinikum Würzburg, wurden auch 124 Seren aus verschiedenen Neurologischen Kliniken und Praxen Deutschlands sowie jeweils einer Klinik aus Belgien und der Schweiz eingesandt.

Die Diagnosen der PatientInnen wurden bei PatientInnen des Universitätsklinikums Würzburg aus den Arztbriefen übernommen. Bei den Würzburger PatientInnen, bei denen der klinische Verdacht auf eine CIDP bestand, wurden die klinischen sowie elektrophysiologischen Kriterien hinsichtlich der INCAT-Diagnosekriterien an Hand der Arztbriefe überprüft. Erfüllten die PatientInnen die INCAT-Diagnosekriterien wurden sie unter „CIDP Würzburg“ kategorisiert. Bestand lediglich der klinische Verdacht auf eine CIDP ohne Erfüllung der INCAT-Diagnosekriterien, wurden die PatientInnen in die Kategorie „V.a. CIDP Würzburg“ eingeordnet. Bei den Würzburger PatientInnen mit einem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) wurden an Hand der Arztbriefe die Brighton-

Diagnosekriterien überprüft. Bei Erfüllung der Brighton-Diagnosekriterien wurden die PatientInnen in die Kategorie „GBS Würzburg“ eingeordnet. Die PatientInnen mit der klinischen Arztbriefdiagnose eines GBS, die die Brighton-Diagnosekriterien nicht erfüllten, wurden in der Kategorie „Atypisches GBS Würzburg“ zusammengefasst. Bei den auswärtigen PatientInnen standen meist nur die Angaben zu Verdachtsdiagnose, Alter und Geschlecht auf den Anforderungsscheinen zur Verfügung, sodass keine Überprüfung im Hinblick auf INCAT- bzw. Brighton-Diagnosekriterien erfolgen konnte. An Hand der angegebenen Verdachtsdiagnosen erfolgte eine Einordnung in die Kategorien „V.a. GBS auswärts“, „V.a. CIDP auswärts“ oder „andere Polyneuropathie (PNP) auswärts“. Fehlte auf dem Anforderungsschein eine Verdachtsdiagnose, wurden die PatientInnen ebenfalls unter „andere PNP auswärts“ eingeordnet. Bei einem positiven Befund für (para-)nodale Autoantikörper wurden uns aus den auswärtigen Kliniken auch die Arztbriefe für die jeweiligen PatientInnen pseudonymisiert zugesandt. Die folgende Tabelle 21 zeigt die Subgruppen des PatientInnenkollektives mit jeweiligem Durchschnittsalter und der Geschlechtsverteilung.

Tabelle 21: Subgruppen des PatientInnenkollektives mit Durchschnittsalter und Geschlecht

Diagnose	Durchschnittsalter in Jahren	Gesamtzahl PatientInnen	Anzahl männliche Patienten	Anzahl weibliche Patientinnen	Anzahl Patienten mit unklarem Geschlecht
Gesamtes PatientInnenkollektiv	59,3	264	179	83	2
GBS Würzburg	66,6	7	5	2	/
Atypisches GBS Würzburg	40,3	4	4	/	/
V.a. GBS auswärts	58,5	6	2	4	/
CIDP Würzburg	50,9	14	10	4	/
V.a. CIDP Würzburg	61,8	9	8	1	/
V.a. CIDP auswärts	60,4	24	19	5	/
Andere PNP Würzburg	61,2	106	63	43	/
Andere PNP auswärts	58,2	94	68	24	2

3.1.2 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv umfasste Seren von 81 gesunden Personen (43 Männer, 38 Frauen). Der Altersdurchschnitt der Kontrollpersonen betrug 52,9 Jahre.

19 Personen wurden im Rahmen dieser Studie rekrutiert. 62 gesunde Kontrollpersonen waren bereits durch Dr. Melissa Held und Dr. Luise Appeltshauer rekrutiert und durch Dr. Luise Appeltshauer in einer Vorläuferstudie getestet worden.

Anamnestisch waren bei den Kontrollpersonen autoimmune Erkrankungen und Polyneuropathien ausgeschlossen worden.

3.1.3 PatientInnen mit Contactin-1-IgG-Autoantikörpern

Bei den Patienten, deren Seren für Versuche an murinen Neuronen eingesetzt wurden, waren bereits durch Dr. Luise Appeltshauer Contactin-1-IgG-Autoantikörper nachgewiesen worden (Appeltshauer, 2018; Doppler et al., 2015b). Diese PatientInnen waren nicht Teil des oben beschriebenen PatientInnenkollektives.

Die folgende Tabelle 22 zeigt die Diagnosen, das Alter, das Geschlecht der PatientInnen sowie die von Dr. Luise Appeltshauer ermittelten Titer und Subklassen der Contactin-1-IgG-Autoantikörper in Serum (Appeltshauer, 2018).

Tabelle 22: PatientInnen mit Contactin-1-IgG-Autoantikörpern

PatientInnen mit CNTN-IgG-Autoantikörper	Diagnose	Alter	Geschlecht	Subklasse der CNTN-IgG-Autoantikörper	Titer CNTN-IgG-Autoantikörper
CNTN-Patient 1	CIDP	76	♂	IgG3>IgG4	1:7.500
CNTN-Patientin 2	CIDP	62	♀	IgG4>>IgG2	1:10.000

CNTN = Contactin-1

3.1.4 Verarbeitung der Proben

Die erhaltenen Seren wurden mit der Zentrifuge Rotina 46 R bei 5000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand des Serums wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

3.2 Bindungsassays an Zupfnervpräparaten

Bindungsassays an murinen Ischiadicuszupfnerven dienten als Screeningtest auf das Vorliegen (para-)nodaler Autoantikörper sowohl für alle PatientInnen als auch für gesunde Kontrollpersonen.

3.2.1 Herstellung von Zupfnervpräparaten

Die weiblichen Mäuse bzw. Ratten wurden durch zervikale Dislokation nach Betäubung mit Isofluran getötet. Mit Hilfe eines Skalpells sowie einer spitzen Pinzette wurde die Haut eröffnet und die Muskulatur stumpf zur Seite präpariert. Anschließend erfolgte die Entnahme des N. ischiadicus, der zwischen dem Austritt aus dem Plexus lumbosacralis und kurz vor der Aufzweigung in N. fibularis und N. tibialis mit Hilfe einer Schere entnommen wurde. Das Nervengewebe wurde zunächst für zehn Minuten in 4 % PFA fixiert. Anschließend erfolgte die weitere Aufbewahrung in 0,1 M Phosphatpuffer. Das Nervengewebe wurde meist direkt, spätestens aber nach 48 Stunden verarbeitet. Hierfür wurde das Nervengewebe zum Schutz vor Austrocknung auf einen Objektträger mit 0,05 M Phosphatpuffer gegeben. Zunächst wurde das Peri- und Epineurium mit Hilfe einer spitzen Pinzette entfernt. Einzelne Faszikel wurden entnommen und jeweils auf eigenen Objektträgern mit geringen Mengen an 0,05 M Phosphatpuffer unter dem Mikroskop gezupft, sodass einzelne Axone frei zu liegen kamen. Die Objektträger wurden für 12-24 Stunden getrocknet und anschließend bei -20 °C kryokonserviert.

3.2.2 Durchführung von Bindungsassays

Mögliche (para-)nodale Autoantikörper der Klasse IgG im Serum von PatientInnen dienten als Primärantikörper, die an die Strukturen des Ranvierschen Schnürringes binden können. Ein Cy3 gekoppelter Sekundärantikörper gegen humanes IgG ließ dann im Falle einer Bindung ein Fluoreszenzsignal im (para-)nodalen Bereich des Ranvierschen Schnürringes sichtbar werden. Das Prinzip der Bindungsassays an Zupfnerven wird in der folgenden Abbildung 5 dargestellt.

Legende:

Axon

Myelinscheide

Zielantigen des Ranvierschen Schnürringes

Anderes Antigen des Ranvierschen Schnürringes

IgG-Antikörper gegen Zielantigen des Ranvierschen Schnürringes aus Patientenserum

Sekundärantikörper gegen humanes IgG

Cy3 an Sekundärantikörper gekoppelt

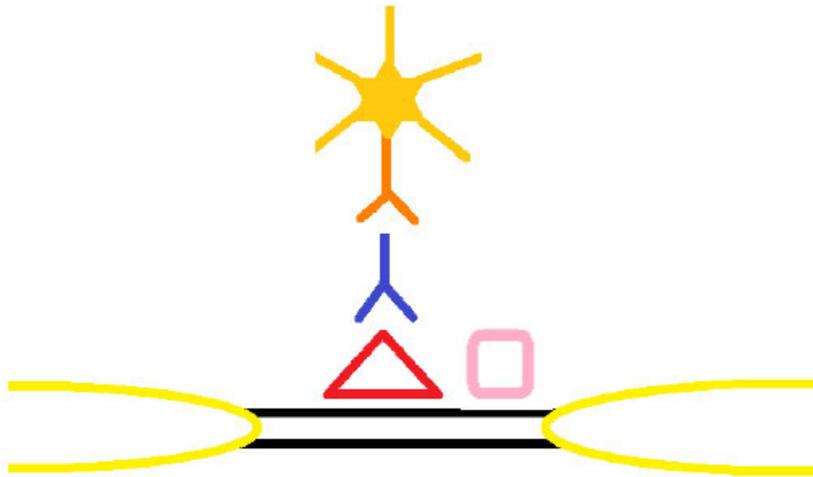


Abbildung 5: Prinzip der Bindungsassays an Zupfnerven

Am murinen Zupfnerv liegen Ranviersche Schnürringe frei. In der Abbildung sind die Myelinscheiden gelb und das Axon schwarz dargestellt. IgG-Autoantikörper gegen (para-)nodale Proteine aus dem Serum von PatientInnen (blau) des Ranvierschen Schnürringes binden an das Zielantigen (rot). Die Antikörper aus dem Serum von PatientInnen sind spezifisch gegen ihr jeweiliges Zielantigen gerichtet und binden nicht an andere Antigene (rosa). Ein Sekundärantikörper gegen humanes IgG (orange) bindet an das am Zielantigen gebundene IgG (blau). An den Sekundärantikörper ist Cy3 (sternförmiges orange) gekoppelt, das unter dem Fluoreszenzmikroskop als Fluoreszenzsignal detektiert werden kann.

Vor der Durchführung des eigentlichen Experimentes wurden die eingefrorenen Objektträger mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Die aufgetauten Objektträger wurden für zehn Minuten in Aceton bei -20 °C fixiert und anschließend für etwa zwei Minuten auf eine 38 °C warme Heizplatte gelegt, sodass das Aceton verdampfte. Die zerzupften Nerven auf dem Objektträger wurden mit *Liquid Blocker-Super PAP-Pen* umrandet und mit 0,1 M PBS gewaschen, welches direkt wieder abgetropft wurde. Anschließend wurde Blocklösung, welche unspezifische Bindungen vermindert, aufgebracht und die Objektträger wurden für eine Stunde in einer Holzkiste, die mit feuchtem Zellstoff ausgelegt worden war, belassen. Anschließend wurde die Blocklösung abgetropft und in Blocklösung verdünntes Serum in den Konzentrationen

1:100 sowie 1:500 aufgebracht. Bei jedem Experiment wurde auch eine Negativkontrolle in Form von Blocklösung ohne Serum sowie das Serum mindestens einer gesunden Kontrollperson getestet. Die Objektträger mit verdünntem Serum bzw. Blocklösung wurden über Nacht in der mit feuchtem Zellstoff ausgelegten Holzkiste bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger drei Mal in 0,1 M PBS gewaschen. Ein Cy3 gekoppelter Sekundärantikörper gegen humanes IgG (*CyTM3-konjugiertes AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)*) wurde in Blocklösung 1:100 verdünnt, auf die Objektträger aufgebracht und für eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Objektträger wiederum drei Mal in 0,1 M PBS gewaschen. Die Präparate wurden mit *VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI* eingedeckelt und mit *Covergrip Sealant* umrandet, um die Verdunstung des Eindeckmittels zu minimieren.

3.2.3 Mikroskopie der Zupfnervpräparate

Sobald die Präparate getrocknet waren oder spätestens innerhalb von sieben Tagen wurden die immunhistochemischen Färbungen unter dem *Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.M2* beurteilt. Die Beurteilung erfolgte verblindet. Als Referenz für unspezifische Bindung diente der Bindungsassay einer gesunden Kontrollperson. Bei unklarem Ergebnis oder mangelnder Beurteilbarkeit auf Grund einer zu geringen Anzahl frei liegender Ranvierscher Schnürringe, erfolgte eine Wiederholung des Bindungsassays.

3.3 Versuche mit HEK-293-Zellen

Alle Arbeiten an vitalen HEK-293 Zellen, bei denen die Zellen direkt der Luft exponiert waren, erfolgten unter sterilen Bedingungen unter der *Sterilbank Heraeus HS 18*. Alle verwendeten Lösungen setzten sich aus sterilen Substanzen zusammen oder wurden mit Hilfe von *Rapid-Flow Bottle Top Filtern* steril filtriert. Die vitalen Zellen wurden im *Inkubator Heracell* bei 5 % CO₂ aufbewahrt.

3.3.1 Zellkultur von HEK-293-Zellen

Da sich die HEK-293-Zellen kontinuierlich teilten, erfolgte zweimal wöchentlich ein Aufteilen und erneutes Aussäen der Zellen, das im Wechsel mit der Promovendin Anna-Michelle Brunder und der Medizinisch-Technischen Assistentin Barbara Reuter durchgeführt wurde. Nach 15-25 Passagen wurden die Zellen durch neue ersetzt.

Für das Splitting der HEK-293-Zellen wurden die Zellen zunächst vorsichtig in *Dulbecco's PBS (DPBS)* gewaschen. Anschließend wurde *Trypsin-EDTA (0.05 %)*, *phenol red* zugegeben und die Zellen für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellverbände aufzulösen und die Adhärenz der Zellen an der Oberfläche der *CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 75 cm²* aufzuheben. Es wurden 10 ml HEK-Medium direkt auf die Zellen pipettiert, um die HEK-293-Zellen abzulösen. Das Medium mit den abgelösten Zellen wurde abgenommen und für fünf Minuten bei 800 rpm mit Hilfe der *Zentrifuge Megafuge 1.0 R* zentrifugiert. Anschließend wurde der Mediumüberstand verworfen und das Zellpellet in HEK-Medium mit Hilfe einer sterilen 20 ml Pipette durch sanftes Auf- und Abpipettieren wieder resuspendiert.

10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl *Trypan Blue solution 0.4 %* vermischt, wovon 10 µl in die *Zählkammer Neubauer Improved* gegeben und mit Hilfe des *Zellkulturmikroskopes CKX53* ausgezählt wurden. Es wurde berechnet, wie viel HEK-Zellmedium zu welcher Menge an Zellsuspension gegeben werden muss, um die gewünschte Zahl an HEK-293-Zellen zu erreichen. Für eine 75 cm² Zellkulturflasche wurden circa 2 Millionen Zellen gelöst in 10 ml HEK-Medium ausgesät. Wurden die Zellen direkt benötigt, konnten Sie auch auf mit PDL beschichteten Coverslips ausgesät werden.

3.3.2 Transfektion von HEK-293-Zellen

In die einzelnen Wells einer *Nunclon™ Delta Surface 24 Well Platte* wurden Coverslips (*Cover Slips, 12 mm dia*) eingelegt. Für eine bessere Adhärenz der Zellen wurden die Coverslips mit PDL beschichtet, wofür je Well 150 µl PDL-Lösung vorsichtig aufgebracht und die Platte für eine Stunde bei 37 °C inkubiert wurde. Hierbei war es wichtig möglichst vorsichtig vorzugehen, um ein Verlaufen der PDL-Lösung und damit eine unzureichende Beschichtung der Coverslips zu verhindern. Anschließend wurden die Coverslips zweimal mit destilliertem sterilem Wasser gewaschen und über Nacht in der *Sterilbank Heraeus HS 18* getrocknet. Wurden die Coverslips erst später benötigt konnten sie auch für einige Tage bei 4 °C lichtgeschützt gelagert werden.

Für das Aussäen der HEK-293-Zellen wurden pro Well circa 30.000 Zellen in 200 µl HEK-Medium suspendiert aufgebracht. Die HEK-293-Zellen wurden für circa 24 Stunden im *Inkubator Heracell* inkubiert. Hier war es wiederum relevant darauf zu

achten, dass die aufgebrauchte Zellsuspension auf dem Coverslip verblieb und nicht verlief, da ansonsten die Zelldichte auf dem Coverslip mit verlaufener Zellsuspension geringer gewesen wäre.

Nach etwa 24 Stunden erfolgte die Transfektion der Zellen über die Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode. Die DNA bindet hierbei an ausfallende Kristalle und wird über Endozytose in die zu transfizierenden Zellen aufgenommen. Die Transfektion erfolgte entweder mit Contactin-1-, mit Neurofascin-155- oder mit Neurofascin-186-DNA. Green-Fluorescent-Protein diente als Positivkontrolle, die eine erfolgreiche Transfektion anzeigte. Die Plasmide für humanes Neurofascin-155 sowie Neurofascin-186 wurden unserem Labor freundlicherweise durch unsere Kooperationspartner Judy Ng, PhD, und Prof. Dr. Edgar Meinel (Ng et al., 2012), DNA-Plasmide für Contactin-1 durch Prof. Elijor Peles (Peles et al., 1995) und Sulayman D. Dib-Hajj, PhD, sowie Prof. Stephen G. Waxman (Liu et al., 2001) überlassen. Die Vermehrung der DNA-Plasmide wurde im Labor von Prof. Dr. Carmen Villmann durchgeführt.

Für den Erfolg der Transfektion war auch die korrekte Reihenfolge bei der Zugabe der Reagenzien relevant. Zunächst wurde die jeweilige DNA in der Endkonzentration 1 µg/ml zu 44 % 0,1x TE-Puffer gegeben und 5 % 2,5 M CaCl₂ hinzugefügt. Dann wurde tröpfchenweise 50 % 2x HBS-Puffer hinzugegeben. Durch leichtes Klopfen wurde die Lösung vorsichtig vermischt und anschließend für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation zeigte sich eine Trübung durch die Bildung von Präzipitaten.

Pro Well wurden 50 µl der Lösung tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und die Zellen über Nacht bei 37 °C sowie 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag konnten die Zellen für Bindungsassays oder Präinkubationsversuche verwendet werden.

3.3.3 Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen

Wenn Seren von PatientInnen Auffälligkeiten in den Bindungsassays an Zupfnerven oder im ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) zeigten, wurden Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen als Bestätigungstest durchgeführt. Zeigte sich bei der Auswertung eine Bindung der Seren an Neurofascin-155 oder Neurofascin-186 transfizierten HEK-293 Zellen, während das Serum keine Bindung an Contactin-1 transfizierten HEK-293-Zellen zeigte, so konnte das Vorhandensein spezifischer

Autoantikörper gegen Neurofascin-155 bzw. Neurofascin-186 bestätigt werden. Als Negativkontrolle wurden jeweils auch Bindungsassays mit den Seren gesunder Kontrollpersonen durchgeführt.

Am Folgetag der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 20 Minuten mit 200 µl 4 % PFA je Well fixiert. Anschließend erfolgte dreimal ein Waschschrift mit PBS für jeweils fünf Minuten. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde für 20 Minuten 10 % BSA/PBS aufgebracht und anschließend für fünf Minuten mit 1 % BSA/PBS gewaschen.

Der Primärantikörper wurde in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Primärantikörper diente Serum von PatientInnen bzw. gesunden Kontrollen, das jeweils in den Verdünnungen 1:100 sowie 1:500 eingesetzt wurde. Für die Positivkontrolle, die eine erfolgreiche Transfektion bestätigte, wurde als Primärantikörper *Anti-Contactin-1 antibody, monoclonal mouse anti-human/rat/mouse* (bzw. bei Nichtlieferbarkeit *Human/Mouse/Rat Contactin-1 Antibody, Antigen Affinity-purified, polyclonal Goat IgG*, welcher sich im direkten Vergleich gleichwertig zeigte) in der Verdünnung 1:200 auf Contactin-1 transfizierte Zellen und *Human/ Mouse/ Rat Neurofascin Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Chicken IgY* in der Konzentration 1:1000 auf Neurofascin-155 bzw. Neurofascin-186 transfizierte Zellen aufgebracht.

Am Folgetag wurde zunächst der Primärantikörper abgesaugt. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit PBS für jeweils fünf Minuten. Danach wurden die entsprechenden Sekundärantikörper jeweils in der Verdünnung 1:300 aufgebracht. Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln, da Cy3 bzw. Alexa-Fluor gekoppelte Antikörper lichtempfindlich sind. Auf die zuvor mit Serum inkubierten Zellen wurde *CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)* aufgebracht. Auf die Contactin-1 Positivkontrollen wurde *CyTM3-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG (H+L)* bzw. bei Verwendung des Goat-Primärantikörpers *CyTM3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)* gegeben. Im direkten Vergleich der beiden Antikörperkombinationen zeigten sich diese gleichwertig. Auf die Neurofascin Positivkontrollen wurde *Alexa-Fluor 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Chicken IgY (H+L)* gegeben.

Nach der Inkubation der Sekundärantikörper erfolgten drei Waschschriffe für jeweils fünf Minuten in PBS. Anschließend wurden die Coverslips mit Hilfe des Eindeckmittels *Mowiol*®, dem 0,1 % *DAPI* zugesetzt worden war, auf Objektträgern eingedeckelt.

Die Auswertung der HEK-293-Bindungsassays erfolgte mit Hilfe des *Fluoreszenzmikroskopes Axio Imager.M2*. Beim Vorliegen von Neurofascin-155- bzw. Neurofascin-186-Autoantikörpern zeigte sich eine Bindung an die mit der jeweiligen Neurofascin-DNA transfizierten Zellen. Da teilweise auch viel Hintergrund und unspezifische Bindung sichtbar waren, erfolgte im Vergleich jeweils die Beurteilung der Negativkontrolle mit Seren gesunder Kontrollpersonen. Falls die Präparate auf Grund zu geringer Zahl an Zellen, zu geringer Transfektionsrate oder zu ausgeprägter unspezifischer Bindung nicht beurteilbar waren, erfolgte eine Wiederholung der Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen.

3.3.4 Präinkubationsversuche an HEK-293-Zellen

Autoantikörper gegen Neurofascin-155 bzw. Neurofascin-186 binden an die mit der entsprechenden DNA transfizierten HEK-293-Zellen, sodass der verbleibende Überstand nach Präinkubation eine deutlich geringere Konzentration an Autoantikörpern zeigt. Bei Spezifität der Autoantikörper erfolgt hingegen keine Bindung der Neurofascin-Autoantikörper an die mit Contactin-1 DNA transfizierten HEK-293-Zellen, sodass sich die Konzentration an Neurofascin-Autoantikörper durch die Präinkubation an Contactin-1 transfizierten HEK-293-Zellen nicht verändert.

Die Zellkultur und Transfektion der HEK-293-Zellen erfolgte wie in den vorausgehenden Kapiteln bereits beschrieben. Am Folgetag der Transfektion wurden die Zellen einmal mit HEK-Medium für fünf Minuten gewaschen und mit frischem HEK-Medium für einen weiteren Tag inkubiert, bevor die Präinkubation der Seren durchgeführt wurde.

Das Serum der Patienten mit Neurofascin-Autoantikörpern sowie Serum einer gesunden Kontrollperson wurden 1:100 verdünnt. Für das Serum, dessen Überstand für Bindungsassays an Zupfnerven verwendet werden sollte, wurde für die Verdünnung Blocklösung für Zupfnerven verwendet. Das Serum, dessen Überstand anschließend im ELISA getestet werden sollte, wurde allerdings in 2 % BSA/PBS verdünnt. Es wurde 2 % BSA/PBS statt ELISA-Blocklösung verwendet, da sich mit ELISA Blocklösung weniger

ausgeprägte Ergebnisse zeigten. Die Ursache für diese Beobachtung war vermutlich der schädigende Einfluss des *Tween*® 20 auf die HEK-293-Zellen.

Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und es wurden je 300 µl des verdünnten Serums der PatientIn bzw. einer gesunden Kontrolle auf je ein mit Neurofascin-155, Neurofascin-186 und Contactin-1 transfiziertes Well aufgebracht. Auf den Wells, die erst später verwendet wurden, verblieb HEK-Medium, um sie vor Austrocknung zu schützen. Das Serum wurde für eine Stunde belassen und der Überstand dann auf ein weiteres Well pipettiert, dessen HEK-293-Zellen jeweils wieder mit der gleichen DNA wie das vorherige Well transfiziert worden waren. Nach einer weiteren Stunde wurde der Überstand auf ein weiteres Well übertragen, sodass das Serum insgesamt an drei Wells jeweils für eine Stunde präinkubiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen und in beschrifteten Gefäßen für eine Nacht bei 4 °C gelagert.

Der Überstand des Präinkubationsversuches wurde dann mit Hilfe eines Bindungsassays am Ischiadicuszupfnerv wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben sowie mit Hilfe eines Neurofascin-155- sowie Neurofascin-186-ELISAs wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben getestet. Es wurde als Beleg für die Spezifität der Neurofascin-Autoantikörper angesehen, wenn die Neurofascin-Autoantikörper bei Präinkubation an mit Contactin-1-DNA transfizierten HEK-293-Zellen im Vergleich zum unbehandelten Serum der gleichen Konzentration in der gleichen Lösung unverändert nachweisbar waren, während die jeweiligen Autoantikörper gegen die zwei Isoformen von Neurofascin nach Präinkubation an mit Neurofascin-155 bzw. Neurofascin-186 transfizierten HEK-293-Zellen vermindert waren.

3.4 ELISA-Untersuchungen

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) dient zur Detektion von Antikörpern über eine enzymatisch vermittelte Farbreaktion. ELISAs wurden mit Hilfe von Protokollen, die bereits in unserem Labor etabliert waren, durchgeführt.

Im ELISA wurde auf das Vorliegen von Antikörpern gegen Contactin-1 sowie Neurofascin-155 gescreent. Die Patienten, bei denen sich in den Bindungsassays an Zupfnerven eine (para-)nodale Bindung zeigte, wurden im ELISA auch auf Neurofascin-186 getestet.

3.4.1 Proteinbeschichtung von ELISA-Platten

Die ELISA-Platten (*Nunc-Immuno Plate F96 Maxisorp*) wurden mit Protein beschichtet, indem eine Lösung des Proteins über Nacht, also für mindestens zwölf Stunden, bei 4 °C in den für den ELISA benötigten Wells belassen wurde. Zwei Wells, die als proteinfreie Negativkontrolle dienten, blieben ohne Proteinlösung.

Contactin-1 (*Recombinant human CNTN1/ Contactin-1 protein*) wurde hierfür in Carbonatpuffer auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt. Die Neurofascinproteine wurden in PBS verdünnt. Neurofascin-155 sowie Neurofascin-186 (*Full-length human neurofascin-155 bzw. 186 protein*) wurden in der Endkonzentration 5 µg/ml und Neurofascin-140 (*Recombinant human NF-140 protein*) in der Endkonzentration 1 µg/ml verwendet.

3.4.2 Durchführung ELISA

Zunächst wurden die einzelnen Wells zweimal mit PBS gewaschen und über Zellstoff ausgeklopft, um überständiges nicht gebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurden pro Well 200 µl ELISA-Blocklösung aufgebracht, um unspezifische Bindungen zu vermindern. Die ELISA-Platte wurde für eine Stunde unter leichter Agitation bei 37 °C inkubiert. Es wurde zweimal mit einem Waschpuffer bestehend aus PBS sowie Tween gewaschen und die Platte über Zellstoff ausgeklopft, um überständigen Waschpuffer zu entfernen und so einen Verdünnungseffekt zu vermeiden.

Im Anschluss daran wurden 100 µl des Primär-Antikörpers in ELISA-Blocklösung verdünnt aufgebracht. Serum von PatientInnen sowie gesunden Kontrollpersonen wurde in der Konzentration 1:100 verwendet und jeweils in vier Wells pro Probe aufgebracht. Als Positivkontrolle diente ein kommerzieller Antikörper gegen Neurofascin in der Konzentration 1:1.000 (*Human/ Mouse/ Rat Neurofascin Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Chicken IgY*) oder gegen Contactin-1 in der Konzentration 1:200 (*Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/ rat/ mouse bzw. bei Nichtlieferbarkeit Human/Mouse/Rat Contactin-1 Antibody, Antigen Affinity-purified, polyclonal Goat IgG*). In vier als Negativkontrolle vorgesehene Wells sowie in zwei nicht mit Protein beschichtete Wells wurde Blocklösung aufgebracht. Die ELISA-Platte wurde wieder für eine Stunde unter leichter Agitation bei 37 °C inkubiert.

Die Platte wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen und jeweils gut ausgeklopft, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurden 100 µl des an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpers in ELISA-Blocklösung verdünnt aufgebracht, um gebundene Primärantikörper zu detektieren. Als Sekundärantikörper gegen humanes IgG wurde *Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG* in der Konzentration 1:10.000 verwendet und gegen humanes IgM wurde *Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM* in der Konzentration 1:7.000 eingesetzt. Für die Neurofascin-Positivkontrolle wurde *Goat anti-Chicken IgY (H+L)* in der Endkonzentration 1:10.000 und für die Contactin-1-Positivkontrolle *Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey anti-Mouse IgG (H+L)* aufgebracht. Wenn auf Grund von Lieferproblemen der Primärantikörper *Human/Mouse/Rat Contactin-1 Antibody, Antigen Affinity-purified, polyclonal Goat IgG* eingesetzt wurde, wurde der entsprechende Sekundärantikörper *Donkey Anti-Goat IgG (H&L)* verwendet. Ein direkter Vergleich der jeweiligen Antikörperkombination zeigte vergleichbare Werte.

Die Platte wurde unter leichter Agitation für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Platte wurde viermal gewaschen und gut ausgeklopft, um nicht gebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Pro Well wurden 100 µl der Tetramethylbenzidinlösung (TMB) aufgebracht und die Platte im Dunkeln inkubiert. Die an die Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase führte zu einer Oxidation der *TMB Substrate Solution 1x*, sodass ein blauer Farbstoff entstand. Die Reaktion wurde nach genau 15 Minuten Inkubation in Dunkelheit durch die Zugabe von 50 µl Schwefelsäure *1M H2SO4 (2N)* je Well gestoppt, wobei der blaue Farbstoff in einen gelben Farbkomplex umgewandelt wurde. Die optische Dichte wurde im *Multiscan FC ELISA Reader* bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm bestimmt.

3.4.3 Auswertung ELISA

Der Grenzwert der optischen Dichte, ab dem eine optische Dichte als Nachweis für Autoantikörper angesehen wurde, wurde als fünffache Standardabweichung der optischen Dichte über dem Durchschnittswert gesunder Kontrollen festgesetzt, wobei der Großteil der Kontrollwerte bereits in der Dissertationsarbeit von Dr. Luise Appeltshauer ermittelt worden waren (Appeltshauer, 2018).

Pro PatientIn bzw. gesunder Kontrolle wurde jeweils ein Duplet für IgG- und für IgM-Autoantikörper getestet. Mit Hilfe von Excel wurde jeweils der Mittelwert des Duplets gebildet. Davon wurde der Mittelwert des Duplets der Negativkontrolle, bei welcher statt eines Primärantikörpers lediglich Blocklösung zugegeben worden war und als Sekundärantikörper der jeweilige Sekundärantikörper gegen humanes IgG bzw. IgM verwendet worden war, subtrahiert. Dieses Ergebnis sollte vergleichbare optische Dichten gewährleisten aus denen der Effekt unspezifischer Bindungen herausgerechnet wurde. Sofern sich bei der Auswertung negative Werte ergaben, wurden diese als 0 angegeben.

3.4.4 Bestimmung des Titers

Bei PatientInnen, bei denen die optische Dichte oberhalb des Schwellenwertes lag, wurde der Titer des Autoantikörpers bestimmt. Hierfür wurden bei IgG-Autoantikörpern neben 1:100 auch die Verdünnungen 1:200, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:3.000, 1:4.000, 1:6.000, 1:8.000 sowie 1:10.000 getestet. Für IgM-Autoantikörper wurden neben 1:100 auch die Verdünnungen 1:200, 1:400, 1:800 sowie 1:1.200 getestet. Der Titer wurde durch die größte Verdünnung festgelegt, bei der die optische Dichte oberhalb des Grenzwertes lag.

3.4.5 Bestimmung der IgG-Subklasse

Bei den beiden Patienten mit nachgewiesenen Neurofascin-IgG-Autoantikörpern erfolgte eine Bestimmung der überwiegend vorhandenen IgG-Subklassen. Hierfür wurde ein ELISA wie bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden subklassenspezifische HRP gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt. Für die Detektion von IgG1 wurde *Mouse anti-Human IgG1 Fc Secondary Antibody* in der Konzentration 1:1.000, für IgG2 *Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody to Human IgG2* in der Konzentration 1:4.000, für IgG3 *Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody to Human IgG3* in der Konzentration 1:3.000 und für IgG4 *Mouse anti-Human IgG4 Fc Secondary Antibody* in der Konzentration 1:2.000 verwendet. Von dem Mittelwert der optischen Dichten des Duplets der jeweiligen Subklasse wurden die optischen Dichten der Negativkontrolle des jeweiligen Sekundärantikörpers subtrahiert. Diese Werte der unterschiedlichen Subklassen wurden verglichen. Aus diesem Vergleich konnte gefolgert werden, welche IgG-Subklassen überwiegend in dem getesteten Serum vorhanden waren.

3.4.6 Präinkubation von Neurofascin-155-IgM Seren an ELISA-Platten

Bei PatientInnen mit nachgewiesenen Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern erfolgte eine Präinkubation an mit Protein beschichteten ELISA-Platten, um die Spezifität der Autoantikörper zu untersuchen. Die Spezifität von Neurofascin-IgG-Autoantikörpern wurde durch Präinkubation der Seren an transfizierten HEK-Zellen nachgewiesen. Jedoch war die Präinkubation an HEK-Zellen für IgM-Autoantikörper nicht möglich, da IgM-Autoantikörper keine Bindung an HEK-Zellen zeigten.

Die Proteinbeschichtung der Platten mit Neurofascin-155 bzw. Contactin-1-Protein erfolgte nach der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Methodik. Die ELISA-Platten wurden für eine Stunde mit Blocklösung inkubiert und wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben gewaschen.

Es wurden jeweils Duplets des Serums der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM Autoantikörper sowie des Serums einer gesunden Kontrolle in der Verdünnung 1:100 getestet. Die Präinkubation erfolgte entweder an mit Neurofascin-155-Protein oder an mit Contactin-1-Protein beschichteten Platten, um einen unspezifischen Bindungseffekt auszuschließen. 200 µl des verdünnten Serums wurden jeweils für eine Stunde auf einem mit Protein beschichteten Well belassen. Der Überstand wurde auf ein anderes mit Protein beschichtetes Well, das zuvor durch Blocklösung vor Austrocknung geschützt wurde, übertragen. Dieser Schritt wurde insgesamt sechsmal wiederholt.

In der folgenden Abbildung 6 wird die Durchführung der Präinkubation an ELISA-Platten schematisch dargestellt.

Legende:

Patientenserum, Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper in Patientenserum

Beschichtung Neurofascin-155-Protein an ELISA-Well, Beschichtung Contactin-1-Protein an ELISA-Well

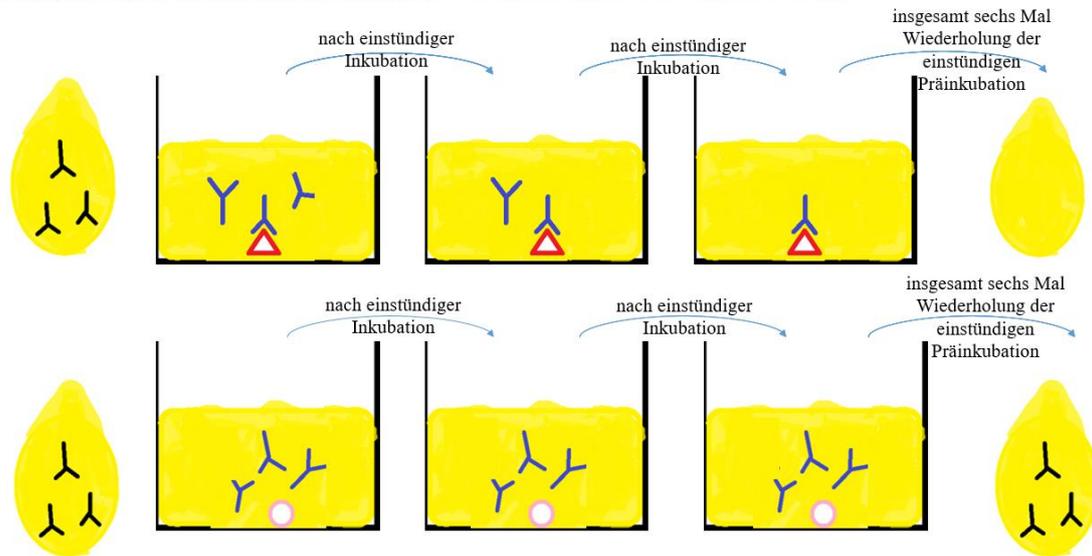


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Präinkubation an ELISA Platten

Seren von PatientInnen (gelb) mit enthaltenen Neurofascin-155-Autoantikörpern (blau) wurden auf mit Protein beschichtete ELISA-Platten aufgebracht. Neurofascin-155-Protein ist in der Graphik rot und Contactin-1-Protein rosa dargestellt. Nach einstündiger Inkubation wurde das Serum jeweils auf das nächste mit Contactin-1 bzw. Neurofascin-155 beschichtete Well gegeben. Dieser Schritt wurde sechs Mal wiederholt.

Bei Spezifität der Neurofascin-155-Autoantikörper banden die Antikörper an das Neurofascin-Protein, sodass nach Präinkubation an Neurofascin-155 beschichteten Platten die Autoantikörperkonzentration durch jeden Präinkubationsschritt vermindert wurde. An das Contactin-1 Protein banden die Neurofascin-155-Autoantikörper bei Spezifität der Autoantikörper hingegen nicht, sodass sich die Autoantikörperkonzentration der Neurofascin-155-Autoantikörper durch die Präinkubation an mit Contactin-1 beschichteten ELISA-Platten nicht veränderte.

Anschließend wurde ein Neurofascin-ELISA wie bereits beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Hierfür wurde der Überstand aus der seriellen Präinkubation an mit Neurofascin-155 beschichteten Platten, der Überstand aus der seriellen Präinkubation an mit Contactin-1 beschichteten Platten sowie als Kontrolle nicht präinkubiertes Serum in der Verdünnung 1:100 eingesetzt. Die jeweiligen ELISA-Werte wurden anschließend verglichen.

Zeigte sich im Überstand nach der Präinkubation an den Neurofascin-155 beschichteten Platten im ELISA ein deutlicher Abfall des ELISA-Wertes, während der Überstand an den Contactin-1 beschichteten Platten nach der Präinkubation in vergleichbarem Maße wie das nicht präinkubierte Serum weiterhin deutlich über den ELISA-Grenzwert hinaus erhöht waren, so wurde daraus auf eine Spezifität der Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper geschlossen.

3.5 ELISA-basierte Komplementbindungsassays mit C1q

Bei allen PatientInnen mit nachgewiesenen (para-)nodalen Autoantikörpern sowie bei gesunden Kontrollpersonen wurde das Komplementbindungsverhalten untersucht. Hierfür wurde C1q verwendet, das das erste Komplementprotein bei der Aktivierung des klassischen Weges im Komplementsystem darstellt. Der ELISA-basierte Komplementbindungsassay war im Promotionsprojekt von Dr. Luise Appeltshauer etabliert worden (Appeltshauer, 2018; Appeltshauer et al., 2017) und wurde über insgesamt drei Tage durchgeführt.

Eine Hälfte der ELISA-Platte (*Nunc-Immuno Plate F96 Maxisorp*) wurde mit Neurofascin-Protein beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die andere Hälfte blieb ohne Proteinbeschichtung und diente so als Negativkontrolle.

Am folgenden Tag wurde die Platte viermal mit ELISA-Waschpuffer, bestehend aus PBS und Tween gewaschen und über Zellstoffpapier gut ausgeklopft, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Anschließend wurden pro Well 200 µl ELISA-Blocklösung, bestehend aus PBS, BSA und Tween, aufgebracht und die Platte für zwei Stunden unter leichter Agitation bei 37 °C inkubiert, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Danach wurde die Platte wiederum viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft.

Anschließend wurden je Well 100 µl des Primärantikörpers verdünnt in ELISA-Blocklösung jeweils als Quadrupel sowohl auf der Neurofascin-Protein beschichteten als auch auf der nicht beschichteten Platte aufgebracht. Serum der PatientInnen bzw. der gesunden Kontrollpersonen wurde in der Verdünnung 1:20 eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde ELISA-Blocklösung eingesetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C.

Am darauffolgenden Tag wurde die ELISA-Platte sechsmal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und über Zellstoff gut ausgeklopft, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Der Komplementfaktor C1q (*Complement component C1q from human serum > 95 %*) wurde auf die Endkonzentration von 10 µg/ml in ELISA-Blocklösung verdünnt. Jeweils in ein Duplet aller getesteten Proben wurden 100 µl des verdünnten Komplementfaktors C1q gegeben, während das verbleibende Duplet mit Blocklösung

ohne Komplementfaktor aufgefüllt wurde. Dann erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur unter leichter Agitation. Anschließend wurde die Platte wiederum sechsmal gewaschen und über Zellstoff gut ausgeklopft, um nicht gebundenes C1q zu entfernen. Je Well wurden 100 µl des an HRP gekoppelten Sekundärantikörpers (*Anti-Complement C1q Antibody (HRP), polyclonal Sheep IgG*) 1:200 in ELISA-Blocklösung verdünnt aufgebracht. Der Sekundärantikörper gegen C1q wurde für 30 min bei Raumtemperatur unter leichter Agitation inkubiert. Danach wurde die Platte viermal gewaschen sowie gut ausgeklopft. Wurde C1q durch den Autoantikörper gebunden, so konnte dies über den HRP-gebundenen Sekundärantikörper und die dadurch bedingte Farbreaktion des chromogenen Substrates *TMB Substrate Solution 1x* detektiert werden. Die Enzymreaktion wurde nach exakt 15 minütiger Inkubation ohne Agitation im Dunkeln mittels Schwefelsäure 1M H₂SO₄ (2N) gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mittels des *Multiscan FC ELISA Readers* bei einer Wellenlänge von $\lambda=450$ nm. Bei der Auswertung wurde der Mittelwert der optischen Dichte des Duplets mit C1q Inkubation gebildet und davon der Mittelwert der optischen Dichte des Duplets ohne C1q Inkubation subtrahiert. Die Werte der PatientInnen wurden jeweils mit den Werten gesunder Kontrollpersonen verglichen.

3.6 Versuche mit murinen Neuronen

Es wurden Versuche mit cerebellären Neuronen, die von C57BL/6 Mäusen fünf Tage post natum entnommen wurden, sowie mit Spinalganglien, die aus Mäuseembryonen 13-15 Tage post conceptionem entnommen wurden, durchgeführt. Die Zellen wurden mit Seren von PatientInnen mit (Para-)nodopathien inkubiert, um deren Wirkung auf Neurone des peripheren sowie des zentralen Nervensystems zu untersuchen. Die PatientInnen mit Contactin-1-Autoantikörpern wurden von Dr. Luise Appeltshauser identifiziert (Appeltshauser, 2018; Doppler et al., 2015b).

3.6.1 Präparation und Zellkultur muriner cerebellärer Neurone

Die cerebellären Neurone wurden aus Mäusen entnommen, die fünf Tage postnatal durch Dekapitation mit Hilfe einer Schere getötet wurden. Um einzelne cerebelläre Neurone zu gewinnen wurde das *Papain Dissociation System* verwendet und für die Zellkultur wurden die Angaben des Herstellers Worthington Biochemical Corporation zur Gewinnung von cerebellären Körnerzellen befolgt. Die Präparationsmethode sowie die

Zellkultur wurden mit Hilfe eines Videos einer Publikation (Lee et al., 2009) erlernt, welches unter dem Link <https://www.jove.com/t/990/isolation-culture-post-natal-mouse-cerebellar-granule-neuron> eingesehen werden kann (zuletzt aufgerufen am 06.08.2020).

Die Köpfe wurden zunächst in einer sterile Präparationsschale (Nunclon™ Dish 35x10) in Präparationsmedium gegeben, das aus HBSS sowie 6 g/l D-(+)-Glucose bestand. Zunächst wurden mit Hilfe einer Pinzette die Haut sowie die Kalotte abgetragen. Anschließend wurde das Cerebellum vom restlichen Gehirn abgetrennt. Die Meningen sowie der Plexus choroideus wurden vorsichtig entfernt. Die Präparation erfolgte möglichst rasch, sodass möglichst viele der cerebellären Neurone vital blieben. Die Cerebella wurden für kurze Zeit im Präparationsmedium in *CELLSTAR® Tubes 50 ml* auf Eis aufbewahrt.

Für die Zellkultur wurden unter der *Sterilbank Heraeus HS 18* das Präparationsmedium abgenommen und Papain-Lösung, die sich aus Papain, L-Cystein, EDTA und DNase zusammensetzte, zugegeben. Hierfür wurden vor der Präparation 5 ml EBSS in die Papain-Phiole gegeben und diese zunächst für zehn Minuten bei 37 °C im *Inkubator Heracell* inkubiert, während alle zwei Minuten das Tube leicht geschwenkt wurde. Die Papain-Phiole wurde dann bis zum Verbrauch und für höchstens eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert. Bei Papain handelt es sich um ein Enzym, das für die Spaltung von Eiweißen sorgt und somit Zellverbände auflösen kann.

Die Cerebella wurden nach Zugabe der Papain-Lösung für 20 Minuten, bzw. bei einer Anzahl der Cerebella >acht für 30 Minuten, bei 37 °C inkubiert. Für die weiteren Arbeiten wurden mit FBS beschichtete Pipetten verwendet, damit möglichst wenige Zellen an der Pipettenoberfläche adhärirten. Hierfür wurde mit einer Pipette fünf Mal FBS auf- und abpipettiert.

Es wurde mit einer FBS beschichteten 1000 µl Pipette etwa zehn Mal tituiert, um die Zellen voneinander zu trennen. Dann wurde 60 Sekunden gewartet, bis sich die festen Bestandteile am Boden des Falcons absetzten. Die festen Bestandteile wurden verworfen. Der Überstand wurde mit Hilfe einer FBS beschichteten Pipette abgenommen und für fünf Minuten bei 200 xg zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde ein Resuspensionsmedium, bestehend aus 2,7 ml EBSS sowie 300 µl Ovomuroid-Inhibitor-

Albumin-Lösung und 150 µl DNase Lösung, vorbereitet. Das Zellpellet wurde mit Hilfe einer FBS beschichteten Pipette vorsichtig im Resuspensionsmedium gelöst.

Um die cerebellären Neurone von Membranfragmenten abzutrennen wurde ein Dichtegradient genutzt. Hierfür wurden 5 ml Ovomucoïd-Inhibitor-Albumin-Lösung in ein *CELLSTAR® 15 ml Tube* gegeben, worauf dann sehr vorsichtig tröpfchenweise die Zellsuspension gegeben wurde. Hierbei war es wichtig darauf zu achten, dass sich die beiden Lösungen nicht vermischten. Es wurde für sechs Minuten bei 70 xg zentrifugiert, wodurch die Zellen ein Pellet am Boden bildeten und die Membranfragmente im Überstand zurückblieben, der dann verworfen wurde.

Das Zellpellet wurde in 4 ml Neuronen-Medium, dem 10 % FBS sowie 50 µl DNase Lösung zugesetzt worden waren, gelöst. Die resuspendierte Zellsuspension wurde durch ein Nylon Mesh mit 70 µm großen Poren (*Cell Strainer, 70 µm Nylon*) filtriert, um größere nicht neuronale Zellen abzutrennen.

Um Astrozyten zu separieren, wurde ein Preplating an mit PDL beschichteten *Nunclon™ Dishes 35x10* durchgeführt. Die Astrozyten, die ein höheres Gewicht als die Körnerzellen besitzen, sanken hierbei auf die Oberfläche der Zellkulturschale ab, während die kleineren Körnerzellen in der Lösung verblieben, sodass durch das Preplating ein höherer Reinheitsgrad an Körnerzellen erreicht wurde. Die Zellkulturschalen waren zuvor für eine Stunde in PDL-Lösung belassen worden und anschließend mit *Aqua ad iniectabilia* dreimal gewaschen worden. Die mit PDL beschichteten Schalen konnten in steriler lichtdichter Verpackung mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Für das Preplating wurde die Zelllösung auf die mit PDL beschichtete Schale gegeben und für 20 Minuten bei 37 °C sowie 5 % CO₂ im *Inkubator Heracell* inkubiert. Nach 20 Minuten wurde sanft auf den Rand der Schale geklopft und der Überstand der Zellsuspension erneut auf eine mit PDL beschichtete Schale gegeben, die wie die vorherige Schale erneut 20 Minuten inkubiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen und bei 200 xg für fünf Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Neuronen-Medium resuspendiert.

10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl *Trypan Blue solution 0.4 %* vermischt und mit Hilfe der *Zählkammer Neubauer Improved* wurde die Konzentration der cerebellären

Neurone in der Zellsuspension ermittelt. Mit Neuronen-Medium wurde die Zellsuspension auf die für das jeweilige Experiment benötigte Dichte verdünnt. Das Aussäen der Zellen erfolgte für immunhistochemische Färbungen auf mit PDL sowie Laminin beschichteten Coverslips (*Coverslips 12 mm round, Poly-D-Lysine/Laminin Cellware*), die in *Nunclon™ Delta Surface 24 Well* Platten gelegt wurden, in der Konzentration 160.000 Zellen pro Well. Für Zytotoxizitätsassays wurden auf PDL beschichteten *Nunclon™ Delta Surface 96 Well* Platten 60.000 Zellen pro Well und für Lysate auf PDL beschichteten *Nunclon™ Dish 35x10* Schalen jeweils $2,0 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Die 96 Well Platte sowie die Zellkulturschalen waren zuvor über eine Stunde mit PDL beschichtet, anschließend dreimal mit *Aqua ad iniectabilia* gewaschen und über Nacht unter der Sterilbank Heraeus HS 18 getrocknet worden.

Die Zellen wurden im *Inkubator Heracell* bei 37 °C sowie 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel. Die weitere Verwendung der cerebellären Neurone wird in den Kapiteln 3.6.3 bis 3.6.6 beschrieben.

3.6.2 Präparation und Zellkultur muriner Spinalganglienneurone

Die Spinalganglienneurone wurden aus embryonalen C57BL/6 Mäusen 13-15 Tage post conceptionem entnommen.

Vor der Präparation wurde *Neurobasal Medium (1x)* im *Wasserbad WNB 7* auf 37 °C erwärmt. Die tragende Muttermaus wurde mittels cervikaler Dislokation unter Narkose mit Isofluran getötet und der N. ischiadicus nach der Spinalganglienenentnahme aus den Embryonen für die Herstellung von Zupfnervpräparaten verwendet. Mit Hilfe eines Skalpells wurde die Haut, das Peritoneum sowie der Uterus der Muttermaus eröffnet, die Embryonen dann mit einer Pinzette entnommen und in das vorgewärmte *Neurobasal Medium (1x)* in eine sterile Präparationsschale (*Nunclon™ Dish 35x10*) gegeben. Dort wurde der Kopf der Embryonen mit Hilfe einer Pinzette abgetrennt. Die Organe der Embryonen wurden mit der Pinzette entfernt. Die Wirbelkörper wurden abgelöst, indem jeweils rechts sowie links die Wirbelkörperspange mit der Pinzette durchtrennt wurde und die knöcherne Wirbelkörperspange dann entfernt wurde. Die Rückenmarksstränge, die mit den anhängenden Spinalganglien aus den Embryonen herausgelöst wurden, wurden in eine neue Präparationsschale mit frischem *Neurobasal Medium (1x)* gegeben. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die Spinalganglien vom Rückenmark abgetrennt und

das Rückenmark verworfen. Das *Neurobasal Medium (1x)* mit den darin schwimmenden Spinalganglien wurde in ein 15 ml *CELLSTAR® Tube* übertragen. Es wurde gewartet bis sich die Spinalganglien absetzten. Dann wurde so viel *Neurobasal Medium (1x)* abgenommen, sodass 1 ml Restvolumen verblieb, welchem 150 µl des Enzyms *Trypsin-EDTA (0.05 %)* zugesetzt wurden. Es erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C im *Wasserbad WNB 7*, um den Zellverband der Spinalganglienneurone aufzulösen. Die Reaktion des Trypsins wurde gestoppt, indem der Überstand abpipettiert und einmal mit *Neurobasal Medium (1x)* gewaschen wurde. Es wurde gewartet, bis sich die Spinalganglien am Boden absetzten, um dann den Überstand abzupipettieren, bis 1 ml Restvolumen verblieb. Die Spinalganglien wurden zehn Mal mit Hilfe einer *Glass Pasteur Pipette* titriert. Falls sich weiterhin makroskopisch sichtbare Bestandteile in der Zellsuspension befanden, konnte die Titrierung auch mit einer *Glass Pasteur Pipette* wiederholt werden, deren Öffnung zuvor mit Hilfe eines Bunsenbrenners (*Bunsenbrenner Gasprofi 1 SCS micro*) verkleinert worden war. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl *Trypan Blue solution 0.4 %* vermischt. Mit Hilfe der *Zählkammer Neubauer Improved* wurde die in der Suspension enthaltene Zellzahl ermittelt.

Die Zellsuspension wurde dann mit Neuronen-Medium sowie 10 % *Horse Serum* auf die gewünschte Zelldichte verdünnt. Für immunhistochemische Färbungen wurden 200 µl Zellsuspension mit 5.000 enthaltenen Zellen auf mit PDL sowie Laminin beschichtete Coverslips (*Coverslips 12 mm round, Poly-D-Lysine/Laminin Cellware*), die in *Nunclon™ Delta Surface 24 Well* Platten gelegt wurden, kuppelförmig ausgesät. Die Zellen wurden dann für eine Stunde bei 37 °C sowie 5 % CO₂ im *Inkubator Heracell* inkubiert. Hierbei musste besonders darauf geachtet werden, dass die kuppelförmigen Tropfen der Zellsuspension beim Transport nicht verliefen, da ansonsten die Zelldichte direkt auf den Coverslips geringer war. Nach einer Stunde wurden pro Well 1,5 ml Neuronen-Medium versetzt mit 2 % *Horse Serum* zugesetzt, sodass sich insgesamt 2 ml Medium in jedem Well befanden. Für Zytotoxizitätsassays wurde auf PDL beschichteten *Nunclon™ Delta Surface 96 Well Platten* 20.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden in den *Inkubator Heracell* gegeben, in dem die Zellen bei 37 °C sowie 5 % CO₂ inkubiert wurden. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel.

3.6.3 Bindungsassays mit Seren an murinen Neuronen

Es wurden sowohl Gesamt-IgG-Bindungsassays als auch subklassenspezifische Bindungsassays durchgeführt.

3.6.3.1 Gesamt-IgG-Bindungsassays mit Seren an murinen cerebellären Neuronen und murinen Spinalganglienneuronen

An cerebellären Neuronen sowie Spinalganglienneuronen wurden Gesamt-IgG-Bindungsassays mit Seren gesunder Kontrollen sowie mit Seren von PatientInnen, bei denen Autoantikörper gegen Proteine des Ranvierschen Schnürringes nachgewiesen worden waren, durchgeführt. Falls die Patientenantikörper aus dem Serum als Primärantikörper an die Neurone banden, konnte diese Bindung mit Hilfe eines Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpers unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die Neurone wurden drei Tage im *Inkubator Heracell* bei 37 °C sowie 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt und es erfolgte eine Fixation der Zellen für 20 Minuten in 4 % PFA. Anschließend wurden die Zellen drei Mal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Die fixierten Zellen konnten direkt weiterverarbeitet oder für bis zu sieben Tage bei 4 °C gelagert werden.

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Zellen zunächst für 20 Minuten mit 10 % BSA/PBS und anschließend für fünf Minuten in 1 % BSA/PBS geblockt. Die Lösung wurde abgenommen. Das Serum der PatientInnen bzw. gesunder Kontrollen wurde in PBS 1:500 verdünnt, die Proben auf ein Duplet von Neuronen aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Serum der PatientInnen mit (para-)nodalen IgG-Antikörpern fungierte dadurch als Primärantikörper.

Am folgenden Tag wurde das Serum abgenommen und die Zellen drei Mal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein Fluoreszenzantikörper gegen humanes IgG verwendet (*CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)*). Dieser wurde 1:300 in 2 % BSA/PBS verdünnt und für eine Stunde auf den Neuronen belassen. Anschließend wurden die Zellen drei Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Die Coverslips wurden mit Hilfe des Eindeckmittels Mowiol®, dem 0,1 % DAPI zugesetzt worden war, auf Objektträgern eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte verblindet mit Hilfe des *Fluoreszenzmikroskopes Axio Imager.M*, wobei stets Areale mit ähnlicher Zelldichte betrachtet und ein Bindungsassay mit Serum einer gesunden Kontrolle als Vergleich diente, um Effekte einer unspezifischen Bindung zu berücksichtigen.

3.6.3.2 Subklassenspezifische Bindungsassays an cerebellären murinen Neuronen

Mit den Seren der beiden CNTN-PatientInnen, bei denen durch Dr. Luise Appeltshauer Contactin-1-IgG-Autoantikörper nachgewiesen worden waren, sowie mit den Seren von zwei gesunden Kontrollpersonen wurden subklassenspezifische Bindungsassays an cerebellären murinen Neuronen durchgeführt.

Das Vorgehen entsprach grundsätzlich dem bereits beschriebenen bei den Gesamt-IgG-Bindungsassays. Das Serum als Primärantikörper wurde allerdings 1:250 in PBS und die Sekundärantikörper 1:200 in 2 % BSA /PBS verdünnt eingesetzt.

Als Sekundärantikörper gegen humanes IgG1 wurde *Mouse monoclonal [4E3] Secondary Antibody to Human IgG1- hinge heavy chain (FITC)*, gegen humanes IgG2 *Mouse monoclonal HP6014 antihuman IgG2 Fd gamma (FITC)*, gegen humanes IgG3 *Monoclonal anti-human IgG3-FITC antibody produced in mouse* und gegen humanes IgG4 *Mouse monoclonal HP6025 antihuman IgG4 Fc (FITC)* eingesetzt.

Da die FITC gekoppelten Sekundärantikörper sehr lichtempfindlich sind, war das Herstellen von Fotos für die Dokumentation deutlich erschwert, da die jeweils betrachtete Stelle unter dem Mikroskop rasch verblasste.

3.6.4 Inkubationsversuche mit murinen Neuronen

Es wurden Inkubationsversuche an cerebellären Neuronen sowie an Spinalganglienneuronen durchgeführt. Hierfür wurden dem Neuronen-Medium jeweils Seren von einer gesunden Kontrollperson sowie von zwei PatientInnen zugesetzt, bei denen durch Dr. Luise Appeltshauer Contactin-1-IgG-Autoantikörper jeweils überwiegend der Subklassen IgG3 bzw. IgG4 nachgewiesen worden waren (Appeltshauer, 2018; Doppler et al., 2015b). Anschließend erfolgten immunhistochemische Färbungen oder die Herstellung von Lysaten, mit denen Western

Blots durchgeführt wurden, um den Effekt der IgG3 bzw. IgG4 Contactin-1-IgG-Patientenantikörper auf die Expression der Proteine Neurofascin sowie Contactin-1 zu untersuchen. Auch für die Zytotoxizitätsassays wurden die Inkubationen entsprechend folgender Beschreibung durchgeführt. Die folgende Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die Inkubationsversuche mit murinen Neuronen und über die den Inkubationen folgenden Versuche.

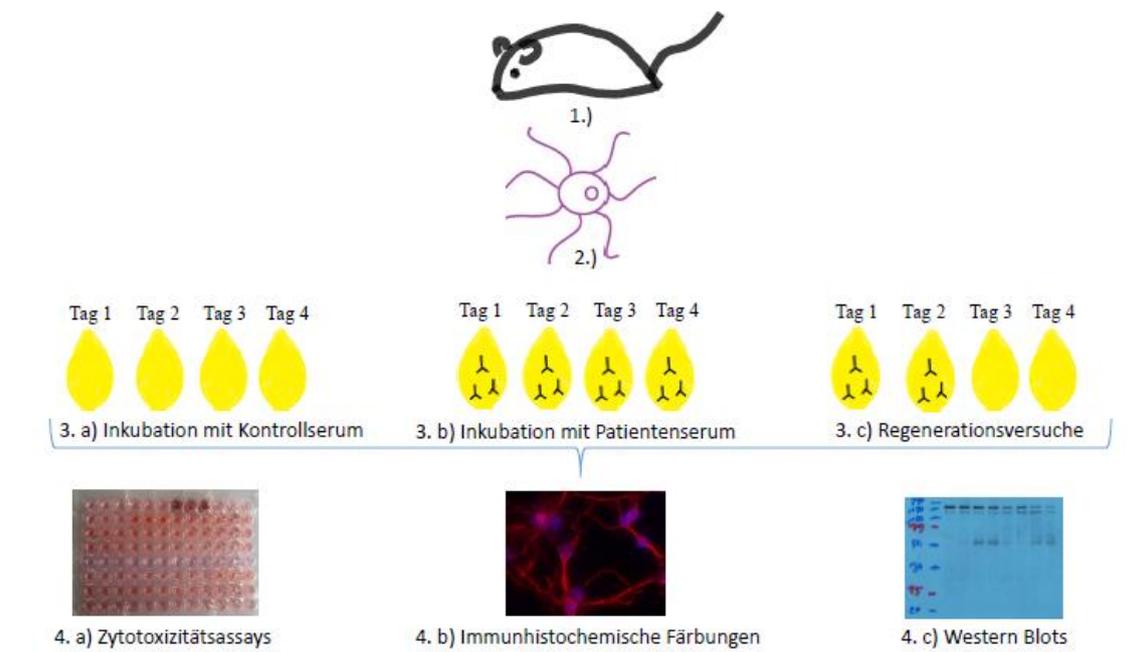


Abbildung 7: Übersicht über Inkubationsversuche

Legende

- 1.) Präparation von murinen Cerebella und Spinalganglien
- 2.) Zellkultur von murinen Neuronen
- 3.) Inkubationsversuche mit täglicher Zugabe von Serum
 3. a) Inkubationsversuche mit der Zugabe von Seren gesunder Kontrollpersonen
 3. b) Inkubationsversuche mit der Zugabe von Patientenserum, die Contactin-1-IgG-Autoantikörper enthalten
 3. c) Inkubationsversuche mit Regenerationsphase; zunächst zwei Tage Zugabe von Patientenserum mit Contactin-1-IgG-Autoantikörpern, dann zwei Tage Zugabe von Seren gesunder Kontrollpersonen
- 4.) Untersuchung des Effektes der Seren auf murine Neurone
 4. a) Zytotoxizitätsassays durch Messung von LDH im Überstand der Zellen
 4. b) Immunhistochemische Darstellung der Proteinexpression an fixierten Neuronen
 4. c) Western Blots zur Darstellung der Proteinexpression in Lysaten

Um den zeitabhängigen Effekt der Patientenantikörpereinwirkung zu untersuchen erfolgten Inkubationen für unterschiedliche Zeiträume. Spinalganglienneurone wurden

jeweils für einen und für zwei Tage inkubiert. Längere Inkubationszeiträume waren für Spinalganglienneurone nicht möglich, da die Zellen dann vermehrt spontan abstarben. Cerebelläre Neurone wurden für zwei, drei und vier Tage inkubiert.

Außerdem erfolgten Regenerationsversuche, bei denen dem Neuronen-Medium für zwei Tage Serum von PatientInnen mit Contactin-1-IgG-Autoantikörpern und anschließend für zwei Tage Serum einer gesunden Kontrolle zugegeben worden war. Diese Regenerationsversuche sollten untersuchen, ob der Effekt der Contactin-1-IgG-Patientenantikörper auf die Proteinexpression reversibel ist.

Die Inkubationsversuche mit dem Aufbringen von Serum begannen 24 Stunden nach Aussäen der Neurone. Das Neuronen-Medium wurde jeweils mit Hilfe des Wasserbades auf 37 °C angewärmt und Serum von PatientInnen bzw. Kontrollen in der Konzentration 1:100 zugegeben. Jeweils nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des mit Serum versetzten Neuronen-Mediums. 24 Stunden nach der letzten Zugabe erfolgte die Fixation der Zellen für immunhistochemische Färbungen bzw. die Herstellung von Lysaten für die Durchführung von Western Blots.

3.6.5 Immunhistochemische Färbungen von mit Seren inkubierten murinen Neuronen

Immunhistochemische Färbungen dienten zur Untersuchung der Expression der Proteine Neurofascin sowie Contactin-1, nachdem diese zuvor durch Inkubationsversuche dem Einfluss von Seren ausgesetzt worden waren. Außerdem erfolgten Färbungen auf Beta-III-Tubulin, um die gesamten Neurone darzustellen. Es wurde jeweils ein Duplet mit dem jeweiligen Serum verwendet und die Versuche wurden jeweils mindestens zweimal wiederholt.

24 Stunden nach der letzten Inkubation wurde das Neuronen-Medium abgesaugt. Die Neurone wurden kurz in DPBS gewaschen und die Zellen für 20 Minuten in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal für fünf Minuten in DPBS gewaschen. Die Zellen konnten dann entweder direkt gefärbt oder für bis zu sieben Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Um unspezifische Bindungen zu minimieren wurde zunächst für 20 Minuten mit 10 % BSA/PBS und anschließend für fünf Minuten in 1 % BSA/PBS geblockt. Anschließend

wurde der Primärantikörper in DPBS verdünnt aufgebracht. Für Färbungen von Contactin-1 wurde *Human/Mouse/Rat Contactin-1 Antibody, Antigen Affinity-purified, polyclonal Goat IgG* in der Verdünnung 1:2.000 verwendet. Für Färbungen von Neurofascin wurde *Human/ Mouse/ Rat Neurofascin Antibody, Antigen Affinity-purified Polyclonal Chicken IgY* in der Verdünnung 1:1.000 verwendet. Für Färbungen von Beta-III-Tubulin wurde *Anti-Beta III Tubulin antibody, polyclonal chicken anti-human/ rat/ mouse* in der Verdünnung 1:500 verwendet. Es wurden jeweils 250 µl des Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen jeweils drei Mal für fünf Minuten mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden jeweils 250 µl des korrespondierenden Sekundärantikörpers 1:300 in 2 % BSA/PBS verdünnt für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, da die fluoreszenzgekoppelten Antikörper sehr lichtempfindlich sind. Für die Färbung von Contactin-1-Protein wurde *CyTM3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)*, für die Färbung von Neurofascin-Protein sowie Beta-III-Tubulin *CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)* verwendet. Dann wurden die Zellen wiederum drei Mal für fünf Minuten mit DPBS gewaschen. Die Coverslips wurden dann mit Hilfe des Eindeckmittels *Mowiol®*, dem 0,1 % DAPI zugesetzt worden war, auf Objektträgern eingedeckelt.

Die Beurteilung der Proteinexpression erfolgte verblindet mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops *Axio Imager.M*, wobei immer darauf geachtet wurde ein für das jeweilige Präparat repräsentatives Areal für die Dokumentation mittels Foto zu verwenden. Es wurden jeweils Färbungen verglichen, die für denselben Zeitraum mit den unterschiedlichen Seren inkubiert worden waren. Bei den Regenerationsversuchen wurden die Färbungen, die über vier Tage mit Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern enthaltenden Seren inkubiert worden waren, mit den Färbungen verglichen, welche nur für zwei Tage mit Patientenserum und dann für zwei Tage mit Kontrollserum inkubiert worden waren. Letztere wurden auch mit den Färbungen der Zellen verglichen, die für zwei Tage mit Patientenserum inkubiert und dann bereits fixiert worden waren.

3.6.6 Lysate von mit Seren inkubierten murinen Neuronen

Für die Herstellung von Lysaten wurden jeweils $2,0 \times 10^6$ cerebelläre Neurone in *Nunclon™ Dish 35x10* Schalen ausgesät und anschließend wie in Kapitel 3.6.4

beschrieben mit Seren inkubiert. Mit Spinalganglienneuronen konnte die Herstellung von Lysaten nicht etabliert werden, da die Zellzahl der Spinalganglienneurone, welche aus embryonalen C57BL/6 Mäusen gewonnen werden konnte, nicht ausreichte, um im Lysat eine ausreichende Menge an Protein für die Durchführung eines Western Blots nachzuweisen.

Um den Abbau an Protein durch bei der Lyse freigesetzte Proteasen zu minimieren, wurden DPBS eisgekühlt und auf 4 °C gekühltes *CytoBuster Protein Extraction Reagent* verwendet. Darüberhinaus wurde auf eine zügige Arbeitsweise geachtet. 24 Stunden nach der letzten Inkubation wurden die Zellen kurz in DPBS gewaschen, welches vollständig wieder abgenommen wurde. Es wurden je Schale 300 µl *CytoBuster Protein Extraction Reagent* sowie 12 µl der Proteaseinhibitor-Lösung hinzugegeben und die Schalen anschließend für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Zellschaber eingesetzt (*Cell Scraper 25cm*), um das gesamte Lysat inklusive der noch adhären den Bestandteile von der Schale abzulösen. Das Lysat wurde abpipettiert und dann bei 4 °C sowie 16.000 g für fünf Minuten in der *Centrifuge 5415 R* zentrifugiert.

Das Pellet aus festen Zellbestandteilen wurde verworfen. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und bei -80 °C bis zur Durchführung eines Western Blots aufbewahrt.

3.6.7 Zytotoxizitätsassays an inkubierten murinen Neuronen

Zytotoxizitätsassays wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob Contactin-1-IgG-Patientenantikörper zum Absterben von cerebellären Neuronen bzw. Spinalganglienneuronen führen. Als quantitatives Maß für die Zytotoxizität diente die Aktivität des Enzymes LDH, welches bei Zellschädigung freigesetzt wird, im Überstand von inkubierten Zellen. Zur quantitativen Detektion von LDH wurde der *Cytotoxicity Detection Kit* verwendet. Das *Cytotoxicity Detection Kit* arbeitet laut dem Hersteller Sigma-Aldrich nach folgendem Prinzip: Die LDH-Aktivität katalysiert die Umwandlung von Lactat zu Pyruvat, wobei NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert wird. Der in der Reaktionslösung enthaltene Katalysator Diaphorase überträgt H/H⁺ aus NADH/H⁺ auf das Tetrazoliumsalz, welches ebenfalls in der Reaktionslösung enthalten ist. Das Tetrazoliumsalz wird so zu Formazansalz reduziert. Das rotfarbene Formazansalz zeigt ein Absorptionsmaximum um 500 nm. Somit ist der Absorptionswert bei 490 nm proportional zum LDH-Gehalt, welches das Ausmaß der Zytotoxizität anzeigt.

Die Zellen wurden auf mit PDL beschichteten *Nunclon™ Delta Surface 96 Well Platten* ausgesät. Bei cerebellären Neuronen wurden 60.000 Zellen pro Well, bei Spinalganglienneuronen 20.000 Zellen in jeweils 100 µl Neuronen-Medium pro Well eingesetzt, da sich bei den Spinalganglienneuronen eine deutlich geringere Zellausbeute ergab. Für die Hintergrundkontrolle sowie für die Substanzkontrollen wurden jeweils drei Wells ohne Zellen belassen. Die Inkubation der Zellen erfolgte wie bereits beschrieben durch eine tägliche Zugabe von mit Serum versetztem Neuronen-Medium in der Konzentration 1:100, nachdem die Zellen nach der Aussaat zunächst für 24 Stunden in reinem Neuronen-Medium belassen worden waren. Es wurde besonders darauf geachtet das mit Serum versetzte Medium jeweils vollständig auszutauschen, sodass das gemessene LDH der Menge entsprach, die in den vorausgehenden 24 Stunden gebildet worden war. Jeweils zu einem Triplet der Zellen wurden Seren von zwei gesunden Kontrollpersonen sowie Seren von zwei PatientInnen mit Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern verschiedener Subklassen gegeben (Appeltshauser, 2018; Doppler et al., 2015b). Die Inkubation erfolgte für cerebelläre Neurone jeweils für 48, 72 sowie 96 Stunden. Für Spinalganglienneurone ließen sich nur die Ergebnisse für 48 und 72 Stunden verwerten, da sich für 96 Stunden bei den Zellen auch für die Negativkontrollen sehr hohe LDH-Werte zeigten. Wir führten dies auf das spontane Absterben der Zellen zurück, was wir auch bei den immunhistochemischen Färbungen nach viertägiger Inkubation beobachteten.

Für jedes Serum wurde nach der jeweiligen Inkubationszeit ein Triplet an Werten erhoben, wobei die Werte des Triplets im Rahmen desselben Zytotoxizitätsassays erhoben wurden. Im Rahmen jeder Messung wurde in je einem Triplet an Wells verschiedene Kontrollwerte erhoben, die dazu dienten die relative Zytotoxizität zu errechnen. Die Hintergrundkontrolle diente zur Ermittlung der LDH-Aktivität in serumfreiem Neuronen-Medium ohne Zellkontakt. Der Wert, der sich in der Absorptionsmessung der Hintergrundkontrolle ergab, wurde von allen anderen Werten subtrahiert. Für die Negativkontrolle wurde zu Zellen reines Neuronen-Medium gegeben, um zu ermitteln, wie viel LDH durch unbehandelte Zellen freigesetzt wird. Die Positivkontrolle zeigte, wie viel LDH durch die Zellen maximal freigesetzt werden kann. Hierfür wurde zu den Zellen Neuronen-Medium, das mit 2 % *Triton X 100* versetzt

worden war, gegeben. Das Triton führte zur Lyse der Zellen, sodass das gesamte LDH, das in den Zellen enthalten war, freigesetzt wurde.

Die Substanzkontrolle-I diente dazu auszuschließen, dass in dem Serum, mit dem die Zellen behandelt wurden, bereits LDH enthalten war. Es wurden die LDH-Absorptionswerte im Serum, das für die Inkubationen verwendet wurde, ermittelt, wobei jeweils exemplarisch jeweils nur eines der verwendeten Seren getestet wurde. Mit der Substanzkontrolle-II wurde untersucht, ob das Serum selbst eine Wechselwirkung mit der LDH Aktivität zeigt. Es wurde eines der für die Inkubation verwendeten Seren 1:1 mit *L-Lactate Dehydrogenase* vermischt und die Absorptionswerte für LDH gemessen.

Tabelle 23 zeigt zusammengefasst, wie die jeweiligen Kontroll- sowie Testwerte bestimmt wurden. Alle Werte wurden als Triplet erhoben.

Tabelle 23: Zusammenfassung der Kontroll- sowie Testwerte bei Zytotoxizitätsassays

Hintergrundkontrolle: Keine Zellen+ 200 µl Medium	
Substanzkontrolle-I: Keine Zellen+ 200 µl Patientenserum 1	Substanzkontrolle-II: Keine Zellen+ 50 µl Patientenserum 1 + 50 µl LDH Standard
Negativkontrolle: Zellen+ 200 µl Medium	Positivkontrolle: Zellen+ 200 µl 2 % Triton 100
Testung Patientenserum: Zellen+ Patientenserum 1 1:100 verdünnt	Testung Patientenserum: Zellen+ Patientenserum 2 1:100 verdünnt
Testung Kontrollserum: Zellen+ Kontroll-Serum 1 1:100 verdünnt	Testung Kontrollserum: Zellen+ Kontroll-Serum 2 1:100 verdünnt

Die Messung der LDH-Werte erfolgte jeweils 24 Stunden nach der letzten Inkubation. Zunächst wurden die Platten für zehn Minuten bei 250 xg mit der *Rotina 46 R Zentrifuge* zentrifugiert, damit sich eventuell im Medium flotierende Zellen absetzen und ein zellfreier Überstand erhalten wurde. Es wurden 100 µl an Überstand entnommen. Hierbei

wurde insbesondere darauf geachtet die Zellen nicht zu berühren, um nicht artifiziell Zellen zu schädigen und somit LDH freizusetzen.

Der Überstand wurde in eine *Nunc-Immuno Plate F96 Maxisorp* übertragen und je Well wurden 100 µl der frisch zubereiteten Reaktionslösung des *Cytotoxicity Detection Kit* zugegeben. Es erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur für genau 30 Minuten. Die Absorptionsmessung erfolgte dann mittels des *Infinite M200 Pro ELISA Readers* bei 490 nm.

Die Berechnung der relativen Zytotoxizität erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$\frac{(\text{Absorptionswert Testserum} - \text{Absorptionswert Negativkontrolle})}{(\text{Absorptionswert Positivkontrolle} - \text{Absorptionswert Negativkontrolle})}$$

Die statistische Auswertung der Werte der relativen Zytotoxizität erfolgte durch den ungepaarten T-Test unter Einsatz des Programmes GraphPad Prism. Der ungepaarte T-Test wurde jeweils für den Vergleich der Werte von CNTN-Patient 1 zu CNTN-Patientin 2, von CNTN-Patient 1 zu den gesunden Kontrollpersonen und von CNTN-Patientin 2 zu den gesunden Kontrollpersonen angewandt. Die jeweils insgesamt sechs Werte der zwei gesunden Kontrollpersonen wurden bei der Auswertung zur Gruppe der gesunden Kontrollpersonen zusammengefasst. Das Signifikanzlevel wurde in den Abbildungen mit Sternchen dargestellt (** = p < 0,01, *** = p < 0,001, **** = p < 0,0001).

3.7 Western Blots

Western Blots wurden durchgeführt, um in Lysaten von inkubierten Neuronen die Proteinexpression von Neurofascin sowie Contactin-1 zu untersuchen. Außerdem dienten Western Blots als Bestätigungstest für den Nachweis von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern, die zuvor im ELISA detektiert worden waren.

Die Western Blots wurden mit Hilfe des *Mini-PROTEAN® Tetra System für Western Blot* durchgeführt.

Für das Gießen von vier Trenngelen wurden 6,6 ml destilliertes Wasser mit 8 ml *Rotiphorese Gel 30*, 5 ml 1,5 M Tris mit pH=8,8 sowie 0,2 ml 10 %igem SDS gemischt. Durch die Zugabe von 0,2 ml 10 % Ammoniumperoxodisulfat und 8 µl TEMED wurde die Polymerisierungsreaktion eingeleitet, sodass das Gel dann zügig jeweils zwischen

zwei Glasplatten pipettiert wurde, wobei darauf geachtet wurde Platz für die Sammelgele zu lassen. Das Trenngel wurde mit etwas 2-Propanol beschichtet, um die Masse zu begradigen. Nach 20 bis 30 Minuten wurde das Trenngel fest. Dann wurde das 2-Propanol abgegossen sowie mit einem handelsüblichen Papiertuch abgetupft. Anschließend wurden die Sammelgele gegossen. Für vier Sammelgele wurden zu 5,5 ml destilliertem Wasser 1,3 ml *Rotiphorese Gel 30*, 1 M Tris mit $\text{pH}=6,8$ sowie 80 μl 10 % SDS gegeben. Direkt vor dem Gießen wurden 80 μl 10 % Ammoniumperoxodisulfat sowie 8 μl TEMED hinzugegeben. Das Gel für die Sammelgele wurde über die bereits festen Trenngele bis zum Rand der Glasplatten geschichtet. Es wurden die jeweiligen Kämmen eingesteckt, und die Gele wurden inkubiert, bis sie fest wurden. Für die Testung der Lysate wurden Kämmen eingesteckt, die 15 Vertiefungen bildeten. Für die Testung von Seren wurde ein Kamm ohne Vertiefungen verwendet. Die fertigen Gele konnten in feuchten Tüchern für bis zu sieben Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Bei den Lysaten erfolgte zunächst die Bestimmung der jeweils enthaltenen Proteinmenge durch einen Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay). Beim BCA-Assay handelt es sich um eine kalorimetrische Bestimmung einer Proteinmenge. Der Nachweis beruht darauf, dass bestimmte Aminosäuren aus Proteinen Cu^{2+} zu Cu^{+} reduzieren. Cu^{+} und BCA bilden dann einen Farbstoff, der photometrisch nachgewiesen werden kann.

Für die Standardlösungen wurden Aqua ad iniectabilia sowie BSA-Lösungen in den Konzentrationen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml sowie 7,5 mg/ml hergestellt, indem die entsprechende Menge an BSA mit Aqua ad iniectabilia vermischt wurde.

Für den BCA-Assay wurden je Lysat bzw. je Standardlösung 1 ml Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic acid solution*) mit 20 μl Kupfer(II)-Sulfat (*Copper(II) sulphate solution*) vermischt. Dann wurden jeweils 2 μl des Lysates bzw. 5 μl der Standardlösung hinzugegeben und die Proben für 30 Minuten in *Halb-Mikro-Küvetten* bei 37 °C im *Dry Block Thermostat* inkubiert.

Die Messung erfolgte mittels des *Bio-Photometers*. Für die Kalibrierung des Photometers wurde zunächst als Blindwert Aqua ad iniectabilia und anschließend die BSA-Standardlösungen in aufsteigender Reihenfolge gemessen. Anschließend erfolgte die

Messung der Lysate, wobei die enthaltene Proteinkonzentration jeweils direkt vom Gerät ausgegeben wurde.

Die Festlegung der jeweils für den Western Blot verwendeten Proteinmenge orientierte sich an dem Lysat mit der geringsten Proteinmenge. Die übrigen Proben wurden dann mit Aqua ad iniectabilia so verdünnt, dass alle verdünnten Lysate jeweils die gleiche Menge an Protein enthielten. Dann wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt. Kurz vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C im *Dry Block Thermostat* inkubiert.

Jeweils zwei Gele wurden im Rahmen des *Mini-PROTEAN® Tetra Systems* eingespannt. Die Kammer und der Geleinsatz wurden bis zum Rand mit 1x Laufpuffer befüllt.

Für die Testung der Lysate wurden die Vertiefungen mit Hilfe einer *Hamilton-Mikroliterspritze* beladen. In die erste Vertiefung wurde 7 µl *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* gegeben. Dieses enthielt farbmarkierte Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts, welche dann als Maß für das Molekulargewicht der geblotteten Proteine diente. Die weiteren Vertiefungen in den Kammern wurden jeweils mit einer Probe beladen. Es wurde in jede Vertiefung 30 µl des Lysates gegeben, die wie oben beschrieben so verdünnt wurden, dass jede Probe die gleiche Gesamtmenge an Protein enthielt.

Für den Nachweis von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern wurden je Gel 6 µg *Full-length human neurofascin-155 protein* aufgebracht.

Die Gele wurden für 75 Minuten bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel gefahren. Als Netzgeräte kamen *PowerPac™ Basic* sowie *PowerPac™ HC* zum Einsatz. Durch den angelegten Strom wandern die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes im Trenngel. Je kleiner hierbei die Molekülmasse ist, umso weiter ist die Strecke, die das Protein im Gel zurücklegt.

Die Proteine, die sich auf dem Gel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt hatten, wurden auf eine Membran übertragen. Die Blottingkammer wurde mit kaltem Blottingpuffer gefüllt. Als Membranen wurden *Nitrocellulose Western Blotting Membranes* verwendet. Die Membran, das Blotting-Papier sowie die Schwämme des

Mini-PROTEAN® Tetra Systemes wurden separat in kaltem 1x Blottingpuffer eingeweicht. Das Gel wurde kurz in Blottingpuffer geschwenkt.

Auf den Schwamm wurden zwei Blatt Blotting-Papier aufgebracht und darauf zuerst die Membran und dann das Gel gelegt. Auf das Gel wurden wiederum zwei Blätter Blotting Papier sowie ein Schwamm aufgelegt. Es wurde darauf geachtet jede Lage langsam abzurollen, sodass keine Luftblasen zwischen den Komponenten eingeschlossen wurden. Die Komponenten wurden dann in einem Einspannrahmen fixiert und der Rahmen so in der Blottingkammer eingelegt, dass die Nitrocellulosemembran auf die Seite der Anode zeigte. Neben gekühltem 1x Blottingpuffer wurde in die Kammer ein Kühlelement gegeben, um ein Überhitzen des Geräts während des Blottingprozesses zu vermeiden. Dann wurde der gefüllten Kammer für 90 Minuten eine Stromspannung von 100 V angelegt.

Im Anschluss wurde die Nitrocellulosemembran für 30 Minuten in Blockpuffer bei Raumtemperatur auf einem Wiegeschüttler (*Mini Rocker-Shaker*) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermindern.

Um spezifische Proteine auf der Nitrocellulosemembran nachzuweisen, wurden gegen das Zielprotein gerichtete Primärantikörper in Blockpuffer verdünnt über Nacht bei 4 °C auf dem Wiegeschüttler inkubiert. Bei Membranen, auf welche die Proteine von Lysaten geblottet worden waren, wurde für den Nachweis von Contactin-1-Protein *Human/Mouse/Rat Contactin-1 Antibody, Antigen Affinity-purified, polyclonal Goat IgG* und für den Nachweis von Neurofascin-Protein *Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin* jeweils 1:1.000 verdünnt auf der gesamten Membran eingesetzt. Außerdem wurde jeweils *GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody* in der Verdünnung 1:2.000 eingesetzt. GAPDH, das in nahezu allen Geweben exprimiert wird, diente als Ladekontrolle. Für die Untersuchung auf Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper wurde die Membran in Streifen geschnitten und jeweils Serum von PatientInnen bzw. gesunden Kontrollen in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde wiederum *Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin* in der Verdünnung 1:200 verwendet.

Anschließend wurden die Nitrocellulosemembranen für 30 Minuten mit Waschpuffer gewaschen, sodass nicht gebundene Primärantikörper wieder entfernt wurden. Die Membranen wurden hierfür jeweils zwei Mal kurz mit Waschpuffer übergossen und darin geschwenkt. Anschließend wurden sie zwei Mal jeweils für zehn Minuten auf dem Wiegeschüttler in jeweils frischem Waschpuffer geschwenkt.

Dann wurden HRP gekoppelte Sekundärantikörper jeweils 1:5.000 verdünnt aufgebracht und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wiegeschüttler inkubiert. Es wurde *Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)* als Sekundärantikörper für den Primärantikörper *Human/Mouse/Rat Contactin-1 Antibody, Antigen Affinity-purified, polyclonal Goat IgG* eingesetzt. *Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)* wurde als Sekundärantikörper für den Primärantikörper *Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin* eingesetzt. *Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey anti-Mouse IgG (H+L)* wurde als Sekundärantikörper für den Primärantikörper *GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody* eingesetzt. Gegen humane Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper aus Seren wurde als Sekundärantikörper *Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM/HRP* eingesetzt.

Anschließend wurden die Nitrocellulosemembran wiederum für 30 Minuten gewaschen, um nicht gebundene Sekundärantikörper zu entfernen. Die Membranen wurden jeweils viermalig mit Waschpuffer übergossen und kurz geschwenkt. Dann wurden die Membranen zweimalig jeweils für 15 Minuten auf dem Wiegeschüttler in frischem Waschpuffer gewaschen.

Die Darstellung der Banden erfolgte in der Dunkelkammer, die während der Entwicklung lediglich mit Rotlicht beleuchtet wurde. Für die Entwicklung des Western Blots wurden die Reagenzien *Western Lightning Plus-ECL Enhanced Luminol Reagent Plus* und *Western Lightning Plus-ECL Oxidizing Reagent Plus* im Verhältnis 1:1 gemischt und lichtgeschützt eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Auf jede Membran wurden 1,5 ml der Mischung gegeben. Das Chemilumineszenzreagenz wird von der an den sekundären Antikörpern angebrachten HRP unter Lichtemission abgebaut.

Die Röntgenkassette (*Hypercassette RPN13642 18x24 cm*) wurde mit handelsüblicher Frischhaltefolie ausgelegt und die Membran darauf gelegt. Die Röntgenfolie wurde dann

möglichst blasenfrei über die Membran geklappt, mit einem Papiertuch glattgestrichen und mit handelsüblichen Klebestreifen in der Kassette fixiert. Darauf wurde dann ein Röntgenfilm (*Universalfilm Super RX-N*) gelegt, die Röntgenkassette wurde geschlossen und der Film für verschiedene Zeitspannen exponiert. Nach der Belichtung wurden die Filme mittels der Entwicklungsmaschine *Agfa CURIX 60* entwickelt. Als Reagenzien dienten hierbei neben destilliertem Wasser, der *Developer for medical x-ray film processing* und der *Rapid Fixer for medical x-ray film processing*. Die entwickelten Filme wurden im Anschluss mit dem jeweils verwendeten Lysat bzw. Serum sowie der Expositionszeit beschriftet und eingescannt.

Bei den Western Blots, die die Expression von Contactin-1 sowie Neurofascin darstellten, erfolgte eine Quantifizierung der Western Blots. Für die Quantifizierung der Western Blot wurde mit Hilfe des Programmes ImageJ die Intensität der jeweiligen Bande ermittelt. Bei der Berechnung der relativen Intensität, wurde die Bande des Lysates nach Inkubation mit dem Serum einer gesunden Kontrollperson für den jeweiligen Inkubationszeitraum als Standard gesetzt. Somit ergab sich für die Bande nach Inkubation mit dem Serum einer gesunden Kontrollperson eine relative Intensität von 100 % und die Intensitäten der anderen Banden mit demselben Inkubationszeitraum beziehen sich auf diesen Wert. Die relativen Intensitäten für die Bande des jeweiligen Zielproteins Contactin-1 bzw. Neurofascin wurden dann in Verhältnis zu den jeweiligen relativen Intensitäten der GAPDH Ladekontrolle gesetzt, um die Gesamtproteinmenge des jeweiligen Lysates zu berücksichtigen. Auf Grund von Knappheit an Zellen sowie Patientenmaterial wurden für jede Inkubationskonstellation nur zwei Wiederholungen durchgeführt, so dass keine statistische Auswertung hinsichtlich eines statistisch signifikanten Unterschiedes erfolgen konnte. Es erfolgte lediglich eine graphische Darstellung der Werte mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism.

4 Ergebnisse

4.1 Neurofascin-IgG-Autoantikörper

Bei der Untersuchung auf IgG-Autoantikörper wurden zwei Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern identifiziert. Die Ergebnisse hierzu wurden zum Teil bereits veröffentlicht (Stengel et al., 2019).

4.1.1 Zwei Patienten mit Bindung am paranodalen Axon im Screening mittels Bindungsassays an murinen Ischiadicuszupfnervpräparaten

Die Serumproben aller PatientInnen sowie aller Kontrollpersonen wurden mittels Bindungsassays an murinen Ischiadicuszupfnervpräparaten auf das Vorhandensein von (para-)nodalen IgG-Autoantikörpern untersucht. Die Bindungsassays an murinen Ischiadicuszupfnervpräparaten dienten somit als Screening auf (para-)nodale IgG-Autoantikörper.

Hierbei zeigte sich bei zwei Patienten eine Bindung am paranodalen Axon. Bei beiden Patienten ließ sich diese Bindung am paranodalen Axon in mehreren Verlaufsproben reproduzieren. Bei diesen Patienten handelt es sich jeweils um CIDP-Patienten, die die INCAT-Diagnosekriterien erfüllen. Aufgrund des positiven Nachweises von paranodalen IgG-Autoantikörpern werden diese beiden Patienten im Weiteren als IgG-Patient 1 bzw. 2 bezeichnet. IgG-Patient 2 ist der Gruppe „CIDP Würzburg“ und IgG-Patient 1 der Gruppe „V.a. CIDP auswärts“ zugeordnet, wobei bei ihm mit Hilfe eingesandter Arztbriefe die Erfüllung der INCAT-Diagnosekriterien überprüft werden konnte.

Bei keinem der weiteren 262 getesteten PatientInnen zeigte sich eine Bindung am paranodalen Axon.

In der folgenden Abbildung 8 sind die Fluoreszenzfärbungen der Bindungsassays an Ischiadicuszupfnervpräparaten der IgG-Patienten 1 und 2 sowie einer Kontrolle abgebildet.

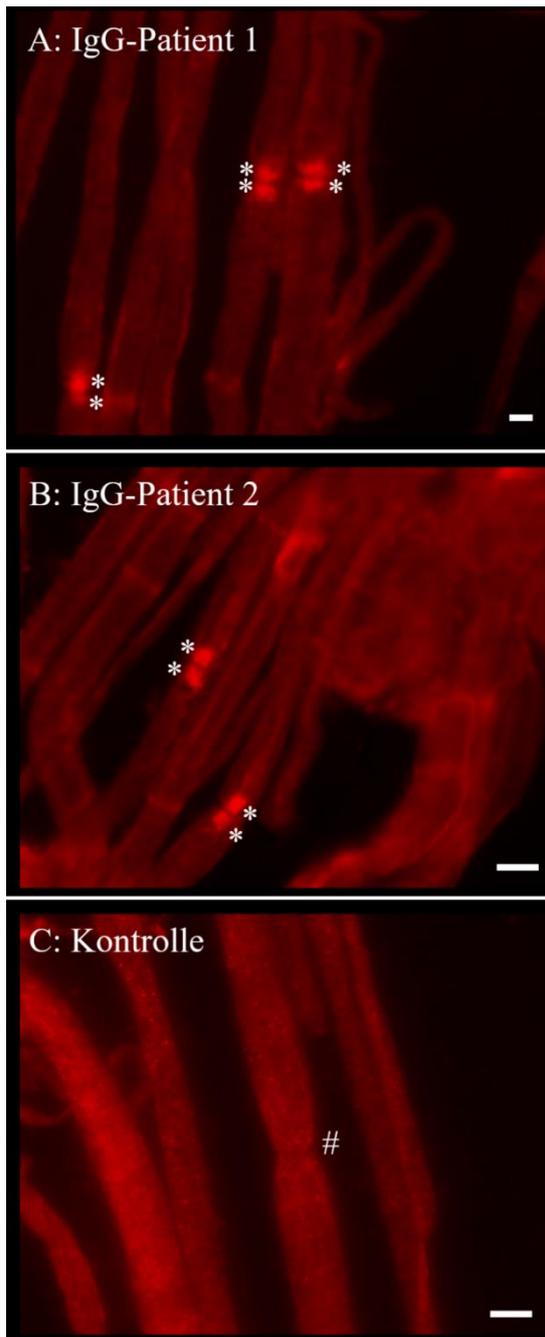


Abbildung 8: Bindungsassays an murinen Ischiadicuszupfnerven

Eine Bindung am paranodalen Axon ist jeweils mit einem Stern (*) markiert. Sowohl bei IgG-Patient 1 in Bild A als auch bei IgG-Patient 2 in Bild B zeigt sich bei allen im Bild sichtbaren Ranvierschen Schnürringen eine Bindung am paranodalen Axon. Ein unauffälliger Ranvierscher Schnürring ohne Bindung von IgG-Autoantikörpern ist bei der Kontrolle in Bild C sichtbar und mit einer Raute (#) markiert. Der Maßstab beträgt jeweils 10 μm .

4.1.2 Testung auf IgG-Autoantikörper mittels ELISA

Die ELISA-Testung ermöglichte die Detektion von (para-)nodalen IgG-Autoantikörpern bei gleichzeitiger Bestimmung des Zielantigens. Alle PatientInnen, die eine zu einer (Para-)nodopathie passende klinische Symptomatik zeigten oder die im Bindungsassay an murinen Ischiadicuszupfnerven das Bild einer unspezifischen Bindung boten, wurden mittels ELISA auf Neurofascin-155-IgG Autoantikörper (n=222) sowie auf Contactin-1-IgG-Autoantikörper (n=229) untersucht. Da wir ein nicht kommerziell verfügbares Neurofascin-186-Protein verwendeten, das nur beschränkt verfügbar war, konnten nur PatientInnen mit schwerer Symptomatik sowie alle Patienten mit nachgewiesenen Neurofascin-155-IgG Autoantikörpern auf Neurofascin-186-IgG-Autoantikörper untersucht werden (n=40). Der ELISA zur Testung auf Neurofascin-140-IgG-Autoantikörper war erst nach Identifikation der Patienten mit Neurofascin-155-IgG bzw. Neurofascin-186-IgG Autoantikörpern etabliert worden, sodass neben den Patienten bei denen Neurofascin-155-IgG-Autoantikörper nachgewiesen worden (n=2) waren nur wenige weitere PatientInnen (n=3) und einige Kontrollen (n=15) getestet wurden.

4.1.2.1 Nachweis von Neurofascin-155-IgG-Autoantikörpern bei zwei Patienten

Für Neurofascin-155-IgG-Autoantikörper lag der Grenzwert bei einer optischen Dichte von 0,496. Zwei der Patienten aus dem getesteten PatientInnenkollektiv zeigten eine optische Dichte, die deutlich über dem Grenzwert lag. Es handelt sich hierbei um die beiden IgG-Patienten 1 und 2, die im Screening auf (para-)nodale IgG-Autoantikörper mittels Bindungsassay an murinen Ischiadicuszupfnervpräparaten eine Bindung am paranodalen Axon gezeigt hatten. Bei IgG-Patient 1 betrug die optische Dichte 3,147 und bei IgG-Patient 2 3,129. Bei beiden Patienten liegt eine CIDP mit Erfüllung der INCAT-Diagnosekriterien vor. Abbildung 9 zeigt die optischen Dichten für alle im Neurofascin-155-IgG ELISA getesteten PatientInnen und Kontrollen.

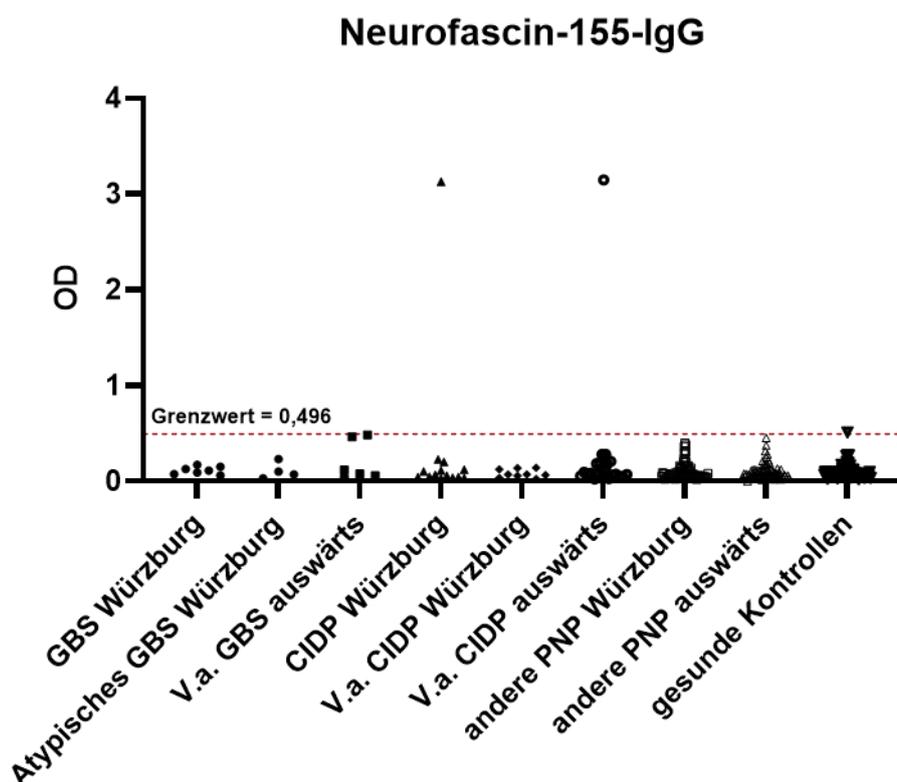


Abbildung 9: Streudiagramm Neurofascin-155-IgG ELISA

Auf der x-Achse sind die PatientInnengruppen und auf der y-Achse die einzelnen optischen Dichten (=OD) der PatientInnen und Kontrollen dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für ein positives Ergebnis, das bei einer optischen Dichte von 0,496 lag. Zwei CIDP-Patienten zeigten eine optische Dichte, die deutlich über den Grenzwert erhöht war.

4.1.2.2 Nachweis von Neurofascin-186-IgG-Autoantikörpern bei einem Patienten

Für Neurofascin-186-IgG-Autoantikörper lag der Grenzwert bei einer optischen Dichte von 0,459. IgG-Patient 1 in der Gruppe „V.a. CIDP auswärts“ zeigte mit einem Wert von 2,682 eine deutlich über den Grenzwert erhöhte optische Dichte, sodass bei ihm Neurofascin-186-IgG-Autoantikörper nachweisbar waren. Bei IgG-Patient 2 betrug die optische Dichte 0,120. Dieser Wert lag unter dem Grenzwert, sodass bei IgG-Patient 2 keine Neurofascin-186-IgG-Autoantikörper nachweisbar waren. Auch bei den übrigen getesteten PatientInnen und Kontrollpersonen zeigten sich keine über den Grenzwert erhöhten optischen Dichten (siehe Abbildung 10).

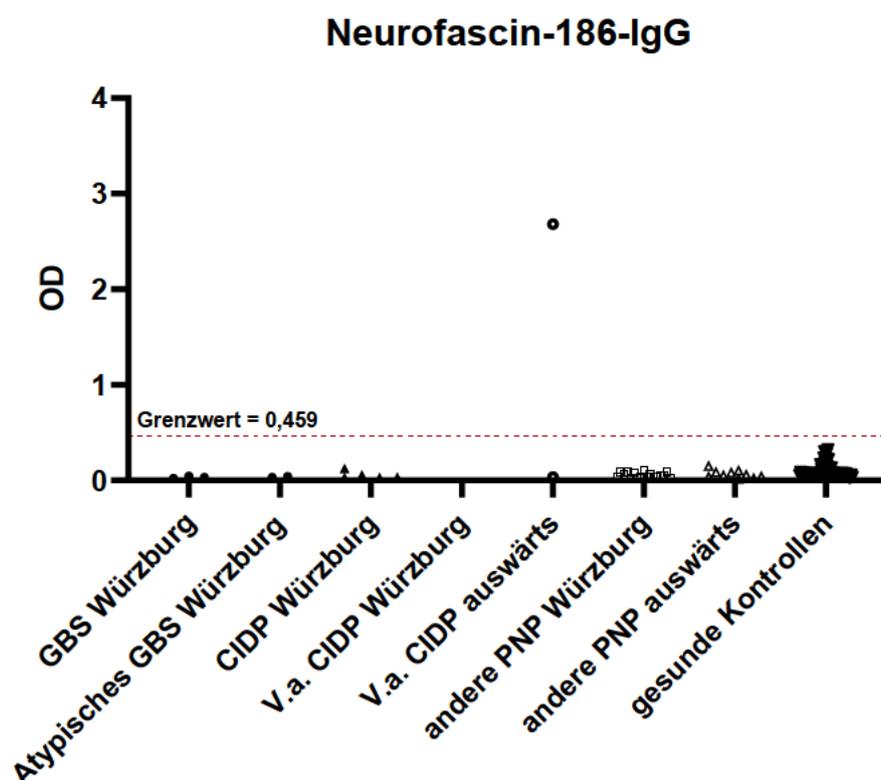


Abbildung 10: Streudiagramm Neurofascin-186-IgG ELISA

Auf der x-Achse sind die PatientInnengruppen und auf der y-Achse die einzelnen optischen Dichten (=OD) der PatientInnen und Kontrollen dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für ein positives Ergebnis, das bei einer optischen Dichte von 0,459 lag. Ein auswärtiger CIDP-Patient zeigte eine optische Dichte, die deutlich über den Grenzwert erhöht war.

4.1.2.3 Nachweis von Neurofascin-140-IgG-Autoantikörpern bei einem Patienten

Für Neurofascin-140-IgG lag der Grenzwert bei einer optischen Dichte von 0,732. Neben den beiden Patienten mit nachgewiesenen Neurofascin-155-Autoantikörpern wurden wenige weitere PatientInnen ohne nachgewiesene Neurofascin-155-Autoantikörper sowie einige gesunde Kontrollpersonen getestet. IgG-Patient 1 zeigte mit einer optischen Dichte von 2,243 einen deutlich über den Grenzwert erhöhten Wert, womit Neurofascin-140-IgG-Autoantikörper nachgewiesen werden. IgG-Patient 2 zeigte mit 0,241 eine deutlich unter dem Grenzwert liegende optische Dichte. Auch die übrigen getesteten PatientInnen sowie Kontrollen zeigten unauffällige optische Dichten, womit bei keinen weiteren PatientInnen bzw. Kontrollen Neurofascin-140-IgG-Autoantikörper nachweisbar waren (siehe Abbildung 11).

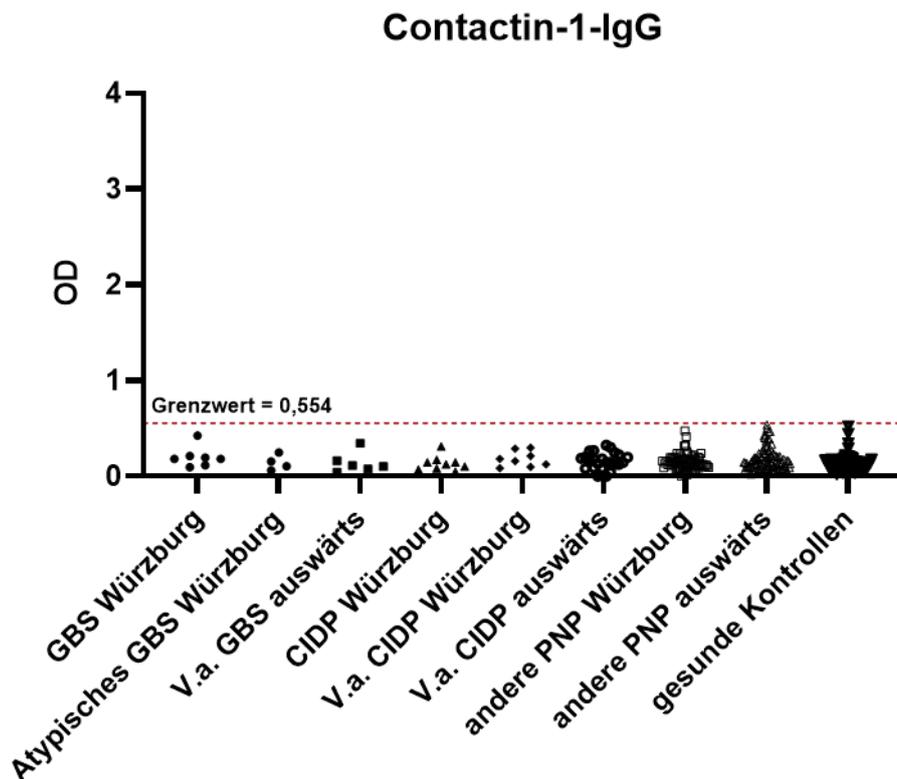


Abbildung 12: Streudiagramm Contactin-1-IgG ELISA

Auf der x-Achse sind die PatientInnengruppen und auf der y-Achse die einzelnen optischen Dichten (=OD) der PatientInnen und Kontrollen dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für ein positives Ergebnis, der bei einer optischen Dichte von 0,554 lag. Keine der getesteten PatientInnen oder Kontrollen zeigte eine über den Grenzwert erhöhte optische Dichte.

4.1.2.5 Zusammenfassungen der IgG-Autoantikörperdiagnostik mittels ELISA

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei der Testung auf IgG-Autoantikörper mittels ELISA bei zwei CIDP-Patienten Neurofascin-IgG-Autoantikörper nachgewiesen werden konnten. Diese beiden Patienten hatten auch eine Bindung im Bereich der Ranvierschen Schnürringens an Ischiadicuszupfnervpräparaten gezeigt.

Im Serum des IgG-Patienten 1 ließen sich Autoantikörper gegen Neurofascin-155, Neurofascin-186 sowie Neurofascin-140 nachweisen.

Im Serum des IgG-Patienten 2 ließen sich dagegen lediglich Autoantikörper gegen Neurofascin-155 nachweisen. Autoantikörper gegen Neurofascin-186 oder gegen Neurofascin-140 ließen sich bei IgG-Patient 2 hingegen nicht nachweisen.

4.1.3 Bestimmung des Neurofascin-IgG Autoantikörpertiters mittels ELISA

Um den Titer der Neurofascin-IgG-Autoantikörper zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen des Serums der Patienten getestet. Der Titer ergab sich aus der höchsten Verdünnung, bei der die optische Dichte im ELISA über dem Grenzwert lag. Die Titerbestimmungen wurden nur für Neurofascin-155- und Neurofascin-186-IgG-Autoantikörper durchgeführt.

Die jeweiligen Titer der Patienten sind in folgender Tabelle 24 dargestellt, wobei jeweils die Titer des ersten eingesandten Serums aufgeführt sind. Auf Titerveränderungen bei IgG-Patient 1 wird in Kapitel 4.1.7.1 *IgG-Patient 1* eingegangen.

Tabelle 24: Titer der Patienten mit Neurofascin-155-IgG-Autoantikörpern

Titer	Neurofascin-155	Neurofascin-186
IgG-Patient 1	1:4000	1:2000
IgG-Patient 2	1:6000	/

4.1.4 Bestimmung der Neurofascin-IgG Subklassen mittels ELISA und Bestimmung des Komplementbindungsverhaltens mittels Komplementbindungsassay

Um zu untersuchen, welcher IgG-Subklassen die Autoantikörper der Patienten überwiegend angehören, wurden ELISAs mit subklassenspezifischen Sekundärantikörpern durchgeführt. Dabei zeigte das Serum von IgG-Patient 1 sowohl im Neurofascin-155-IgG als auch im Neurofascin-186-IgG ELISA zu Beginn überwiegend die Subklasse IgG3 und einen geringeren Anteil der Subklasse IgG2. Auch in den zahlreichen Verlaufspuren von IgG-Patient 1 war über sieben Monate hinweg weiterhin überwiegend die Subklasse IgG3 vorhanden, während die Subklasse IgG2 dann kaum noch nachweisbar war (siehe Tabelle 30). Bei IgG-Patient 2 zeigten sich im ersten eingesandten Serum im Neurofascin-155-IgG ELISA die Subklassen IgG4 und IgG2 in vergleichbarem Maß erhöht. In einem Verlaufsserum des IgG-Patienten 2, das circa einen Monat später eingesandt wurde, zeigten sich dann überwiegend die Subklasse IgG4 und ein geringerer Anteil der Subklasse IgG2. In Abbildung 13 sind die jeweiligen Anteile

der Subklassen des ersten eingesandten Serums im Neurofascin-155-IgG ELISA in einem Balkendiagramm dargestellt.

Außerdem wurden ELISA-basierte Komplementbindungsassays mit C1q an mit Neurofascin-155-Protein beschichteten Platten mit den Seren beider IgG-Patienten und zwei Seren von gesunden Kontrollen durchgeführt. Im Komplementbindungsassay zeigte sich bei IgG-Patient 1 eine ausgeprägte C1q-Bindung mit einer optischen Dichte von 1,000. Auch bei IgG-Patient 2 zeigte sich eine C1q-Bindung mit einer optischen Dichte von 0,742. Dagegen fand sich im Serum der beiden gesunden Kontrollen mit einer optischen Dichte von 0,007 und 0,038 keine C1q-Bindung. Die Werte der beiden IgG-Patienten im Komplementbindungsassay sind ebenfalls in Abbildung 13 dargestellt.

Subklassen und Komplementbindung von Seren mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern

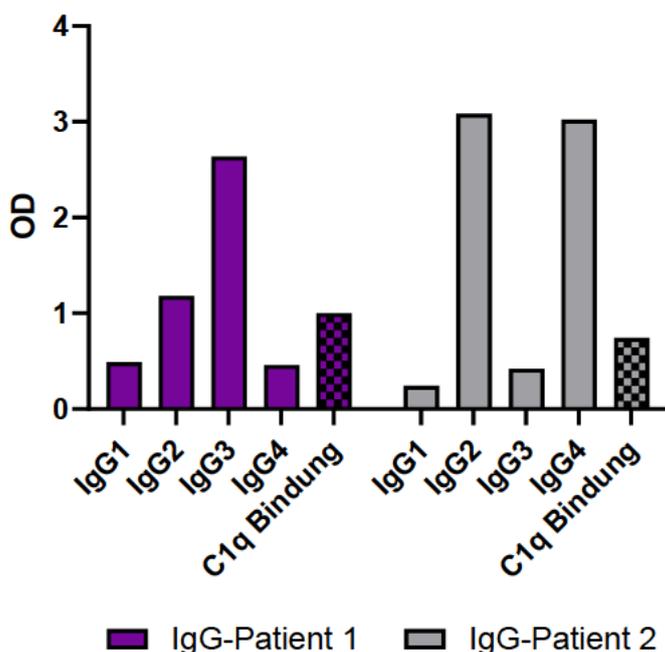


Abbildung 13: Balkendiagramm zur Darstellung der Subklassen und der C1q-Komplementbindung von beiden IgG-Patienten jeweils für Neurofascin-155

In diesem Balkendiagramm werden jeweils die Werte des ersten eingesandten Serums dargestellt. Die Werte von IgG-Patient 1 sind in violett und die Werte von IgG-Patient 2 in grau veranschaulicht. Die Balken mit reinen Farben geben die verschiedenen Subklassen und die Balken im Schachbrettmuster die Werte im Komplementbindungsassay wieder. Auf der y-Achse sind die optischen Dichten (=OD) dargestellt.

4.1.5 Bestätigung der Neurofascin-IgG-Autoantikörper mittels Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen

Bindungsassays an Neurofascin-transfizierten HEK-293-Zellen wurden mit den Seren beider IgG-Patienten, bei denen im ELISA Neurofascin-Autoantikörper nachgewiesen worden waren, sowie mit den Seren von zwei gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Mit diesen Bindungsassays sollte der Nachweis der Neurofascin-IgG-Autoantikörper bestätigt werden.

Bei den Bindungsassays wurde das Serum jeweils zu HEK-293-Zellen gegeben, die zuvor mit Neurofascin-155-Protein, Neurofascin-186-Protein oder Contactin-1-Protein transfiziert worden waren. Als Positivkontrolle dienten dabei kommerzielle Antikörper gegen Neurofascin bzw. Contactin-1. Diese konnten für alle drei Proteine bestätigen, dass die HEK-293-Zellen das jeweilige Protein exprimierten.

Das Serum der gesunden Kontrollperson diente als Negativkontrolle und zeigte in den Bindungsassays keine Bindung an den HEK-293-Zellen, unabhängig davon ob sie mit Neurofascin-155-, Neurofascin-186- oder Contactin-1-Protein transfiziert worden waren.

IgG-Patient 1 zeigte eine Bindung sowohl an die mit Neurofascin-155-Protein als auch an die mit Neurofascin-186-Protein transfizierten HEK-293 Zellen. Diese Ergebnisse bestätigten somit die ELISA-Ergebnisse, dass sich im Serum von IgG-Patient 1 Autoantikörper fanden, die sowohl an Neurofascin-155 als auch an Neurofascin-186 banden.

Das Serum von IgG-Patient 2 zeigte nur eine Bindung an die zuvor mit Neurofascin-155-Protein transfizierten HEK-293-Zellen. Bei den mit Neurofascin-186-Protein transfizierten Zellen zeigte sich keine Bindung. Auch diese Ergebnisse deckten sich mit den ELISA-Ergebnissen, dass sich im Serum von IgG-Patient 2 Autoantikörper fanden, die nur an Neurofascin-155 banden.

Die folgenden Graphiken zeigen die Bindungsassays, wobei Abbildung 14 die Bindungsassays an mit Neurofascin-155-Protein transfizierten HEK-293-Zellen und Abbildung 15 die Bindungsassays an mit Neurofascin-186-Protein transfizierten HEK-293-Zellen wiedergibt.

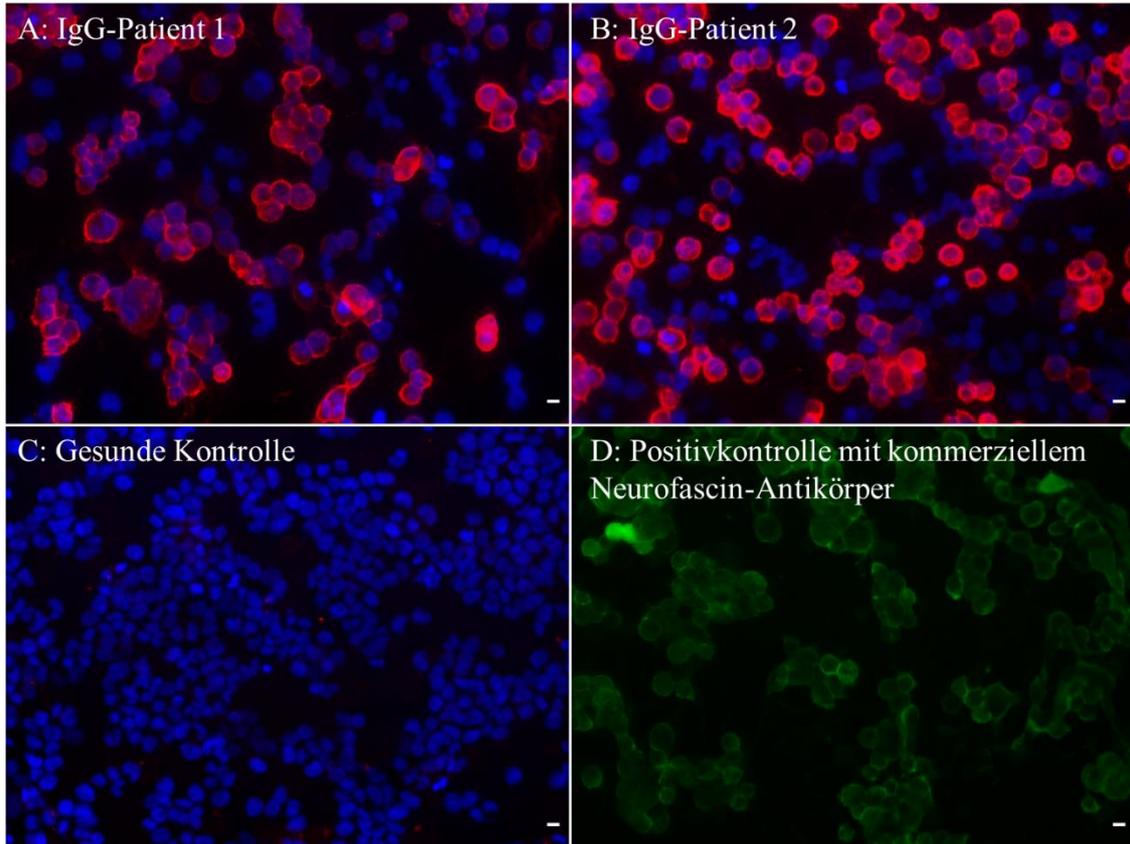


Abbildung 14: Bindungsassays an mit Neurofascin-155 transfizierten HEK-293-Zellen

Sowohl bei IgG-Patient 1 in Bild A als auch bei IgG-Patient 2 in Bild B zeigt sich eine ausgeprägte Bindung an die mit Neurofascin-155-Protein transfizierten HEK-293-Zellen. Der kommerzielle Neurofascin-Autoantikörper der in Bild D als Positivkontrolle dient, zeigt ebenfalls eine Bindung. Bei der gesunden Kontrolle in Bild C zeigt sich keine Bindung. Der Maßstab beträgt jeweils 10 μm . Der Sekundärantikörper gegen humanes IgG ist Cy3 gekoppelt und hier rot dargestellt. Der Sekundärantikörper gegen den kommerziellen Neurofascin-Chicken-IgY-Antikörper ist Alexa-Fluor gekoppelt und hier grün dargestellt. Die Zellkerne sind in Bild A-C blau dargestellt. In Bild D sind die Zellkerne nicht mit abgebildet, da die Bindung durch den kommerziellen Neurofascin-Antikörper sonst nur eingeschränkt sichtbar wäre.

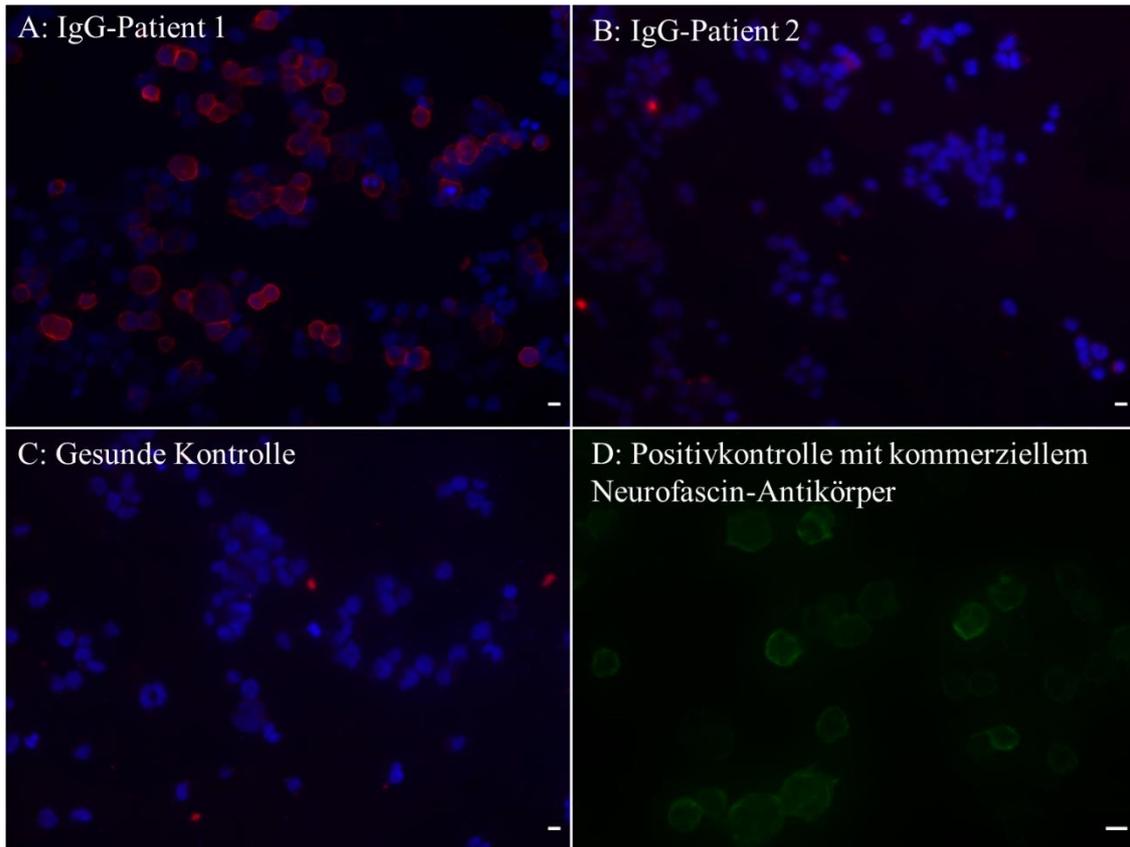


Abbildung 15: Bindungsassays an mit Neurofascin-186 transfizierten HEK-293-Zellen

Bei IgG-Patient 1 zeigt sich in Bild A eine Bindung an die mit Neurofascin-186-Protein transfizierten HEK-293-Zellen. Der kommerzielle Neurofascin-Autoantikörper, der in Bild D als Positivkontrolle dient, zeigt ebenfalls eine Bindung. Bei IgG-Patient 2 in Bild B und bei der gesunden Kontrollperson in Bild C zeigt sich keine Bindung. Der Maßstab beträgt jeweils 10 μm . Der Sekundärantikörper gegen humanes IgG ist Cy3 gekoppelt und hier rot dargestellt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Der Sekundärantikörper gegen den kommerziellen Neurofascin-Antikörper ist in grün dargestellt. In Bild D sind die Zellkerne nicht mitabgebildet, da die Bindung durch den kommerziellen Neurofascin-Antikörper sonst nur eingeschränkt sichtbar wäre.

4.1.6 Weiterführende Bindungsassays

Neben den bereits beschriebenen Bindungsassays an Ischiadicuszupfnerven sowie an transfizierten HEK-293-Zellen wurden mit den Seren der beiden IgG-Patienten auch Bindungsassays an murinen cerebellären Neuronen sowie an Rattenvorderwurzelzupfnervpräparaten durchgeführt. Außerdem wurden Bindungsassays an Ischiadicuszupfnervpräparaten durchgeführt, bei denen die Seren der IgG-Patienten zuvor an transfizierten HEK-293-Zellen präinkubiert worden waren.

4.1.6.1 Bindung an cerebellären murinen Neuronen

Mit den Seren der beiden IgG-Patienten sowie mit den Seren zweier gesunder Kontrollpersonen wurden Bindungsassays an fixierten cerebellären murinen Körnerzellen durchgeführt. Diese Versuche wurden durchgeführt, da sich bei der Neurofascin (Para-)nodopathie, wie im Kapitel 5.3 diskutiert, häufig ein Tremor zeigt, weshalb viele Autoren eine Kleinhirnbeteiligung vermuten.

Sowohl bei IgG-Patient 1 als auch bei IgG-Patient 2 zeigte sich eine ausgeprägte Bindung an die cerebellären Neurone, während bei den beiden gesunden Kontrollpersonen keine Bindung sichtbar war (siehe Abbildung 16).

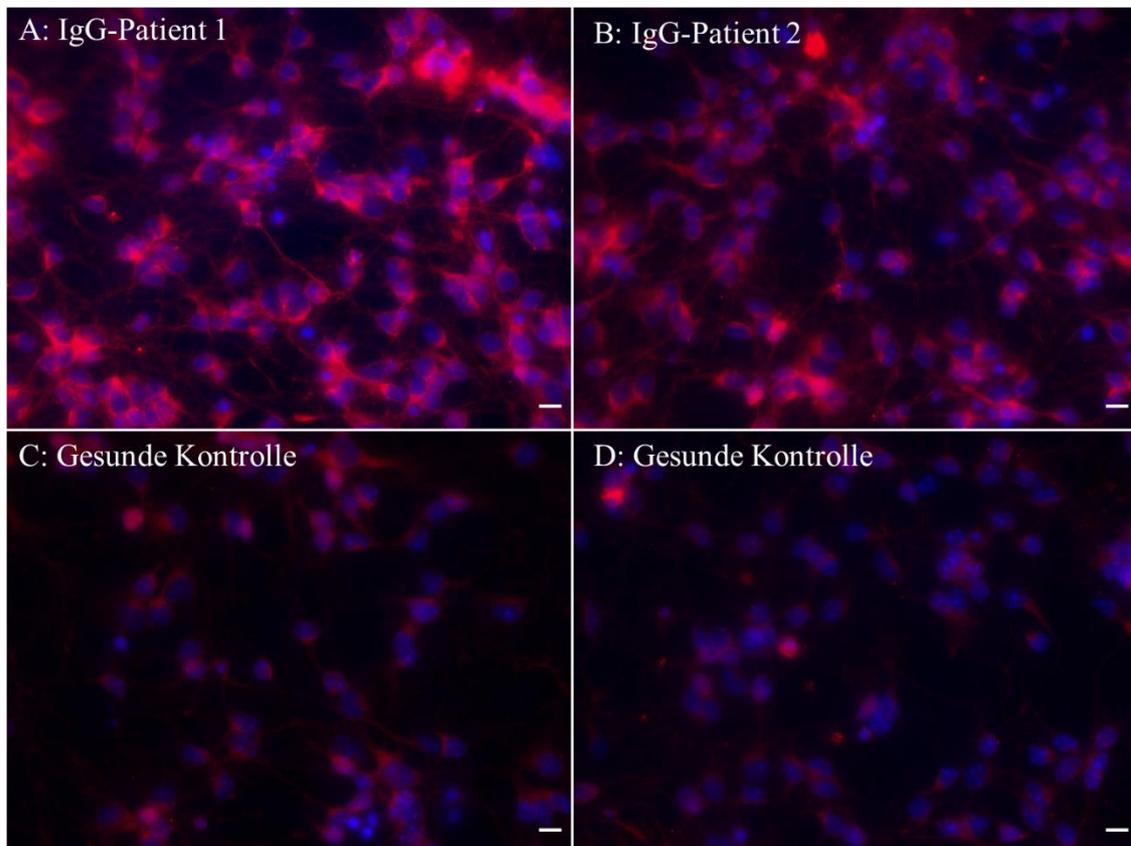


Abbildung 16: Bindungsassays an murinen cerebellären Neuronen

Sowohl IgG-Patient 1 in Bild A als auch IgG-Patient 2 in Bild B zeigen eine ausgeprägte Bindung an die cerebellären murinen Neurone. Die zwei gesunden Kontrollen in Bild C sowie D zeigen hingegen keine Bindung. Der Sekundärantikörper gegen humanes IgG ist Cy3 gekoppelt und hier rot dargestellt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt.

4.1.6.2 Bindung an Rattenvorderwurzelzupfnervpräparaten

Bindungsassays an Rattenvorderwurzelzupfnervpräparaten wurden mit den Seren beider IgG-Patienten sowie zweier gesunder Kontrollpersonen durchgeführt. Diese Versuche dienten vor allem dazu, das Bindungsverhalten an autonome Fasern zu untersuchen, da beide IgG-Patienten an einer autonomen Symptomatik litten.

Bei den gesunden Kontrollpersonen ließ sich keine Bindung nachweisen. Demgegenüber fand sich sowohl bei IgG-Patient 1 als auch bei IgG-Patient 2 eine Bindung am paranodalen Axon der Ranvierschen Schnürringe aller Faserqualitäten der Rattenvorderwurzelzupfnervpräparate.

Die unterschiedlichen Faserqualitäten der Vorderwurzeln können nach der Klassifikation von Erlanger und Gasser aus dem Jahr 1937 an Hand des Nervenfaserdurchmessers eingeteilt werden (Brandes et al., 2019, Seite 80; Erlanger & Gasser, 1937). Diese Klassifikation wurde auch im Rahmen der hier beschriebenen Bindungsassays angewandt. Bei den dünnsten Fasern mit einem Durchmesser von 3 μm handelt es sich um die präganglionären autonomen Typ B Fasern. Bei den größten Fasern mit einem Durchmesser von etwa 15 μm handelt es sich um die motorischen A α Fasern. Die mittelgroßen A γ Fasern haben einen Durchmesser von etwa 5 μm und sind für die Vermittlung des Lagesinnes zuständig. Unser Interesse bei den Bindungsassays an Rattenvorderwurzeln lag auf Grund der autonomen Symptomatik der IgG-Patienten vor allem auf den kleinen Typ B Fasern.

In der folgenden Abbildung 17 sind Fotos der Bindungsassays mit den Seren der beiden IgG-Patienten abgebildet, wobei jeweils Bindungen an unterschiedlichen Faserqualitäten zu sehen sind. Die Typ B Fasern mit dem kleinsten Durchmesser sind jeweils mit einem Pfeil markiert.

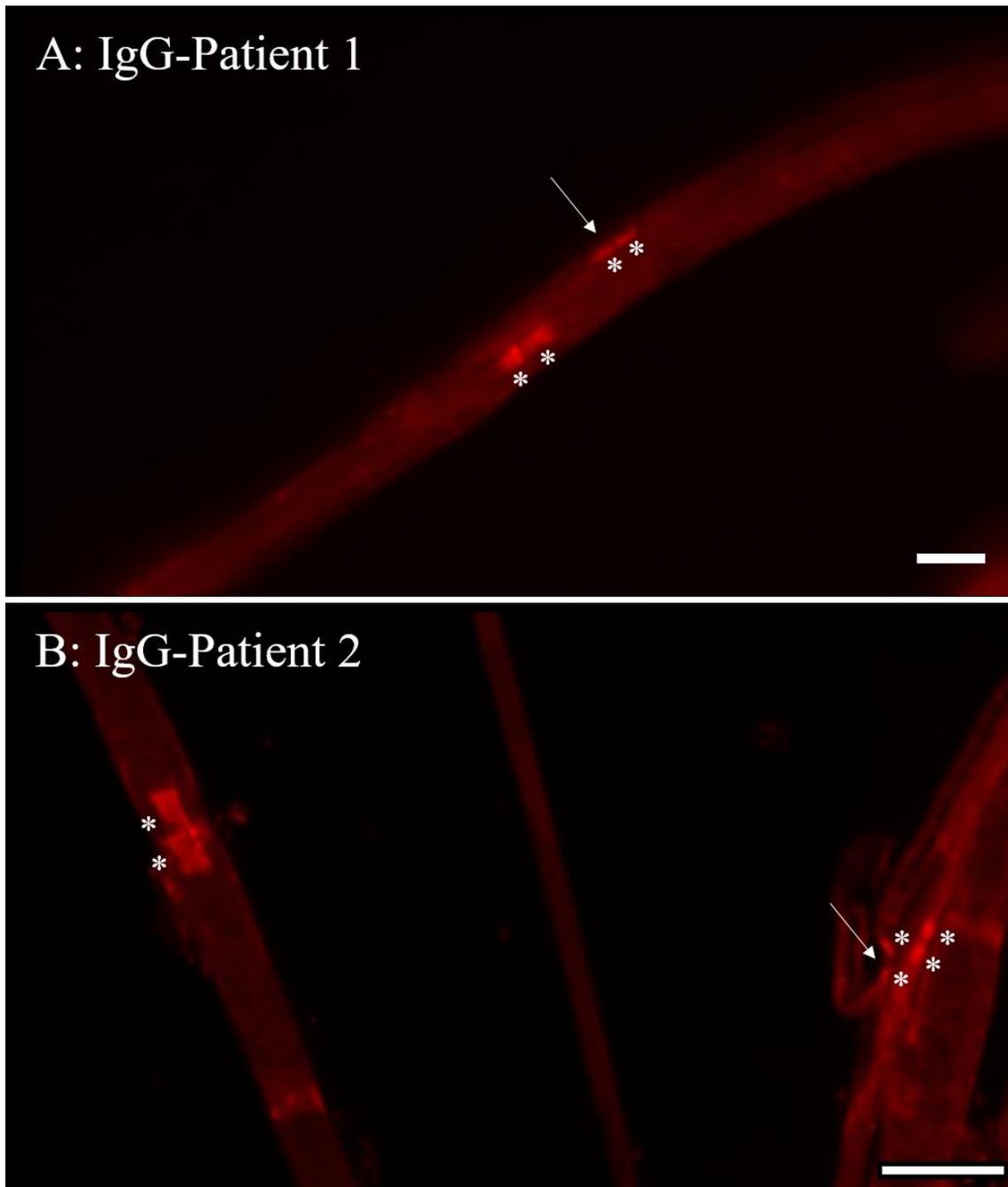


Abbildung 17: Bindungsassays an Rattenvorderwurzelzupfnervpräparaten

Eine Bindung am paranodalen Axon ist jeweils mit einem Stern (*) markiert. Sowohl bei IgG-Patient 1 als auch bei IgG-Patient 2 zeigt sich die Bindung an Nervenfasern mit unterschiedlichem Durchmesser. Die präganglionären autonomen Typ B Fasern sind nach der Klassifikation von Erlanger und Gasser die kleinsten Fasern. Die Nervenfasern mit dem kleinsten Durchmesser sind hier jeweils mit einem Pfeil markiert. Der Maßstab in Bild A beträgt 10 μm , der Maßstab in Bild B 20 μm .

4.1.6.3 Bindung an Ischiadicuszupfnervpräparaten mit zuvor an transfizierten HEK-293-Zellen präinkubierten Seren

Zum Nachweis der Spezifität der Autoantikörper und um Hinweise darauf zu finden, ob bei IgG-Patient 1 eine oder zwei verschiedene Arten von Autoantikörper vorliegen, wurden Bindungsassays an Ischiadicuszupfnerven mit präinkubierten Seren durchgeführt. Die Seren der beiden IgG-Patienten bzw. einer gesunden Kontrollperson wurden an HEK-293-Zellen präinkubiert. Diese HEK-293-Zellen waren zuvor mit Contactin-1-, Neurofascin-155- oder Neurofascin-186-Protein transfiziert worden. Dieser Versuch wurde nur einmalig durchgeführt.

Bei der gesunden Kontrolle änderte sich das Bindungsverhalten im Vergleich zu nicht präinkubiertem Serum nicht.

Bei IgG-Patient 1 war nach Präinkubation an mit Contactin-1 transfizierten Zellen eine ausgeprägte Bindung am paranodalen Axon der Ranvierschen Schnürringe nachweisbar. Nach Präinkubation an mit Neurofascin-155 transfizierten Zellen war keine Bindung mehr am Ranvierschen Schnürring nachweisbar. Nach Präinkubation an mit Neurofascin-186 transfizierten Zellen war hingegen eine Bindung am paranodalen Axon der Ranvierschen Schnürringe nachweisbar, die allerdings weniger stark ausgeprägt war als nach Präinkubation an mit Contactin-1 transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass alle Autoantikörper an das Neurofascin-155- Protein banden, während nur ein Teil der Autoantikörper an Neurofascin-186-Protein band. Diese Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass IgG-Patient 1 zwei Autoantikörper mit unterschiedlichen Epitopen bildet. Auf diese Hypothese wird in der Diskussion näher eingegangen.

Bei IgG-Patient 2 war sowohl nach Präinkubation an mit Contactin-1 transfizierten Zellen als auch nach Präinkubation an mit Neurofascin-186 transfizierten Zellen eine ausgeprägte Bindung am paranodalen Axon nachweisbar. Nach Präinkubation an mit Neurofascin-155 transfizierten Zellen zeigte sich hingegen keine Bindung. Aus diesen Ergebnissen ließ sich folgern, dass die Autoantikörper von IgG-Patient 2 nur an Neurofascin-155-Protein banden, was sich auch mit den Ergebnissen aus den ELISA-Untersuchungen sowie aus den Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen deckte.

Abbildung 18 zeigt Fotos der Bindungsassays mit präinkubierten Seren.

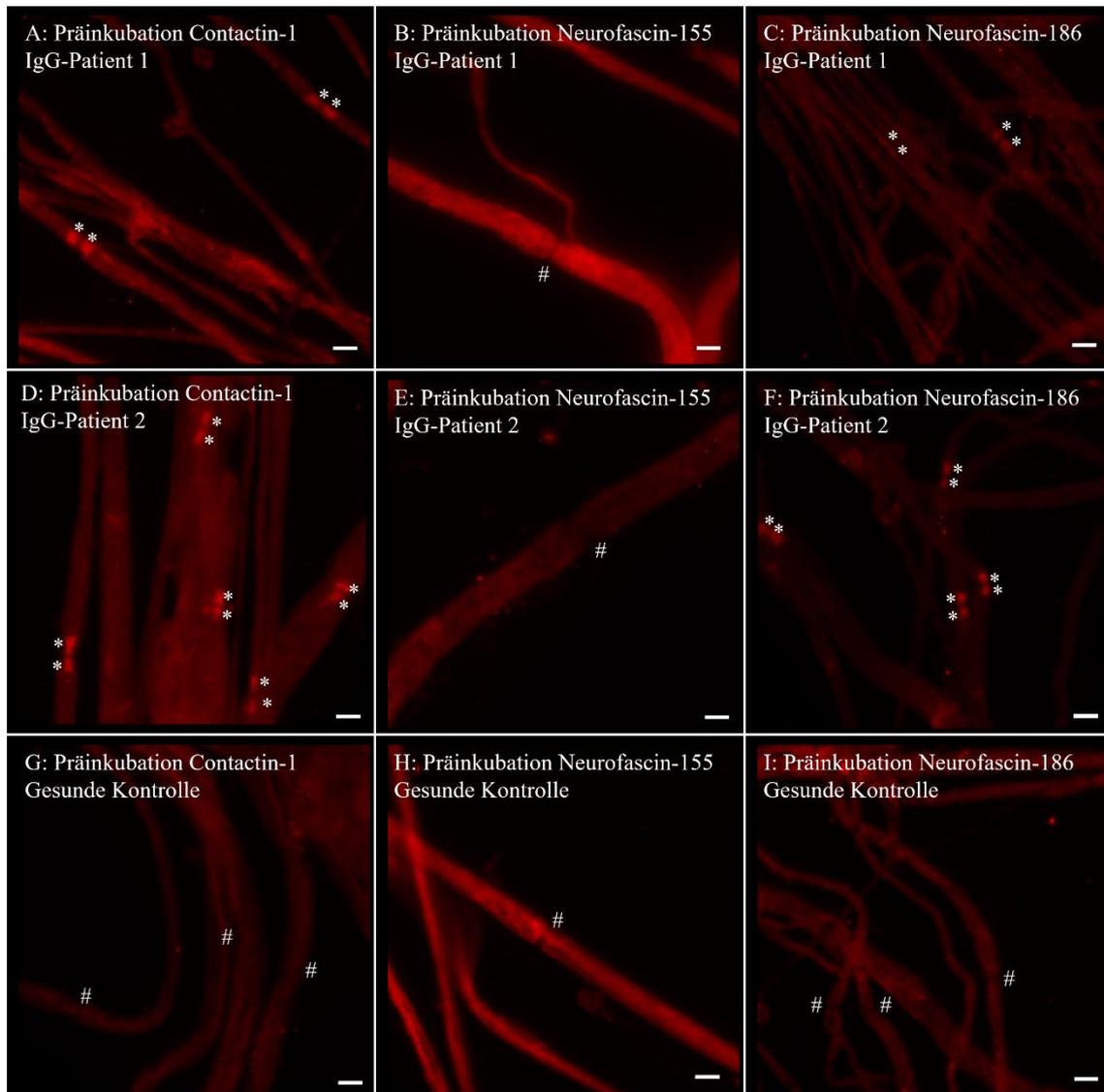


Abbildung 18. Bindungsassays an Ischiadicuszupfnervpräparaten mit präinkubierten Seren

Eine Bindung am paranodalen Axon ist jeweils mit einem Stern (*) markiert. Unauffällige Ranviersche Schnürringe ohne Bindung sind mit einer Raute (#) markiert. Es ist jeweils angegeben, mit welchem Protein die Zellen transfiziert worden waren, an denen die Präinkubation durchgeführt wurde und welches Serum eingesetzt wurde. Der Maßstab beträgt jeweils 10 μm .

4.1.7 Klinisches Bild und Therapieansprechen von Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die beiden Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern. Alle Angaben wurden aus den Arztbriefen der behandelnden ÄrztInnen entnommen.

Tabelle 25: Überblick über allgemeine Daten der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern

Allgemeine Daten	IgG-Patient 1	IgG-Patient 2
Diagnose	CIDP	CIDP
Erfüllung der INCAT-Kriterien	✓	✓
Geschlecht	♂	♂
Alter bei Erkrankungsbeginn	71	28

Tabelle 26: Überblick über klinische Aspekte der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern

Klinische Aspekte	IgG-Patient 1	IgG-Patient 2
Motorische Symptome	Tetraplegie	distal betonte Paresen
Sensible Symptome	Pallanästhesie, distale Hypästhesie	neuropathische Schmerzen
Hirnnervenbeteiligung	Ausfall nahezu aller Hirnnerven, Locked-In-Symptomatik	Ø
Autonome Symptomatik	Reanimationspflichtigkeit nach Lagerungsversuch	Ausgeprägte orthostatische Hypotension, Pollakisurie, Hyperhidrose
Beatmungspflichtigkeit	mehrere Monate beatmet	Ø
Tremor	Ø	Ausgeprägter Tremor
Therapieansprechen	kaum klinische Verbesserung unter Therapien mit IVIG, Plasmapheresen, Immunadsorptionen, Glukokortiko- steroidpuls und Rituximab	nur leichte Verbesserung unter Therapien mit IVIG, Glukokortikosteroidpuls, Plasmapherese und Rituximab
Krankheitsverlauf	akuter Beginn mit fulminantem Verlauf, Tod in Folge einer Sepsis zehn Monate nach Erkrankungsbeginn	nur diskrete Verbesserungen bei chronischem Verlauf

Tabelle 27: Überblick über elektrophysiologische Untersuchungsergebnisse der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern

Elektrophysiologische Untersuchungsergebnisse	IgG-Patient 1	IgG-Patient 2
N. suralis Amplitude NLG	/	Ø RA
N. tibialis (m) Amplitude DML NLG F-Wellen-Latenz	Erstwerte wie hier beschrieben später Ø RA ↓↓↓↓ ↑↑ ↓↓ Ø F-Wellen	Ø RA
N. medianus (m) Amplitude DML NLG F-Wellen-Latenz	proximal ↓↓↓↓, distal Ø RA ↑↑↑↑ / Ø F-Wellen	/
N. medianus (s) Amplitude NLG	/	Ø RA
N. ulnaris (m) Amplitude DML NLG F-Wellen-Latenz	Erstwerte wie hier beschrieben, später Ø RA ↓↓↓↓ ↑↑↑↑ ↓↓ Ø F-Wellen	proximal ↓↓↓↓, distal ↓↓↓ ↑↑↑ ↓↓↓ Ø F-Wellen
N. ulnaris (s) Amplitude NLG	/	Ø RA
Elektromyographie	pathologische Spontanaktivität	pathologische Spontanaktivität

N. = Nervus, m = motorisch, s = sensibel, NLG = Nervenleitgeschwindigkeit, DML = distal motorische Latenz, RA = Reizantwort, ↔ = normwertig, ↓ = um bis zu 25 % des Normalwertes vermindert, ↓↓ = um bis zu 50 % des Normalwertes vermindert, ↓↓↓ = um bis zu 75 % des Normalwertes vermindert, ↓↓↓↓ = um über 75 % des Normalwertes vermindert, ↑ = auf bis zu 125 % des Normwertes verlängert, ↑↑ = auf bis zu 150 % des Normwertes verlängert, ↑↑↑ = auf bis zu 175 % des Normwertes verlängert, ↑↑↑↑ = auf über 175 % des Normwertes erhöht, / = keine elektrophysiologische Untersuchung dieses Nerven bzw. keine Angabe dieser Werte

Tabelle 28: Überblick über invasive Untersuchungsergebnisse der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern

Invasive Diagnostik	IgG-Patient 1	IgG-Patient 2
Liquordiagnostik	zytalbuminäre Dissoziation	zytalbuminäre Dissoziation
Zellzahl	1 / µl	4 / µl
Eiweiß	90,7 mg/dl	201,1 mg/dl
Schädigungsmuster		
Nervus suralis Biopsie	axonal	nicht durchgeführt

Tabelle 29: Überblick über experimentelle diagnostische Ergebnisse der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern

Experimentelle diagnostische Ergebnisse	IgG-Patient 1	IgG-Patient 2
Paranodal axonale Bindung im Ischiadicuszupfnervpräparat	✓	✓
Autoantikörpernachweis im ELISA		
Neurofascin-155	✓	✓
Neurofascin-186	✓	∅
Neurofascin-140	✓	∅
Dominierende IgG-Subklassen	IgG3 > IgG2	IgG4 > IgG2
C1q-Bindung im Komplementbindungsassay	✓	✓
Bindung an HEK-Zellen		
Neurofascin-155	✓	✓
Neurofascin-186	✓	∅
Bindung an cerebelläre murine Neurone	✓	✓
Bindung an autonome Typ B Fasern im Rattenvorderwurzelzupfnervpräparat	✓	✓
Paranodal axonale Bindung im Ischiadicuszupfnervpräparat nach Präinkubation	keine Bindung nach Präinkubation an Neurofascin-155, abgeschwächte paranodal axonale Bindung nach Präinkubation an Neurofascin-186	keine Bindung nach Präinkubation an Neurofascin-155, unveränderte paranodal axonale Bindung nach Präinkubation an Neurofascin-186

✓ = positives Ergebnis im jeweiligen Experiment, ∅ = negatives Ergebnis im jeweiligen Experiment

4.1.7.1 IgG-Patient 1

IgG-Patient 1 ist ein männlicher Patient, der im Alter von 71 Jahren an einer CIDP mit GBS-artigem Beginn erkrankte. Es bestanden internistische Vorerkrankungen unter anderem ein Diabetes mellitus Typ II sowie ein normofrequentes Vorhofflimmern

Vor Beginn der Symptomatik sei kein erinnerlicher Infekt aufgetreten. Bei Aufnahme zeigte sich in der neurologischen Untersuchung eine Tetraparese, eine Areflexie, ein fraglich positives Babinskizeichen beidseits sowie eine Pallanästhesie an allen Extremitäten. In der Lumbalpunktion zeigte sich eine zytalbuminäre Dissoziation, wobei es zu einer artifiziellen Blutbeimengung kam. In der Labordiagnostik zeigten sich die Gangliosid-Autoantikörper und auch die Campylobacter-jejuni-Serologie negativ. In der experimentellen Labordiagnostik konnten Neurofascin-155, Neurofascin-186 sowie Neurofascin-140 Autoantikörper nachgewiesen werden. In der elektrophysiologischen Untersuchung waren verlängerte distal motorische Latenzen, verminderte motorische Amplituden, reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten und ein F-Wellen Verlust auffällig. In einer Verlaufsuntersuchung zeigten sich in der Elektroneurographie keine Reizantworten und in der elektromyographischen Untersuchung war pathologische Spontanaktivität mit Fibrillationen sowie positiven scharfen Wellen nachweisbar. In einer Biopsie des Nervus suralis war eine mittelgradige Neuropathie vom überwiegend axonalen Typ ohne entzündliche Prozesse mit einer obliterierende Mikroangiopathie endo- und epineuraler Blutgefäße nachweisbar und es zeigten sich einzelne erweiterte Ranviersche Schnürringe. Zur Abklärung einer paraneoplastischen Genese war ein PET-CT durchgeführt worden. Hier wurde zunächst ein asymmetrisch gesteigerter Glukosestoffwechsel mit malignitätsverdächtigem Charakter im Hypopharynx beschrieben, der in einer Verlaufsuntersuchung nicht mehr nachweisbar war.

Therapeutisch erfolgte direkt bei Aufnahme die Intubation und Beatmung, da der Patient das Bild einer respiratorischen Globalinsuffizienz bot. Es wurde eine Therapie mit IVIG über fünf Tage begonnen, worunter die Symptomatik jedoch progredient bis zur Tetraplegie war und sich auch eine Hirnnervenbeteiligung mit Paresen der Hirnnerven VI., VII und der kaudalen Hirnnerven ausbildete. Unter folgenden Plasmapheresetherapien besserten sich die Hirnnervenparesen kurzzeitig.

Der Patient entwickelte unter der Therapie mehrere Komplikationen. Im Rahmen einer Lagerung wurde der Patient reanimationspflichtig, wobei unter Reanimation wieder ein stabiler Kreislauf hergestellt werden konnte. Außerdem entwickelte der Patient ein progredientes Nierenversagen, das eine Dialysetherapie erforderlich machte. Weiterhin kam es wiederholt zu Pneumonien.

Bei Verlegung in die erste Rehabilitationsbehandlung bestanden bei einem wachen Patienten eine Tetraplegie mit Areflexie und Locked-In-Symptomatik sowie eine respiratorische Partialinsuffizienz. In der Rehabilitationsklinik kam es erneut zu einem Kreislaufeinbruch, allerdings am ehesten im Rahmen einer Sepsis mit pneumogenem Fokus.

Der Patient wurde zur therapeutischen Immunadsorption, wiederholt in die Akutklinik aufgenommen. Unter Plasmapheresen und Rituximabtherapie kam es zu einer leichten Besserung, sodass wenig Spontanbewegung der Arme und Finger sowie eine Beatmung im CPAP-Modus möglich war. Eine Methylprednisolonpulstherapie führte zu keiner Besserung. Die folgende Tabelle zeigt wie sich unter den verschiedenen Therapien die Titer der nachgewiesenen Autoantikörper, die Subklassen und das Bindungsverhalten an Ischiadicuszupfnerven in den eingesandten Serumproben verhielten.

Tabelle 30: Übersicht über Ergebnisse der experimentellen Diagnostik des IgG-Patient 1 in zeitlichem Zusammenhang mit den durchgeführten Therapien

Verlauf experimentelle Diagnostik	Therapien in zeitlichem Zusammenhang	Titer NF-155-IgG	Titer NF-186-IgG	Dominierende Subklasse	Bindung im Ischiadicuszupfnervpräparat
Zwei Monate nach Erkrankungsbeginn	nach IVIG einen Monat zuvor und dreimaliger Plasmapherese zwei Wochen zuvor	1:4000	1:2000	IgG3 > IgG2	Bindung am paranodalen Axon
Drei Monate nach Erkrankungsbeginn	dreimalig Plasmapherese einen Monat zuvor	1:100	1:100	IgG3	leichte Bindung am paranodalen Axon

Fünf Monate nach Erkrankungsbeginn	dreimalig Immunadsorption zwei Monate zuvor	1:1000	1:100	IgG3	Verdünnung 1:100 ausgeprägte Bindung am paranodalen Axon und Bindung an Schmid- Lanterman-Einkerbungen, Verdünnung 1:500 dezente Bindung am paranodalen Axon
Sechs Monate nach Erkrankungsbeginn	Rituximabgabe einen Monat zuvor	1:100	1:100	IgG3	ausgeprägte Bindung am paranodalen Axon und leichte Bindung an Schmid- Lanterman-Einkerbungen
Sechs Monate nach Erkrankungsbeginn	vor erneuter Plasmapherese	1:100	unter Grenzwert	IgG3	ausgeprägte Bindung am paranodalen Axon
Sechs Monate nach Erkrankungsbeginn	nach dreimaliger Plasmapherese	unter Grenzwert	unter Grenzwert	/	Verdünnung 1:100 minimale Betonung am paranodalen Axon Verdünnung 1:500 keine Bindung im Bereich des Ranvierschen Schnürringes
Acht Monate nach Erkrankungsbeginn		1:200	1:100	IgG3	deutliche Bindung am paranodalen Axon und Bindung an Schmid- Lanterman-Einkerbungen

Falls in der Spalte Bindung im Ischiadicuszupfnervpräparat keine Verdünnungen angegeben wurden, beziehen sich die Ergebnisse sowohl auf die Verdünnung 1:100 als auch auf die Verdünnung 1:500. NF = Neurofascin

Wie in Tabelle 30 ersichtlich ist, persistierte trotz zeitweise sehr niedriger Titer eine ausgeprägte Bindung am paranodalen Axon und es war auch eine Bindung an den Schmid-Lanterman-Einkerbungen zu beobachten. Die Abbildung 19 zeigt die Bindung am paranodalen Axon in einem Serum sechs Monate nach Erkrankungsbeginn, wobei der Titer im Neurofascin-155-ELISA lediglich 1:100 betragen hatte, außerdem wird die Bindung an den Schmid-Lanterman-Einkerbungen in einem Serum acht Monate nach Erkrankungsbeginn gezeigt.



Abbildung 19: Bindungsassay an Ischiadicuszupfnervpräparaten in Verlaufsseren von IgG-Patient 1

Eine Bindung am paranodalen Axon ist jeweils mit einem Stern (*) markiert. Eine Bindung an die Schmid-Lantermann-Einkerbungen ist mit einem Plusymbol (+) markiert. EB = Erkrankungsbeginn. Der Maßstab beträgt jeweils 10 µm.

Nachfolgend zeigt Abbildung 20 Bindungsassays mit Seren vor und nach Plasmapheresetherapien sechs Monate nach Erkrankungsbeginn. Während vor der Plasmapherese noch eine ausgeprägte Bindung am paranodalen Axon sichtbar war, zeigte sich mit dem Serum nach der Plasmapherese keine Bindung im Bereich der Ranvierschen Schnürringe. Somit waren die Autoantikörper im Serum nach Plasmapherese mittels Bindungsassays an Ischiadicuszupfnerven nicht mehr nachweisbar.

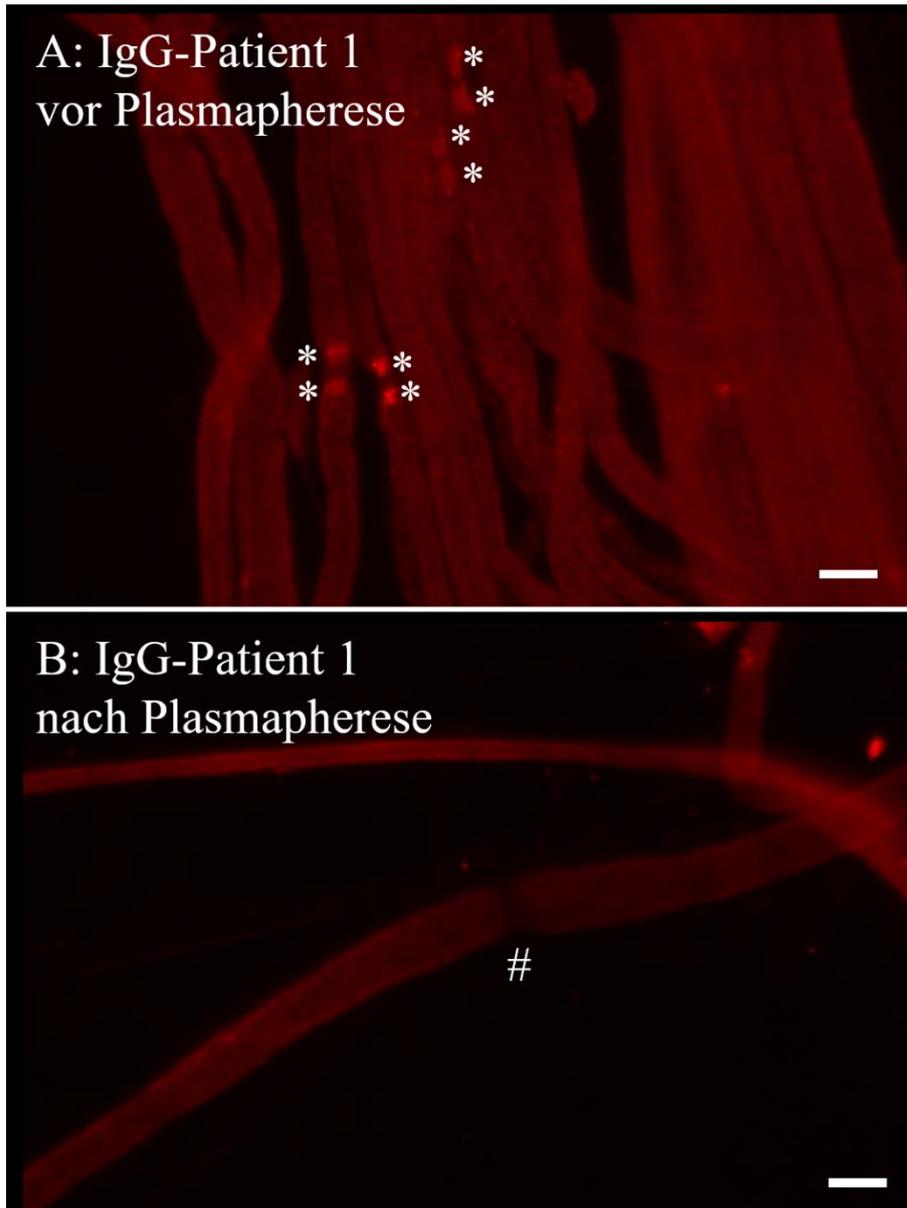


Abbildung 20: Bindungsassays an Ischiadicuszupfnervpräparaten mit Seren vor bzw. nach Plasmapheresetherapien von IgG-Patient 1

Eine Bindung am paranodalen Axon ist jeweils mit einem Stern (*) markiert. Ein unauffälliger Ranvierscher Schnürring ohne Bindung ist mit einer Raute (#) markiert. Der Maßstab beträgt jeweils 10 μm .

Im Verlauf kam es bei IgG-Patient 1 unter rezidivierenden Pneumonien zu einer zunehmenden Belüftungsstörung mit steigenden Entzündungswerten, die auch auf wiederholte antibiotische Therapien nicht ansprachen. Der Patient entwickelte letztlich im Rahmen einer Sepsis eine ausgeprägte Hypotonie, woraufhin er verstarb.

4.1.7.2 IgG-Patient 2

IgG-Patient 2 ist ein männlicher Patient, der seit dem Alter von 25 Jahren an einer CIDP mit GBS-artigem Beginn leidet. An Begleiterkrankungen bestanden bei Erkrankungsbeginn eine arterielle Hypertonie sowie eine depressive Episode.

Die Symptomatik habe nach einem Auslandsaufenthalt mit Missempfindungen in den Beinen begonnen. Im Verlauf der folgenden drei Monate entwickelten sich zunächst distale und dann auch proximale Paresen sowie eine Gangunsicherheit. In der klinisch-neurologischen Untersuchung fanden sich ein sehr unsicheres Gangbild, Paresen der Beine mit Kraftgraden 4/5 sowie eine Sensibilitätsstörung beider Unterschenkel. In der damals durchgeführten Liquordiagnostik bot sich das Bild einer zytalbuminären Dissoziation. Labordiagnostisch fanden sich Hinweise auf eine ausgeheilte Hepatitis-B-Virus-Infektion. In der initialen elektroneurographischen Untersuchung bestanden Hinweise auf eine Demyelinisierung mit verlängerten distal motorischen Latenzen, verlangsamten Nervenleitgeschwindigkeiten sowie nicht abgrenzbaren F-Wellen. Daraufhin wurde zunächst die Verdachtsdiagnose eines GBS gestellt und eine fünftägige Therapie mit IVIG begonnen. Die Symptomatik besserte sich kurzzeitig, verschlechterte sich jedoch dann so ausgeprägt, dass der Patient nur noch mit Hilfe eines Rollator gehfähig war. Nach erneuter elektrophysiologischer Untersuchung wurde die Diagnose einer CIDP gestellt.

Trotz regelmäßiger IVIG-Gaben verschlechterte sich die Symptomatik. Der Patient beklagte zunehmend schmerzhaftes Dysästhesien. Es trat ein ausgeprägtes End-of-Dose-Phänomen auf, sodass das Applikationsintervall zunächst von sechs auf vier Wochen und letztlich auf drei Wochen verkürzt wurde.

Zwei Jahre nach Erkrankungsbeginn verschlechterte sich die Symptomatik deutlich, sodass der Patient zeitweise auf einen Rollstuhl angewiesen war. Außerdem auffällig waren ein ausgeprägter Intentionstremor sowie eine neu aufgetretene autonome Störung mit Hyperhidrose, Pollakisurie, veränderter Hautfarbe, Blutdruckschwankungen und einer ausgeprägten orthostatischen Hypotension, die auch zu einer orthostatischen Synkope führte. Die Schmerzen in der unteren Extremität gab der Patient in einer Intensität von 7/10 auf der numerischen Rating-Skala an.

In der dann durchgeführten neurologischen Untersuchung zeigte sich ein sehr unsicheres Gangbild mit Steppergang beidseits bei einem am Rollator gehfähigen Patienten. Es waren eine distale Schwäche bis zur Plegie, Atrophien der Unterschenkel, eine Areflexie, ein starker Intentionstremor sowie pseudoathetotische Bewegungen der Hände auffällig. In der Untersuchung der Sensibilität gab der Patient strumpf- sowie handschuhförmige Hypästhesien bis zur Anästhesie an den Fußsohlen, sowie eine strumpfförmige Hyperalgesie beidseitig an. Außerdem wurden auffallend kalte Füße dokumentiert. Elektrophysiologisch waren in der unteren Extremität keine Reizantworten ableitbar und im N. ulnaris fand sich ein möglicher Leitungsblock. In der experimentellen Diagnostik ließen sich Neurofascin-155-IgG-Autoantikörper mit einem Titer von 1:6000 überwiegend der Subklassen IgG4 und IgG2 nachweisen.

Als Eskalationstherapie wurde eine Therapie mit Plasmapheresen über fünf Tage sowie einer anschließenden Gabe von Rituximab eingeleitet. Der Patient entwickelte in zeitlichem Zusammenhang mit der Rituximabgabe Arzneimittlexantheme, sodass die Verabreichung teilweise verschoben oder unterbrochen werden mussten. Der Patient bemerkte nach der Rituximabgabe nur eine diskrete Besserung seines Tremors sowie ein Ausbleiben des End-of-Dose-Phänomen nach der Gabe von IVIG.

Insgesamt verbesserte sich die Symptomatik in den folgenden Monaten nur leichtgradig. In einem dann erneut eingesandten Serum waren Neurofascin-155-Autoantikörper mit einem Titer von 1:10.000 nachweisbar (Titerbestimmung von Bianca Fiebig durchgeführt).

4.2 Neurofascin-IgM-Autoantikörper

Nachdem in den vorausgehenden Kapiteln auf die Ergebnisse bezüglich der Neurofascin-IgG-Autoantikörper eingegangen wurde, werden im Folgenden die Ergebnisse bezüglich der Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper dargestellt. Teilweise wurden die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Promotion gesammelt wurden, bereits veröffentlicht (Doppler et al., 2018).

4.2.1 Testung auf IgM-Autoantikörper mittels ELISA

Für die Detektion (para-)nodaler IgM-Autoantikörper wurden ELISA Untersuchungen durchgeführt. Alle PatientInnen, die eine zu einer (Para-)nodopathie passende klinische Symptomatik zeigten, wurden mittels ELISA auf Neurofascin-155-IgM Autoantikörper (n=223) sowie auf Contactin-1-IgM-Autoantikörper (n=233) untersucht. Da wir ein nicht kommerziell verfügbares Neurofascin-186-Protein verwendeten, das nur beschränkt verfügbar war, konnten nur PatientInnen mit schwerer Symptomatik sowie alle PatientInnen mit nachgewiesenen Neurofascin-155-IgM Autoantikörpern auf Neurofascin-186-IgM-Autoantikörper untersucht werden (n=54).

4.2.1.1 Nachweis von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern bei drei PatientInnen

Für Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper lag der Grenzwert der optischen Dichte bei 0,428. Drei der PatientInnen aus dem getesteten PatientInnenkollektiv zeigten eine optische Dichte, die deutlich über dem Grenzwert lag. Die Patienten mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpernachweis werden im Folgenden als IgM-PatientInnen bezeichnet. IgM-Patient 1 ist ein CIDP-Patient, dessen Serum im Neurofascin-155-IgM ELISA eine optische Dichte von 0,984 aufwies. IgM-Patient 2 ist ein Patient bei dem der klinische Verdacht auf eine CIDP ohne Erfüllung der INCAT-Diagnosekriterien bestand. Das Serum des Patienten 2 wurde zugesandt und die optische Dichte im Neurofascin-155-IgM ELISA lag bei 0,826. IgM-Patientin 3 ist eine Patientin mit sensomotorischer Polyneuropathie, deren Serum im Neurofascin-155-IgM ELISA eine optische Dichte von 0,671 aufwies. Vorausgegangene Serumproben von IgM-Patientin 3 waren bereits im Rahmen der Promotion von Dr. Luise Appeltshauser getestet worden und zeigten auch zweieinhalb Jahre vor der Durchführung dieser Arbeit bereits erhöhte optische Dichten bei der Testung auf Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper. Abbildung 21 zeigt die optischen Dichten für alle im Neurofascin-155-IgM ELISA getesteten PatientInnen und Kontrollen.

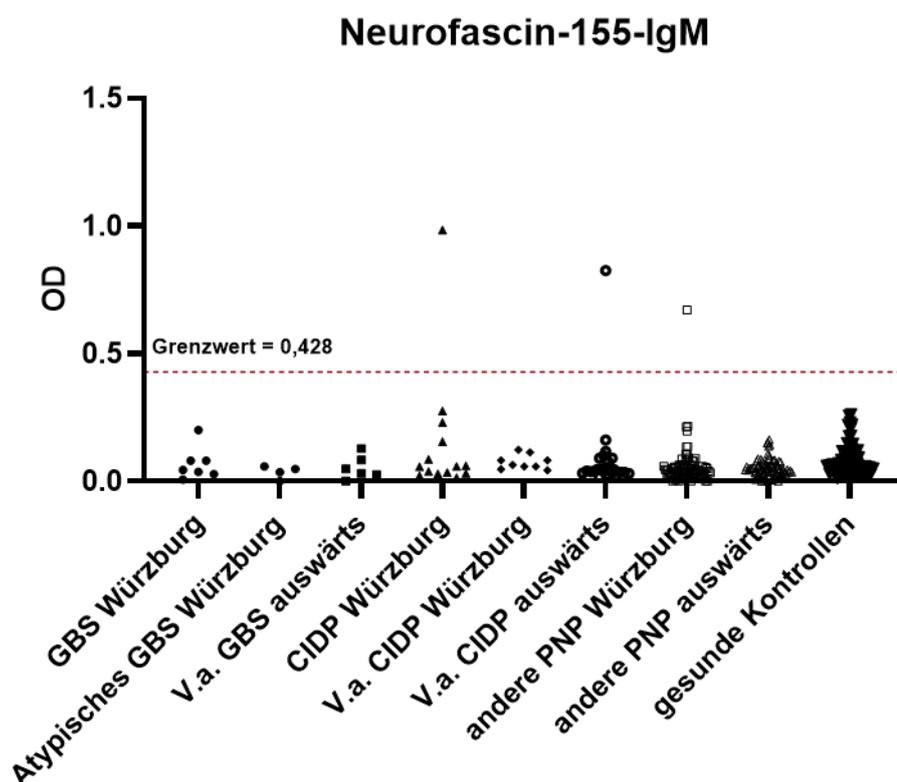


Abbildung 21: Streudiagramm Neurofascin-155-IgM ELISA

Auf der x-Achse sind die PatientInnengruppen und auf der y-Achse die einzelnen optischen Dichten (=OD) der PatientInnen und Kontrollen dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für ein positives Ergebnis, das bei einer optischen Dichte von 0,428 liegt. Ein CIDP-Patient aus Würzburg, ein auswärtiger Patient mit V.a. CIDP und eine Patientin mit einer anderen Form einer PNP zeigten eine über den Grenzwert erhöhte optische Dichte.

Neben den drei PatientInnen, bei denen im Rahmen dieser Promotionsarbeit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper detektiert wurden, wurden durch Dr. Luise Appeltshauer zwei weitere Patienten mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern mittels ELISA identifiziert. Es handelt sich um einen männlichen GBS-Patienten mit Erkrankungsbeginn im Alter von 42 Jahren, der im Folgenden als IgM-Patient 4 bezeichnet wird, und einen CIDP-Patienten mit Erkrankungsbeginn im Alter von 40 Jahren und langjährigem Verlauf, der als IgM-Patient 5 bezeichnet wird. Alle weiteren Experimente bezüglich Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern wurden somit die Seren von insgesamt fünf PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern verwendet.

4.2.1.2 Kein Nachweis von Neurofascin-186- und Contactin-1-IgM-Autoantikörpern

Für Neurofascin-186-IgM-Autoantikörper lag der Grenzwert bei einer optischen Dichte von 0,175. Die optischen Dichten für Neurofascin-186-IgM aller getesteten PatientInnen lagen unter dem Grenzwert, sodass bei keinem der getesteten PatientInnen Neurofascin-186-IgM-Autoantikörper nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 22).

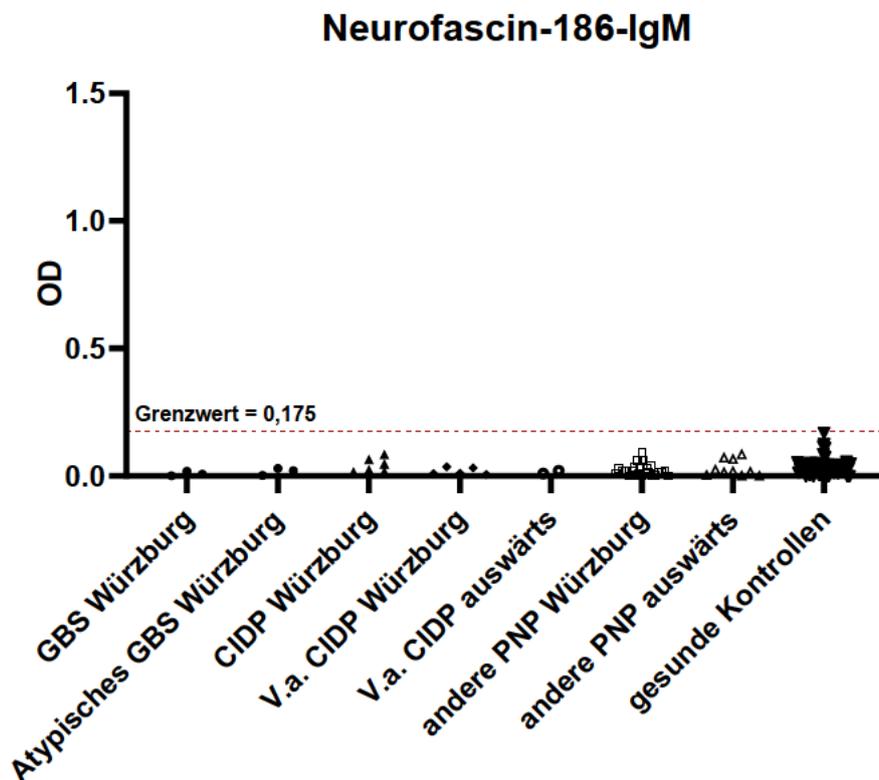


Abbildung 22: Streudiagramm Neurofascin-186-IgM ELISA

Auf der x-Achse sind die PatientInnengruppen und auf der y-Achse die einzelnen optischen Dichten (=OD) der PatientInnen und Kontrollen dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für ein positives Ergebnis, das bei einer optischen Dichte von 0,175 liegt. Keiner der PatientInnen zeigte eine über den Grenzwert erhöhte optische Dichte

Für Contactin-1-IgM-Autoantikörper lag der Grenzwert bei einer optischen Dichte von 0,228. Eine auswärtige Patientin zeigte einen mit 0,314 leicht über den Grenzwert erhöhte optische Dichte, was wir auf Grund der nur leichten Erhöhung als unspezifisch werteten. Abbildung 23 zeigt die optischen Dichten aller auf Contactin-1-IgM-Autoantikörper getesteten PatientInnen und Kontrollen.

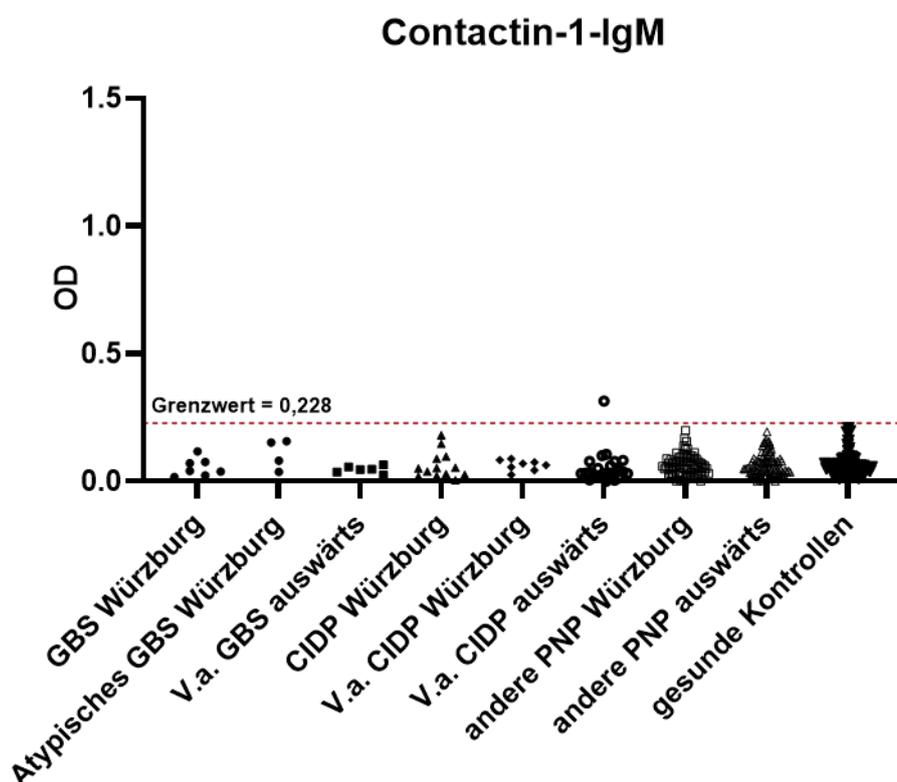


Abbildung 23: Streudiagramm Contactin-1-IgM ELISA

Auf der x-Achse sind die PatientInnengruppen und auf der y-Achse die einzelnen optischen Dichten (=OD) der PatientInnen und Kontrollen dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für ein positives Ergebnis, das bei einer optischen Dichte von 0,228 liegt. Die Erhöhung der optischen Dichte auf 0,314 einer Patientin mit V.a. CIDP werteten wir als unspezifisch.

4.2.2 Bestimmung des Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpertiters mittels ELISA

Um den Titer der Autoantikörper zu bestimmen, wurden verschiedene Verdünnungen des Serums der PatientInnen getestet. Der Titer ergab sich aus der höchsten Verdünnung, bei der die optische Dichte im ELISA über dem Grenzwert lag. Die Titer der PatientInnen lagen zwischen 1:100-1:400. Die jeweiligen Titer der Patienten sind in der folgenden Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Titer der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

PatientInnen	IgM-Patient 1	IgM-Patient 2	IgM-Patientin 3	IgM-Patient 4	IgM-Patient 5
Titer	1:400	1:200	1:100	1:100	1:100

4.2.3 Nachweis der Spezifität von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern durch Präinkubation an ELISA-Platten

Um die Spezifität der Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper nachzuweisen, wurden die Seren der IgM-PatientInnen an ELISA-Platten präinkubiert, die zuvor entweder mit Neurofascin-155-Protein oder mit Contactin-1-Protein beschichtet worden waren. Bei den Seren aller PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern zeigte sich nach der Präinkubation an mit Neurofascin-155-Protein beschichteten Platten ein deutlicher Abfall der optischen Dichte im Neurofascin-155-IgM-ELISA. War das Serum hingegen an mit Contactin-1-Protein beschichteten Platten präinkubiert worden, zeigten sich für die optische Dichte vergleichbare Werte wie bei nicht präinkubiertem Serum. Auch für gesunde Kontrollen wurden diese Präinkubationen durchgeführt. Die optische Dichte zeigte bei den Kontrollen jeweils nahezu identische Werte, unabhängig ob natives oder an Contactin-1- bzw. Neurofascin-155-Protein präinkubiertes Serum verwendet worden war. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Neurofascin-155-IgM Autoantikörper spezifisch an Neurofascin-155-Protein binden. In der folgenden Abbildung 24 sind die jeweiligen optischen Dichten im Neurofascin-155-IgM ELISA dargestellt.

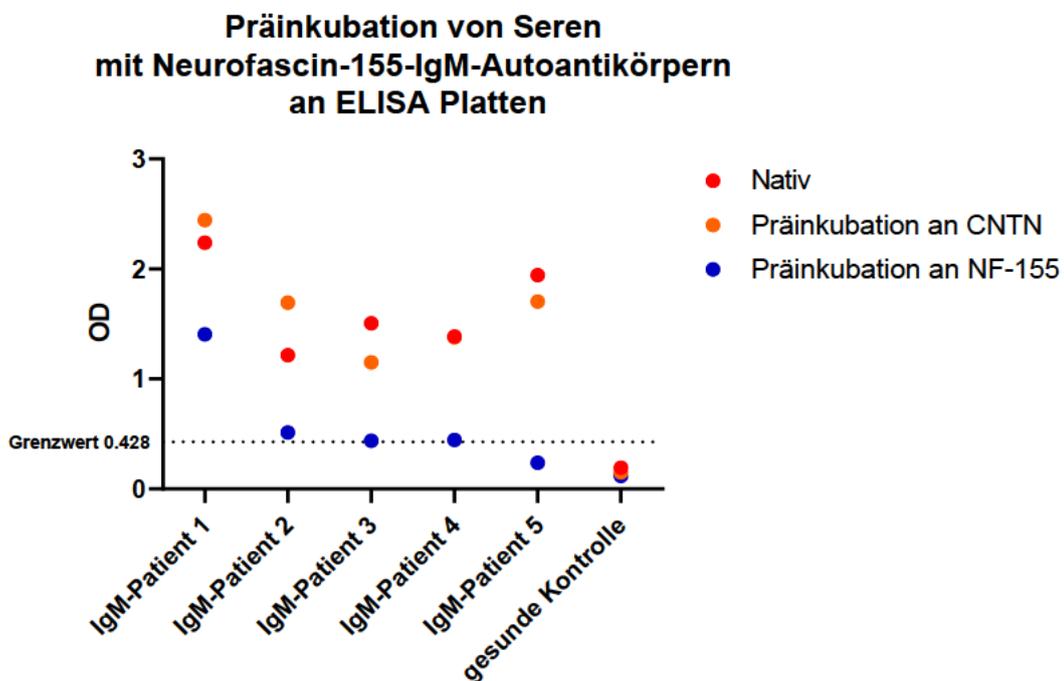


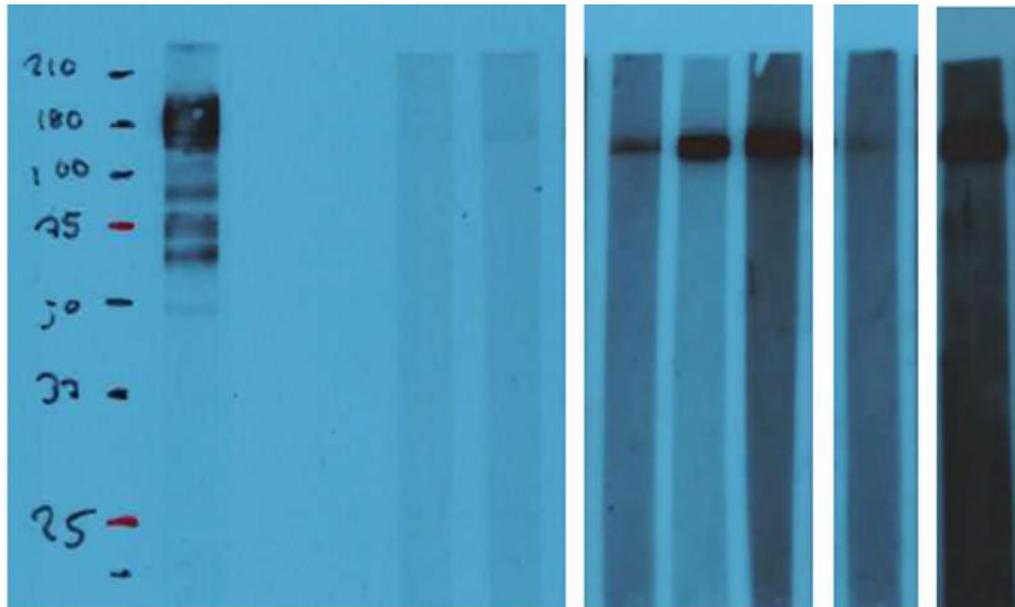
Abbildung 24: Präinkubation von Seren mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern an ELISA Platten

Auf der x-Achse sind die einzelnen PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern sowie eine gesunde Kontrolle dargestellt. Auf der y-Achse sind die jeweiligen optischen Dichten im Neurofascin-155-IgM-ELISA abgebildet. Die roten Punkte repräsentieren nicht präinkubiertes Serum. Bei den orangen Werten wurde das Serum an mit Contactin-1-Protein beschichteten Platten, bei den blauen Werten an mit Neurofascin-155-Protein beschichteten Platten präinkubiert.

4.2.4 Bestätigung der Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper mittels Western Blot

Western Blots wurden eingesetzt, um Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper zu bestätigen, die zuvor bereits im ELISA nachgewiesen worden waren. Neben den Seren von PatientInnen, bei denen im Neurofascin-155-IgM ELISA Autoantikörper nachgewiesen worden waren, wurde auch das Serum von zwei gesunden Kontrollpersonen getestet.

Als Positivkontrolle wurde ein kommerzieller polyklonaler Neurofascin-Autoantikörper eingesetzt, der unter anderem bei 155 kDa eine deutliche Bande zeigte. Als Negativkontrolle wurden die verwendeten Sekundärantikörper jeweils separat getestet, wobei sich bei diesen jeweils keine spezifische Bande zeigte, womit das unspezifische Vorhandensein von Banden auf Grund der Sekundärantikörper ausgeschlossen werden konnte. Bei den gesunden Kontrollen zeigte sich ebenfalls keine spezifische Bande, sondern lediglich etwas Hintergrundfärbung. Bei den IgM-Patienten 1,2, 4 und 5 zeigte sich eine deutliche und reproduzierbare Bande bei 155 kDa, was das Vorhandensein von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern bestätigte. Bei IgM-Patientin 3 zeigte sich die Bande bei 155 kDa nur angedeutet. Wir führten diese weniger sichtbare Bande auf die geringe Konzentration von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern im Serum der IgM-Patientin 3 zurück, da IgM-Patientin 3 auch im ELISA die niedrigste optische Dichte verglichen mit den anderen IgM-Patienten zeigte. Abbildung 25 zeigt die Testung im Western Blot.



Positivkontrolle: Anti-Neurofascin

Negativkontrolle: anti-Rabbit

Negativkontrolle: anti-Human-IgM

Gesunde Kontrolle 1

Gesunde Kontrolle 2

IgM-Patient 1

IgM-Patient 2

IgM-Patient 4

IgM-Patient 3

IgM-Patient 5

Abbildung 25: Western Blot zum Nachweis von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

Unter jeder Spur ist angegeben, welches Serum bzw. was als Positiv- oder Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die Proteinleiter stellt das Proteingewicht in kDa dar. Bei den IgM-Patienten 1,2,4 und 5 ist eine spezifische Bande bei 155 kDa zu sehen. Der polyklonale Neurofascin Antikörper der als Positivkontrolle eingesetzt wurde, zeigt mehrere Banden, eine von diesen liegt bei 155 kDa.

4.2.5 Keine C1q-Bindung im ELISA-basierten Komplementbindungsassay

Es wurden ELISA-basierte C1q-Komplementbindungsassays mit den Seren aller IgM-PatientInnen sowie mit den Seren gesunder Kontrollpersonen durchgeführt. Es wurden jeweils mit Neurofascin-155- bzw. mit Contactin-1-Protein beschichtete Platten eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Patient mit hochtitrig nachgewiesenen Neurofascin-IgG-Autoantikörpern. Die Positivkontrolle zeigte im Komplementbindungsassay an mit Neurofascin-155 beschichteten Platten eine ausgeprägte C1q-Bindung. Die optischen Dichten der IgM-PatientInnen zeigten sich im Vergleich zu den optischen Dichten von gesunden Kontrollpersonen nicht erhöht. Für die PatientInnen, in deren Serum Neurofascin-155-IgM Autoantikörper nachgewiesen worden waren, ließ sich somit keine Komplementbindung nachweisen. Wir führten dies auf die niedrigen Titer unserer PatientInnen zurück.

4.2.6 Klinisches Bild und Therapieansprechen von PatientInnen mit Neurofascin-IgM-Autoantikörpern

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern.

Tabelle 32: Überblick über allgemeine Daten der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

Allgemeine Daten	IgM-Patient 1	IgM-Patient 2	IgM-Patientin 3	IgM-Patient 4	IgM-Patient 5
Diagnose	CIDP	V.a. CIDP	V.a. CIDP	GBS	CIDP
Erfüllung der INCAT-Kriterien	✓	nein	nein	/	✓
Geschlecht	♂	♂	♀	♂	♂
Alter bei Erkrankungsbeginn	37	76	22	42	40

Tabelle 33: Überblick über klinische Aspekte der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

Klinische Aspekte	IgM-Patient 1	IgM-Patient 2	IgM-Patientin 3	IgM-Patient 4	IgM-Patient 5
Zeitlicher Zusammenhang mit Infektion	Ø	Ø	Exazerbation während Infekten	respiratorischer Infekt zwei Wochen zuvor	Ø
Klinik Motorisch	distal betonte Tetraparese, Areflexie, rollstuhl-pflichtig	distal betonte Tetraparese, Muskelatrophie, Faszikulationen	distal betonte Tetraparese,	schwere Tetraparese, Areflexie	distal betonte Tetraparese, Muskelatrophie, Faszikulationen
Sensibel	aufsteigende Hyp- und Dysästhesie, neuropathische Schmerzen	distale Hypästhesie, neuropathische Schmerzen	distale Hypästhesie, neuropathische Schmerzen	Hypästhesie, neuropathische Schmerzen	distale Hypästhesie (20 Jahre nach Erkrankungsbeginn)
Weiteres	invalidisierende sensible Ataxie	sensible Ataxie	Urininkontinenz	Beatmungspflichtigkeit, autonome Dysfunktion	/
Tremor	Aktions- und Haltetremor	rechtsbetonter Intentionstremor	Ø	Ruhe- und Haltetremor (ein Jahr nach akuter Erkrankung)	Haltetremor
Beginn	akut	chronisch	akut	akut	chronisch
Krankheitsverlauf	schubförmig mit vollständiger Erholung	langsam fortschreitend	schubförmig mit Erholung	monophasisch	langsam fortschreitend

Tabelle 34: Überblick über elektroneuro- sowie elektromyographische Untersuchungsergebnisse der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

Elektrophysiologische Untersuchungsergebnisse	IgM-Patient 1	IgM-Patient 2	IgM-Patientin 3	IgM-Patient 4	IgM-Patient 5
N. suralis	Ø RA	Ø RA			Ø RA
Amplitude			↓	↔	
NLG			↔	↔	

N. tibialis (m)		Ø RA			
Amplitude	↓↓↓↓		↓↓	↓	↓↓↓
DML	↑↑↑↑		↔	↑↑	↑↑↑↑
NLG	↓↓		↔	↔	↓
F-Wellen-Latenz	Ø F-Wellen		↓	Ø F-Wellen	Ø F-Wellen
N. peroneus (m)				/	/
Amplitude	↓↓↓↓	↓↓	↓		
DML	↑↑↑↑	↔	↔		
NLG	↓↓↓	↓	↔		
F-Wellen-Latenz	Ø F-Wellen	Ø F-Wellen	/		
N. medianus (m)					
Amplitude	↓↓↓	↓↓	↔	↓↓	↓↓
DML	↑↑↑↑	↑	↔	↑↑↑↑	↔
NLG	↔	↔	↔	↓	↓
F-Wellen-Latenz	Ø F-Wellen	Ø F-Wellen	70 % F-Wellen Persistenz	↑↑↑↑	↔
N. medianus (s)	Ø RA			Ø RA	
Amplitude		↓↓↓	↔		↓↓
NLG		↓	↔		↓↓
N. ulnaris (m)	/		/		
Amplitude		↓↓↓↓		↓	↓↓
DML		↑↑		↔	↔
NLG		↔		↔	↔
F-Wellen-Latenz		↑↑		↑	Ø F-Wellen
N. ulnaris (s)	/		/		
Amplitude		↓↓↓		↓↓↓	↓↓↓
NLG		↓		↓	↓
Elektromyographie	Spontanaktivität	Spontanaktivität bei Erkrankungsbeginn	Spontanaktivität	Spontanaktivität	Spontanaktivität

Werte größtenteils aus Publikation entnommen (Doppler, Stengel et al. 2018))

N. = Nervus, m = motorisch, s = sensibel, NLG = Nervenleitgeschwindigkeit, DML = distal motorische Latenz, RA = Reizantwort, ↔ = normwertig, ↓ = um bis zu 25 % des Normalwertes vermindert, ↓↓ = um bis zu 50 % des Normalwertes vermindert, ↓↓↓ = um bis zu 75 % des Normalwertes vermindert, ↓↓↓↓ = um über 75 % des Normalwertes vermindert, ↑ = auf bis zu 125 % des Normwertes verlängert, ↑↑ = auf bis zu 150 % des Normwertes verlängert, ↑↑↑ = auf bis zu 175 % des Normwertes verlängert, ↑↑↑↑ = auf über 175 % des Normwertes erhöht, / = keine elektrophysiologische Untersuchung dieses Nerven bzw. keine Angabe dieser Werte

Tabelle 35: Überblick über invasive Untersuchungsergebnisse der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

Invasive Diagnostik	IgM-Patient 1	IgM-Patient 2	IgM-Patientin 3	IgM-Patient 4	IgM-Patient 5
Liquordiagnostik	zytalbuminäre Dissoziation	zytalbuminäre Dissoziation	unauffällig	unauffällig	leichte zytalbuminäre Dissoziation
Zellzahl	6 / μ l	2 / μ l	2 / μ l	3 / μ l	1 / μ l
Eiweiß	741 mg/dl	103,9 mg/dl	31 mg/dl	37 mg/dl	58 mg/dl
Biopsie Nervus- suralis Schädigungsmuster	mittelgradig axonal	geringgradig axonal	mittelgradig axonal	/	gemischt de- myelinisierend und hochgradig axonal
Entzündliche Aktivität	V.a. vaskulitische Komponente	Ø	V.a. vaskulitische Komponente	/	vaskulitische Infiltrate
Hautbiopsie des Unterschenkels Intraepidermale Nervenfaserdichte	4,9 mm (↓)	/	8,9 mm (↔)	5,6 mm (↓)	/
(Para-)nodale Architektur (Darstellung CASPR; Neurofascin, Natriumkanäle, Länge der Ranvierschen Schnürringe)	unauffällig (frisch gezapfte Nervenfaser einer Suralisbiopsie)	/	unauffällig (frisch gezapfte Nervenfaser einer Suralisbiopsie)	unauffällig (myelinisierte Fasern einer Hautbiopsie)	/

↓ = leichte Reduktion, ↔ = normwertig, / = nicht durchgeführt

Tabelle 36: Überblick über experimentelle diagnostische Ergebnisse der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

Experimentelle diagnostische Ergebnisse	IgM-Patient 1	IgM-Patient 2	IgM-Patientin 3	IgM-Patient 4	IgM-Patient 5
Autoantikörpertiter	1:400	1:200	1:100	1:100	1:100
Autoantikörper-nachweis im Verlauf	Ø Autoantikörper-Nachweis bei klinisch vollständiger Erholung	/	1:100 in mehreren Proben über drei Jahre	Ø Autoantikörper-Nachweis bei klinischer Besserung	in Verlaufsserum nach 8 Jahren weiterhin nachweisbar
Autoantikörper-Nachweis im Western Blot	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv

Tabelle 37: Überblick über therapeutisches Ansprechen der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

Therapie-ansprechen	IgM-Patient 1	IgM-Patient 2	IgM-Patientin 3	IgM-Patient 4	IgM-Patient 5
Glukokortikosteroide	geringe Besserung	/	Ø Effekt	/	Ø Effekt
IVIG	Ø Effekt	geringe Besserung	langsame Besserung	Verschlechterung nach Ende der Therapie	geringe Besserung
Plasmapherese	sehr gutes Ansprechen	/		sehr gutes Ansprechen mit vollständiger Erholung	gutes Ansprechen
Rituximab	sehr gutes Ansprechen und Erhalt der vollständigen Erholung	/		/	

Nachfolgend wird an dieser Stelle ein kurzer zusammenfassender Überblick gegeben, bevor in den folgenden Kapiteln auf die einzelnen Verläufe der IgM-PatientInnen eingegangen wird.

Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper waren bei einem Patienten mit GBS sowie bei vier PatientInnen mit CIDP nachweisbar, wobei nur zwei der vier CIDP-PatientInnen die INCAT-Diagnosekriterien erfüllten. An gemeinsamen Symptomen traten eine distal betonte Tetraparese (5/5), neuropathische Schmerzen (4/5) und ein Tremor auf (4/5). Die IgM-Patienten 1 und 4 zeigten eine Remission der Erkrankung, wobei die Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper dann nicht mehr nachweisbar waren. Bei IgM-Patientin 3 verbesserte sich die Erkrankung unter IVIG-Therapie zunächst kaum und Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper waren in mehreren Serumproben über drei Jahre hinweg nachweisbar. Als sich IgM-Patientin 3 deutlich besserte und die IVIG-Therapie pausiert werden konnte, wurde leider kein Verlaufsserum zur Testung auf Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper eingesandt. Bei IgM-Patient 2 wurde ebenfalls keine Verlaufspore eingesandt. IgM-Patient 5 zeigte einen chronisch progredienten Verlauf und die Neurofascin-155-IgM Autoantikörper waren sowohl 2012 als auch in einer Verlaufspore von 2020 nachweisbar (der Verlaufswert wurde zu diagnostischen Zwecken durch Katharina Starz erhoben).

4.2.6.1 IgM-Patient 1

IgM-Patient 1 ist ein männlicher Patient, bei dem im Alter von 37 Jahren eine CIDP auftrat. An Vorerkrankungen bestanden bei Erkrankungsbeginn eine arterielle Hypertonie, eine Migräne sowie ein lumbosakraler Bandscheibenvorfall.

Die Erkrankung manifestierte sich zunächst mit rasch aufsteigenden Kribbelparästhesien der Extremitäten, Rücken- und Kopfschmerzen sowie Probleme beim Gehen mit wiederholtem Stolpern. In der neurologischen Untersuchung fand sich eine Fußheber- sowie Fußsenkerparese beidseits sowie eine rechtsseitige Okulomotorius- und Fazialisparese. In der Liquordiagnostik zeigte sich eine zytalbuminäre Dissoziation. Bei V.a. Miller-Fisher Syndrom wurde eine Therapie mit IVIG eingeleitet. In der anschließenden Rehabilitationsbehandlung erholte sich der Patient so weit, dass er Treppen steigen konnte und eine berufliche Wiedereingliederung geplant wurde.

Wenige Tage nach Entlassung aus der Rehaklinik kam es allerdings zu einer erneuten Verschlechterung mit Problemen beim Laufen und Kribbelparästhesien. Bei einer leichten sensomotorischen Tetraparese sowie zytalbuminärer Dissoziation wurden Cortison sowie IVIG verabreicht, die zu keiner Besserung führten. Im Verlauf war der

Patient nicht mehr eigenständig gangfähig und auf einen Rollstuhl angewiesen. In der neurologischen Untersuchung zeigte sich dann eine Tetraparese, ein breitbasiger unsicherer Stand, nicht durchführbare Gangprüfungen, eine Areflexie, Sensibilitätsstörungen an allen Extremitäten mit Hyp- Par- sowie Dysästhesien, ein Aktions- sowie Haltetremor und eine ausgeprägte sensible Ataxie, die als invalidisierend beschrieben wurde.

In der umfassenden Labordiagnostik, die auch Serum- sowie Proteinelektrophorese und Immundefixation umfasste, fand sich ein leicht erhöhter ANA-Titer und grenzwertig erhöhte Anti-SSA (Ro). In der experimentellen Diagnostik auf (para-)nodale Autoantikörper zeigten sich über den Grenzwert erhöhte optische Dichten für Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper. In den elektrophysiologischen Untersuchungen waren massiv verlängerte distal motorische Latenzen, verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeiten sowie eine Verminderung der Amplituden auffällig. In der durchgeführten Biopsie des Nervus suralis wurden eine mittelgradige axonale Neuropathie und vermehrt T-Zellen im Bereich der epineuralen Gefäße sowie ein inhomogener Faserverlust nachgewiesen, was als Hinweis auf eine vaskulitische Komponente gewertet wurde. In einem auf Grund eines intermittierenden Schleiersehens durchgeführten ophtalmologischen Konsil wurde die Diagnose einer rechtsseitigen Papillenschwellung gestellt. Eine daraufhin durchgeführte kraniale Bildgebung mittels MRT ergab keine Auffälligkeiten.

Therapeutisch erfolgten sechs Zyklen Plasmapherese, woraufhin sich die Symptomatik des Patienten deutlich besserte. Außerdem wurde kurz vor Entlassung eine Therapie mit Rituximab begonnen, um einem erneuten Rezidiv vorzubeugen. Bei Entlassung bestanden lediglich leichtgradige Paresen der Fingerspreizer und die Sensibilitätsstörungen waren auf Fingerspitzen und Fußballen beschränkt.

Im Verlauf der folgenden Monate verbesserte sich sowohl klinisch als auch elektrophysiologisch deutlich, übte erneut seinen handwerklichen Beruf aus und gab an im Alltag uneingeschränkt leistungsfähig zu sein. Um diesen Therapieerfolg zu stabilisieren erfolgte eine Erhaltungstherapie mit Rituximab.

Die Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper, die während der akuten Krankheitsphase nachweisbar gewesen waren, waren bei dem symptomfreien Patienten dann nicht mehr detektierbar, was auch in Abbildung 26 veranschaulicht ist.

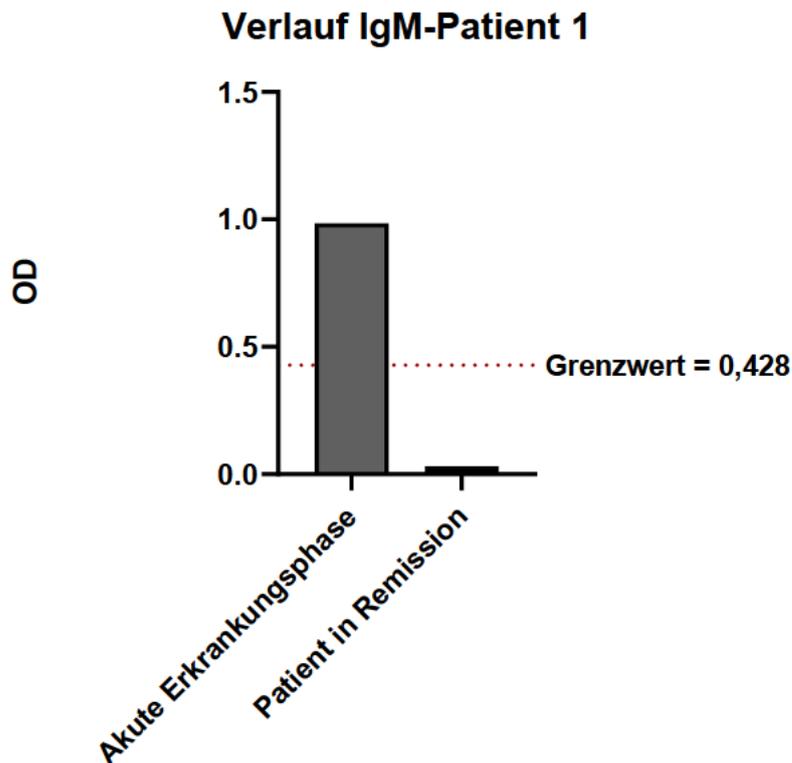


Abbildung 26: Neurofascin-155-IgM-ELISA Verlaufswerte von IgM-Patient 1

Auf der x-Achse sind zwei Verlaufswerte des Patienten abgebildet. Links wurde das Serum während der akuten Phase seiner Erkrankung getestet. Der rechte Wert wurde erhoben, als sich der Patient nach Plasmapherese sowie Rituximabtherapie in Remission befand. Auf der y-Achse die jeweiligen optischen Dichten (=OD) im Neurofascin-155-IgM ELISA dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für ein positives Ergebnis, das bei einer optischen Dichte von 0,428 liegt.

4.2.6.2 IgM-Patient 2

IgM-Patient 2 ist ein männlicher Patient mit der klinischen Diagnose einer CIDP, wobei die INCAT-Diagnosekriterien nicht erfüllt waren. Bei Einsendung des Serums war der Patient 76 Jahre alt, das Alter bei Erstdiagnose betrug circa 65 Jahre.

An weiteren neurologischen Vorerkrankungen litt der Patient an einer Claudicatio spinalis Symptomatik, die mittels einer Duralsackkompression chirurgisch behandelt worden war, und einem Restless-Legs-Syndrom.

Der Patient beklagte eine progrediente Schwäche der Beine und Arme sowie einschließende Krämpfe der Beine. Durch eine Unsicherheit beim Gehen kam es zu wiederholten Stürzen. Der Patient gab ein Taubheitsgefühl der Füße und belastungsabhängige Schmerzen der Arme mit stechendem, brennenden Charakter in einer Schmerzintensität von 4-9/10 auf der numerischen Rating-Skala an. Bereits seit mehreren Jahren war dem Patienten ein rechtsbetonter Intensionstremor aufgefallen. Die Symptomatik habe sich insgesamt deutlich verschlimmert, sodass der Patient seine Gartenarbeit habe aufgeben müssen.

In der neurologischen Untersuchung waren distal- links- und beinbetonte Paresen, Myokomien und Faszikulationen an Unterarmen sowie Oberschenkeln und außerdem Atrophien der Thenar- sowie der Unterschenkelmuskulatur auffällig. An der oberen Extremität zeigte sich eine Hypo- und an der unteren Extremität eine Areflexie. Außerdem bestand eine Sensibilitätsstörung mit Hypästhesie sowie Pallhypästhesie der Beine. Der Stand war sehr unsicher mit einer Fallneigung nach hinten bei geschlossenen Augen. In den laborchemischen Untersuchungen zeigte sich ein latenter Mangel an Vitamin B12, woraufhin eine Substitutionstherapie begonnen wurde. In der elektroneurographischen Untersuchung waren verlängerte distal motorische Latenzen, verzögerte F-Wellen, verminderte Nervenleitgeschwindigkeiten und eine Verminderung sowohl von motorischer als auch von sensibler Amplitude aufgefallen. In der Liquordiagnostik bot sich das Bild einer deutlichen zytalbuminären Dissoziation. In einer Biopsie des Nervus suralis war eine axonale Schädigung und kein sicherer Anhalt für eine entzündliche Genese gefunden worden.

Es wurde zur Behandlung der CIDP eine Therapie mit IVIG durchgeführt. In den zugesandten Briefen waren insgesamt 27 Zyklen dokumentiert worden. Der Patient gab an, dass sich die Symptomatik nach der Therapie initial bessere, dann aber wieder eine Verschlechterung erfolge. Insgesamt sei der Verlauf langsam progredient.

4.2.6.3 IgM-Patientin 3

Bei IgM-Patientin 3 bestand klinisch der Verdacht auf eine CIDP ohne Erfüllung der INCAT-Diagnosekriterien.

Die Patientin berichtete initial von brennenden sowie stechenden Schmerzen in einer Intensität von bis zu 9/10 auf der numerischen Ratingskala, einer Kraftminderung der Beine und einer Urgesymptomatik mit plötzlichem Harndrang. Anamnestisch auffällig war, dass die Patientin vor Entwicklung der Symptomatik im Rahmen einer Diät 25 kg Körpergewicht abgenommen habe.

Im neurologischen Untersuchungsbefund fanden sich Sensibilitätsstörungen mit Hypästhesien an allen Extremitäten und einer Hyperalgesie an den Oberschenkeln. Motorisch auffällig waren Krallenzehen und Hohlfüße sowie eine leichtgradige distal betonte Tetraparese. Erschwerte Gangprüfungen sowie einbeiniges Hüpfen waren nicht möglich. Die Untersuchungsbedingungen waren erschwert und es wurde wiederholt ein Give-Way-Phänomen sowie Wechselinnervation dokumentiert. Die Liquordiagnostik bot ein unauffälliges Bild. In der elektromyographischen Untersuchung fand sich ausgeprägte Spontanaktivität in den Arm- sowie Beinmuskeln. In der elektroneurographischen Untersuchung waren die Amplituden leicht vermindert. In der durchgeführten Biopsie des Nervus suralis war eine mittel- bis hochgradigen akute axonalen Neuropathie mit inhomogenem Faserverlust sowie etwas vermehrten Entzündungszellen an den epineuralen Gefäßen vereinbar mit einer vaskulitischen Komponente nachweisbar. In der ebenfalls durchgeführten Biopsie des Musculus vastus medialis zeigte sich eine leichtgradige neurogene Atrophie. In den durchgeführten Hautbiopsien an Unter- sowie Oberschenkel fand sich eine normale Nervenfaserdichte.

Im Verlauf fiel laborchemisch ein niedrig normaler Spiegel der Vitamine B6 sowie B12 auf, woraufhin eine Substitutionstherapie für beide Vitamine begonnen wurde. Zweimalige Glukokortikosteroidpulstherapien führten zu keiner Besserung, woraufhin wiederholt Therapien mit IVIG durchgeführt wurden.

Zeitweise war die Patientin auf einen Rollstuhl angewiesen oder benötigte Hilfe beim Ankleiden. Die neuropathischen Schmerzen erreichten teilweise Werte von 10/10 auf der numerischen Ratingskala. Im Verlauf berichtete die Patientin von einer Zunahme der Beschwerden nach grippalen Infekten sowie bei Kälte.

Unter IVIG-Therapie kam es zu einer leichten Besserung. Bei dem Versuch die IVIG-Dosis zu reduzieren kam es allerdings zu einer deutlichen Verschlechterung, sodass die

Behandlung zunächst in voller Dosis weitergeführt wurde. Nach fünf Jahren IVIG-Therapie sowie einer rehabilitativen Behandlung zeigte die Patientin eine deutliche Besserung ihres Allgemeinzustandes, in Folge dessen das Applikationsintervall verlängert werden konnte. Beim Gehen und Treppensteigen war die Patientin nicht mehr eingeschränkt. Die neuropathischen Schmerzen traten nur noch selten und dann in einer Intensität von 3-4/10 auf der numerischen Ratingskala auf. Es bestand noch eine leichte Hypästhesie an Unterschenkeln, Füßen und Fingerspitzen. In der neurologischen Untersuchung fanden sich nur leichte Paresen der Fingermuskulatur und in der elektrophysiologischen Untersuchung zeigte sich abgesehen von einer minimal reduzierten Amplitude ein normwertiger Befund. Bei stabilem Befund wurde die IVIG-Therapie pausiert. Sechs Monate nach der letzten IVIG-Gabe zeigte sich der Befund stabil und die Patientin berichtete, dass sie keine alltagsrelevanten Beschwerden habe, wieder wandere, Rad fahre und Vollzeit in ihrem Beruf tätig sei.

4.2.6.4 IgM-Patient 4

IgM-Patient 4 ist ein männlicher Patient, der im Alter von 42 Jahren ein GBS-Syndrom entwickelte, wobei die Brighton-Diagnosekriterien erfüllt waren.

Zwei Wochen vor der Aufnahme habe der Patient an einem grippalen Infekt gelitten. Initial seien ihm distale Kribbelparästhesien aufgefallen, dann habe er auch eine Schwäche beim Fahrradfahren und Treppensteigen sowie muskelkaterartige Schmerzen der Waden bemerkt. Im neurologischen Aufnahmebefund zeigte sich eine proximal betonte schlaffe Tetraparese sowie eine Areflexie. Es wurden Sensibilitätsstörungen mit einer Hypästhesie aller Extremitäten und außerdem Kribbelparästhesien der Füße und Hände angegeben. In der bei Aufnahme durchgeführten Lumbalpunktion konnte keine zytalbuminäre Dissoziation nachgewiesen werden. In der elektrophysiologischen Diagnostik zeigten sich deutlich verlängerte distal motorische Latenzen, sowie verlängerte F-Wellen Latenzen und eine Minderung der Amplituden. In einer elektrophysiologischen Verlaufsuntersuchung ergaben sich in den Neurographien keine sicheren Reizantworten und in der Elektromyographie war floride Spontanaktivität nachweisbar.

Zunächst wurde eine Therapie mit IVIG eingeleitet, nach deren Ende es zu einer zunehmenden Verschlechterung bis zur Tetraplegie und einer Beatmungspflichtigkeit

kam. Daraufhin wurden fünf Zyklen einer Plasmapheresetherapie durchgeführt. Der Patient entwickelte im Verlauf mehrere Komplikationen wie einen Pneumothorax sowie autonome Probleme mit Bradykardien und einer Herzfrequenzstarre, welche die Anlage eines externen Herzschrittmachers notwendig machten. Außerdem musste bei prolongierter Beatmung eine Trachealkanüle angelegt werden. Der Patient litt an ausgeprägten neuropathischen Schmerzen mit Kribbelparästhesien sowie Brenndysästhesien. Nebenbefundlich klagte der Patient über Verschwommensehen und im Rahmen eines ophthalmologischen Konsiles wurde die Diagnose einer beginnenden Expositionskeratopathie mit geringer Hornhauttrübung festgestellt.

Kurz nach der Aufnahme hatte die optische Dichte im Neurofascin-155-IgM Elisa 0,954 und eine Woche später 0,547 betragen, was jeweils über dem Grenzwert lag, womit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper nachweisbar waren. Kurz vor Verlegung in die Rehaklinik waren mit einer optischen Dichte von 0,081 keine Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper mehr nachweisbar.

Zehn Monate nach der akuten Erkrankung gab der Patient an, dass Atmen, Sprechen, Kauen sowie Schlucken wieder problemlos möglich sei und er eine Gehstrecke von circa einer Stunde bewältigen könne. Die Kraft verbesserte sich zunehmend, aber der Patient litt weiterhin an belastungsabhängigen neuropathischen Schmerzen der Füße. Der Patient berichtete, dass etwa ein Jahr nach der akuten Erkrankung ein sehr störendes Zittern der Hände aufgetreten sei. In der neurologischen Untersuchung ließ sich ein rechtsbetonter Ruhe- und Haltetremor verifizieren. Das Gangbild hatte sich zu diesem Zeitpunkt normalisiert und auch die Paresen hatten sich gebessert. Circa zwei Jahre nach der akuten Erkrankung arbeitete der Patient wieder in Vollzeit und konnte den Arbeitsweg von mehreren Kilometern mit dem Fahrrad zurücklegen. In der neurologischen wie auch in der elektrophysiologischen Untersuchung fand sich ein gebesserter Befund mit nur leichtgradigen distalen Paresen.

4.2.6.5 IgM-Patient 5

IgM-Patient 5 ist ein männlicher Patient, der im Alter von 40 Jahren an einer CIDP erkrankte. Er zeigte bei Verfassen der Monographie einen über insgesamt 36 Jahre langsam progredienten Verlauf. Zu Beginn manifestierte sich die Erkrankung rein motorisch mit Paresen, Faszikulationen, Atrophien, Areflexie und elektromyographisch

nachweisbarer pathologischer Spontanaktivität, weshalb die Verdachtsdiagnose einer Spinalen Muskelatrophie gestellt worden war.

Im Verlauf war die atrophe Tetraparese progredient und circa 20 Jahre nach Beginn der motorischen Symptome entwickelte sich zusätzlich eine sensible Beteiligung mit Hyp- und Parästhesien sowie ein rechtsbetonter Haltetremor. Da auch die Mutter anamnestisch an einem Tremor litt, wurde differentialdiagnostisch ein essentieller Tremor in Erwägung gezogen. Insgesamt berichtete der Patient, dass es bei Kälte zu einer Verschlechterung der Symptome komme. In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigte sich eine axonal demyelinisierende Neuropathie mit deutlich verlängerten distal motorischen Latenzen, verminderten Nervenleitgeschwindigkeiten sowie einer Amplitudenminderung und dem Nachweis von Leitungsblöcken. In der Liquordiagnostik war eine leichte zytalbuminäre Dissoziation nachweisbar. In der durchgeführten Biopsie des Nervus suralis fand sich das Bild einer schweren, gemischt-axonal-demyelinisierenden Neuropathie mit hochgradigen gefäßassoziierten Infiltraten, was zum Verdacht einer vaskulitischen Komponente führte. Auf Grund der diagnostischen Ergebnisse wurde die Diagnose einer CIDP gestellt.

Der Patient erhielt insgesamt 54 Gaben IVIG, worunter er die Komplikation einer massiven Lungenembolie erlitt. Die Gabe von IVIG wurde zunächst pausiert, dann aber fortgeführt, da der Patient eine leichte Besserung unter der IVIG-Therapie verspürt hätte. Er erhielt auch eine immunsuppressive Therapie mit Cellcept und Glukokortikosteroiden, die jedoch zu keiner Verbesserung führten. Unter Plasmapheresetherapie sei es zwischenzeitlich zu einer Verbesserung gekommen.

Insgesamt kam es zu einer langsamen Progredienz der Symptome. In einer Verlaufsuntersuchung berichtete der Patient, dass das Gehen auf Grund eines Stepperganges nur mit Peroneusschienen möglich sei und er durch eine im Dunkeln verstärkte Gangunsicherheit wiederholt gestürzt sei. Er gab auch eine ausgeprägte Schwäche der Hände an, sodass die Nutzung von Besteck sowie das Schließen von Knöpfen schwierig wären. Der Tremor würde Tätigkeiten mit der Hand zusätzlich erschweren. In der experimentellen Diagnostik ließen sich erneut niedrigtitrig Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper nachweisen (Bestimmung durch Katharina Starz).

4.3 Effekte von Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern verschiedener Subklassen auf cerebelläre Neurone und Spinalganglienneuronen

In den im Folgenden beschriebenen Experimenten wurden die Effekte von Contactin-1-Patientenantikörpern auf cerebelläre Neurone und Spinalganglienneurone untersucht. Es wurde das Serum von zwei PatientInnen eingesetzt, bei denen Contactin-1-IgG-Autoantikörper nachgewiesen worden waren, wobei bei CNTN-Patient 1 die Subklasse IgG3 und bei CNTN-Patientin 2 die Subklasse IgG4 dominierte (Appeltshauser, 2018).

4.3.1 Klinische Aspekte und Autoantikörpernachweis bei CNTN-PatientInnen

In diesem Gliederungspunkt wird ein kurzer Überblick über die beiden CNTN-PatientInnen 1 und 2 gegeben, wobei die Angaben aus der Promotion von Dr. Luise Appeltshauser übernommen wurden. Die genauen klinischen Verläufe der beiden Patienten sind in der Promotion von Dr. Luise Appeltshauser im Kapitel 5.6 (Appeltshauser, 2018) oder in einer ihrer Publikationen (Doppler et al., 2015b) einsehbar, wobei CNTN-Patientin 2 aus dieser Promotion Patientin 3 in den Arbeiten von Dr. Luise Appeltshauser und CNTN-Patient 1 Patient 1 entspricht.

Bei beiden PatientInnen wurden Contactin-1-IgG Autoantikörper mittels ELISA und mittels Bindungsassay an mit Contactin-1 transfizierten HEK-293-Zellen nachgewiesen.

CNTN-Patient 1 ist ein männlicher Patient, bei dem sich im Alter von 76 Jahren eine CIDP mit GBS-artigem Beginn manifestierte. Zusammenfassend litt er an einer proximal betonten Tetraparese mit sensibler Beteiligung und einer ausgeprägten Hirnnervenbeteiligung. Eine verminderte Vitalkapazität sowie eine vegetative Beteiligung machten eine Beatmung im Rahmen einer intensivmedizinischen Therapie erforderlich. Der Patient erlitt mehrere Komplikationen wie mehrere Aspirationspneumonien sowie eine Panzytopenie und verstarb vier Monate nach Manifestation der Erkrankung. Post mortem konnten Contactin-1-IgG-Autoantikörper mit einem Titer von 1:7.500 nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Prädominanz der Subklasse IgG3, wobei auch die Subklasse IgG4 in geringerem Ausmaß nachweisbar war.

Bei CNTN-Patientin 2 manifestierte sich im Alter von 61 Jahren eine CIDP mit GBS-artigem Beginn. Die Patientin litt an einer ausgeprägten Tetraparese, sodass sie zeitweise

auf einen Rollstuhl angewiesen war, und an einer Hirnnervenbeteiligung mit einer Fazialis- sowie einer inkompletten Okulomotoriusparese. Weitere Symptome waren Kribbelparästhesien und eine multimodale Sensibilitätsstörung mit sensibler Ataxie. Außerdem entwickelten sich im Verlauf ein Halte- sowie ein Intentionstremor. Im Serum waren Contactin-1-IgG-Autoantikörper mit einem Titer von 1:10.000 nachweisbar. Die dominierende IgG-Subklasse war IgG4 und es war auch ein wesentlich geringerer Anteil an IgG2- sowie IgG3-Autoantikörpern nachweisbar. Auf Grund des Autoantikörpernachweises erfolgte eine Rituximabtherapie, unter der sich die klinische Symptomatik der Patientin deutlich besserte und auch der Autoantikörpertiter abfiel.

4.3.2 Bindungsassays an murinen Neuronen

Mit den Seren der CNTN-PatientInnen 1 und 2 sowie einer gesunden Kontrollperson wurden Bindungsassays an fixierten cerebellären Körnerzellen und an fixierten Spinalganglienneuronen durchgeführt. Neben den Gesamt-IgG-Bindungsassays, die an beiden Typen von Neuronen durchgeführt wurden, wurden an cerebellären Neuronen auch subklassenspezifische Bindungsassays durchgeführt.

4.3.2.1 Gesamt-IgG-Bindung an cerebellären Neuronen und Spinalganglienneuronen

Sowohl bei CNTN-Patient 1 als auch bei CNTN-Patientin 2 zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung auf Gesamt-IgG eine deutliche Bindung an cerebelläre Neurone und auch an Spinalganglienneurone, während sich bei der Kontrollperson nur eine leichte Bindung zeigte, die wir als unspezifische Bindung durch IgG-Antikörper werteten (siehe Abbildung 27).

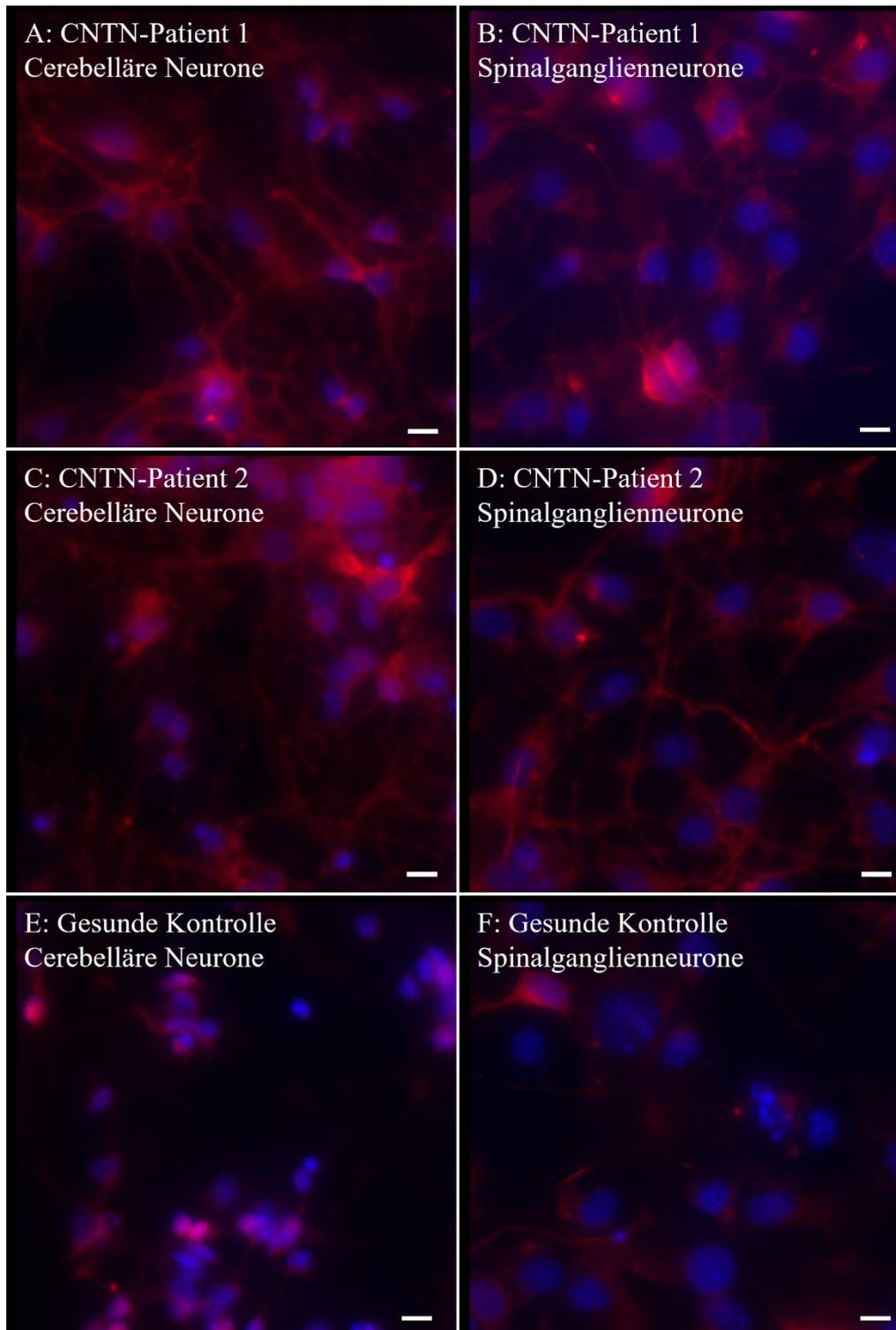


Abbildung 27: Bindungsassays an murinen cerebellären Neuronen und murinen Spinalganglienneuronen

CNTN-Patient 1 in Bild A und B sowie CNTN-Patientin 2 in Bild C und D zeigen eine deutliche Bindung an die murinen Neurone. Die gesunde Kontrolle in Bild E und F zeigt nur eine leichte unspezifische Bindung. Die cerebellären Neurone sind in der linken und die Spinalganglienneurone in der rechten Spalte dargestellt. Der Sekundärantikörper gegen humanes Gesamt-IgG ist Cy3-gekoppelt und hier rot dargestellt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt.

4.3.2.2 Subklassenspezifische Bindung an cerebellären Neuronen

Die Bindungsassays mit subklassenspezifischen Sekundärantikörpern wurden mit den Seren der zwei CNTN-PatientInnen sowie mit zwei gesunden Kontrollen an cerebellären Neuronen durchgeführt. Die subklassenspezifischen Bindungsassays wurden nur ein Mal durchgeführt. Da die FITC gekoppelten Sekundärantikörper sehr lichtempfindlich sind, war das Herstellen von Dokumentationsfotos deutlich erschwert, da die Präparate unter dem Mikroskop sehr schnell verblassten.

Für die Kontrollen zeigte sich für IgG1, IgG2 und IgG4 keine Bindung. Bei den IgG3 Bindungsassays zeigten die Kontrollen unspezifische Hintergrundfärbung. CNTN-Patient 1 zeigte eine deutliche Bindung im IgG3 spezifischen Bindungsassay und eine leichte Bindung im IgG4 spezifischen Bindungsassay. CNTN-Patientin 2 zeigte eine sehr ausgeprägte Bindung im IgG4 spezifischen Bindungsassay und eine leichte Bindung im IgG1 spezifischen Bindungsassay. Somit war bei beiden CNTN-PatientInnen für die überwiegend im Serum vorhandenen Subklassen von IgG auch eine Bindung an cerebelläre Neurone erkennbar. Dokumentationsfotos sind für CNTN-Patient 1 in Abbildung 28 und für CNTN-Patientin 2 in Abbildung 29 dargestellt, wobei als Vergleich jeweils der jeweilige subklassenspezifische Bindungsassay einer gesunden Kontrolle diente.

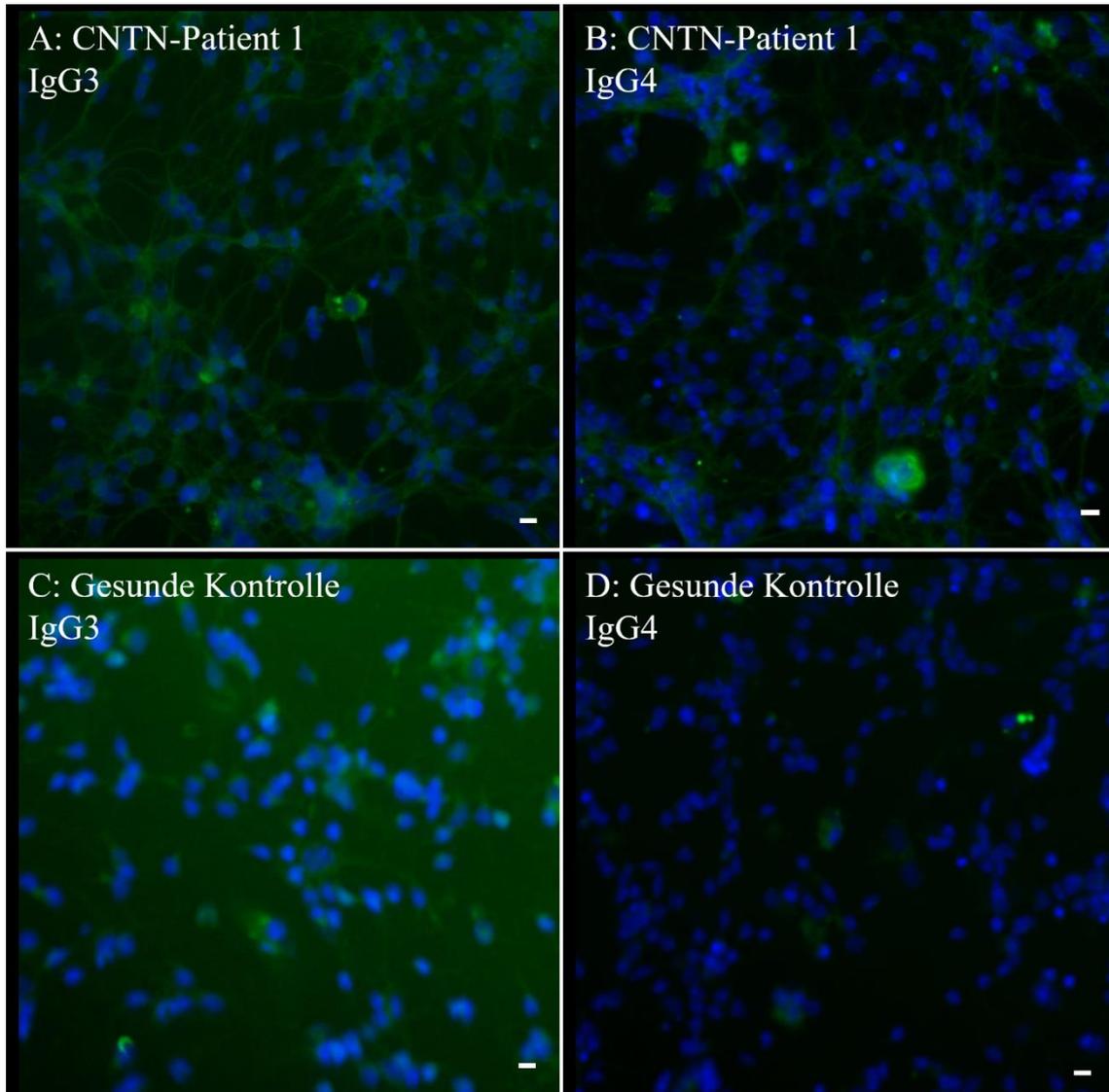


Abbildung 28: Subklassenspezifische Bindungsassays IgG3 sowie IgG4 von CNTN-Patient 1 und einer gesunden Kontrolle an cerebellären Neuronen

Die Bindungsassays von CNTN-Patient 1 sind in der oberen Zeile und die Bindungsassays der gesunden Kontrolle in der unteren Zeile abgebildet. Es ist jeweils angegeben, welcher subklassenspezifische Bindungsassay durchgeführt wurde. Der Sekundärantikörper gegen die jeweilige IgG-Subklasse ist FITC gekoppelt und hier grün dargestellt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt.

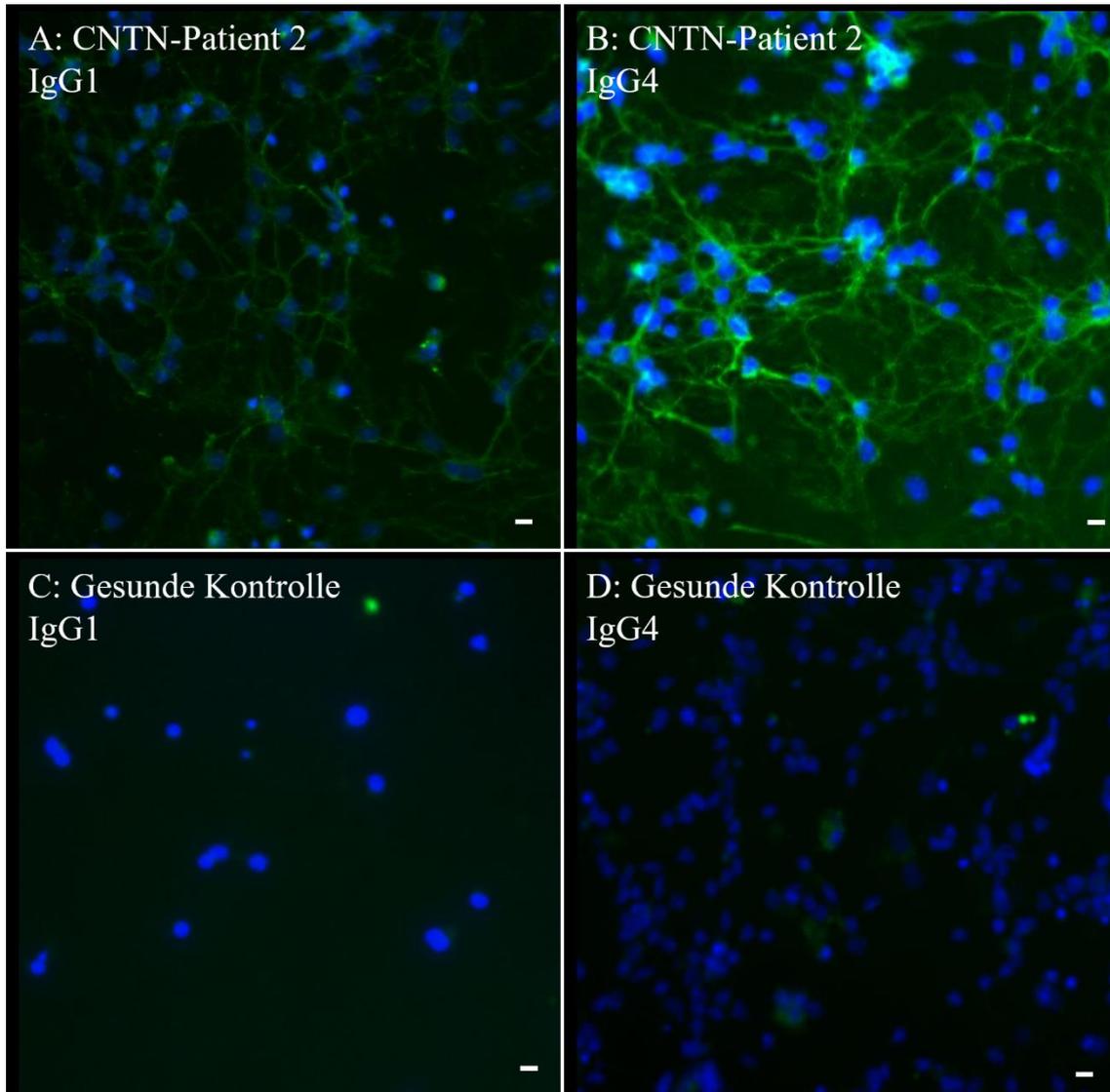


Abbildung 29: Subklassenspezifische Bindungsassays IgG1 sowie IgG4 von CNTN-Patientin 2 sowie einer gesunden Kontrolle an cerebellären Neuronen

Die Bindungsassays von CNTN-Patientin 2 sind in der oberen Zeile und die Bindungsassays der gesunden Kontrolle in der unteren Zeile abgebildet. Es ist jeweils angegeben, welcher subklassenspezifische Bindungsassay durchgeführt wurde. Der Sekundärantikörper gegen die jeweilige IgG-Subklasse ist FITC gekoppelt und hier grün dargestellt. Die Zellkerne sind in blau dargestellt.

4.3.3 Einfluss von Inkubation mit Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern auf Proteinexpression in immunhistochemischen Färbungen

Die Neurone wurden mit Seren von CNTN-Patient 1, CNTN-Patientin 2 und einer gesunden Kontrolle für mehrtägige Zeiträume inkubiert und anschließend immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Das Ziel der Inkubationsexperimente

war die Expression von Contactin-1, Neurofascin sowie Beta-III-Tubulin darzustellen, um Hinweise auf die pathophysiologische Wirkung der Contactin-1-IgG-Patientenantikörper auf Neurone zu erhalten.

4.3.3.1 Verminderte zeitabhängige Contactin-1-Expression mit Regenerationstendenz

Bei cerebellären Neuronen zeigte sich die Contactin-1-Expression nach Inkubation mit den jeweiligen Seren sowohl bei CNTN-Patient-1 als auch bei CNTN-Patientin 2 im Vergleich zur Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson deutlich vermindert. Nach ein- sowie zweitägiger Inkubation mit Serum der CNTN-PatientInnen war in den immunhistochemischen Färbungen noch eine geringe Restmenge von Contactin-1 sichtbar, während nach drei- sowie viertägiger Inkubationszeit kaum Contactin-1 nachweisbar war, womit die Ausprägung der verminderten Contactin-1-Expression von der Dauer der Inkubation abhängig war.

An cerebellären Neuronen erfolgten auch Regenerationsversuche. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit dem Serum von CNTN-Patient 1 bzw. CNTN-Patientin 2 für ein bzw. zwei Tage inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweitägige Regenerationsphase, in der die cerebellären Neurone mit Serum einer gesunden Kontrollperson inkubiert wurden. Hier zeigte sich, dass nach der Regenerationsphase wieder ein deutlicher Anstieg der Contactin-1-Expression in immunhistochemischen Färbungen zu beobachten war.

Repräsentative Fotos der immunhistochemischen Färbungen auf Contactin-1-Protein sind in Abbildung 30 und Abbildung 31 dargestellt, wobei die Fotos einer Abbildung jeweils aus demselben Versuchsdurchlauf stammen.

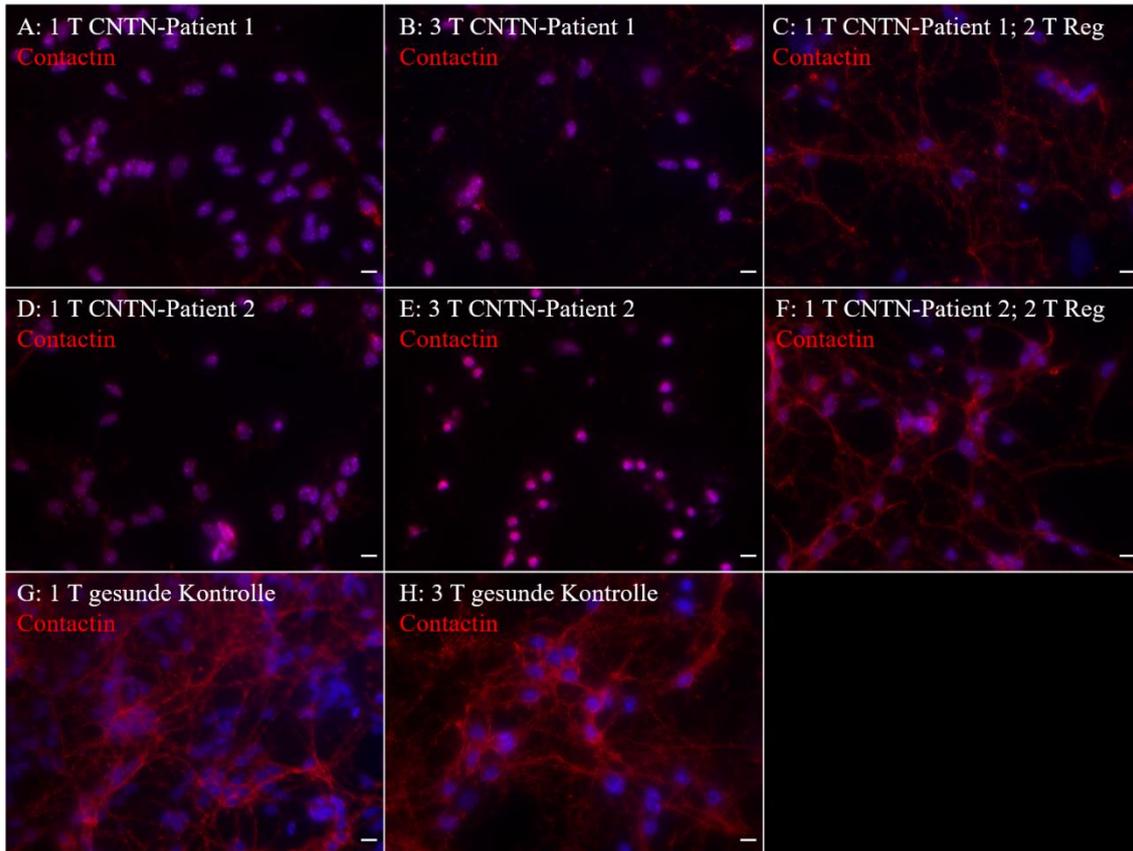


Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung auf Contactin-1 nach ein- sowie dreitägiger Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum

Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum und für welchen Zeitraum die cerebellären Neurone inkubiert wurden. Contactin ist rot und die Zellkerne blau dargestellt. Der Maßstab beträgt jeweils 10µm. 1 T = eintägige Inkubation; 3 T = dreitägige Inkubation; 2 T Reg = folgende Regenerationsphase zweitägiger Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson

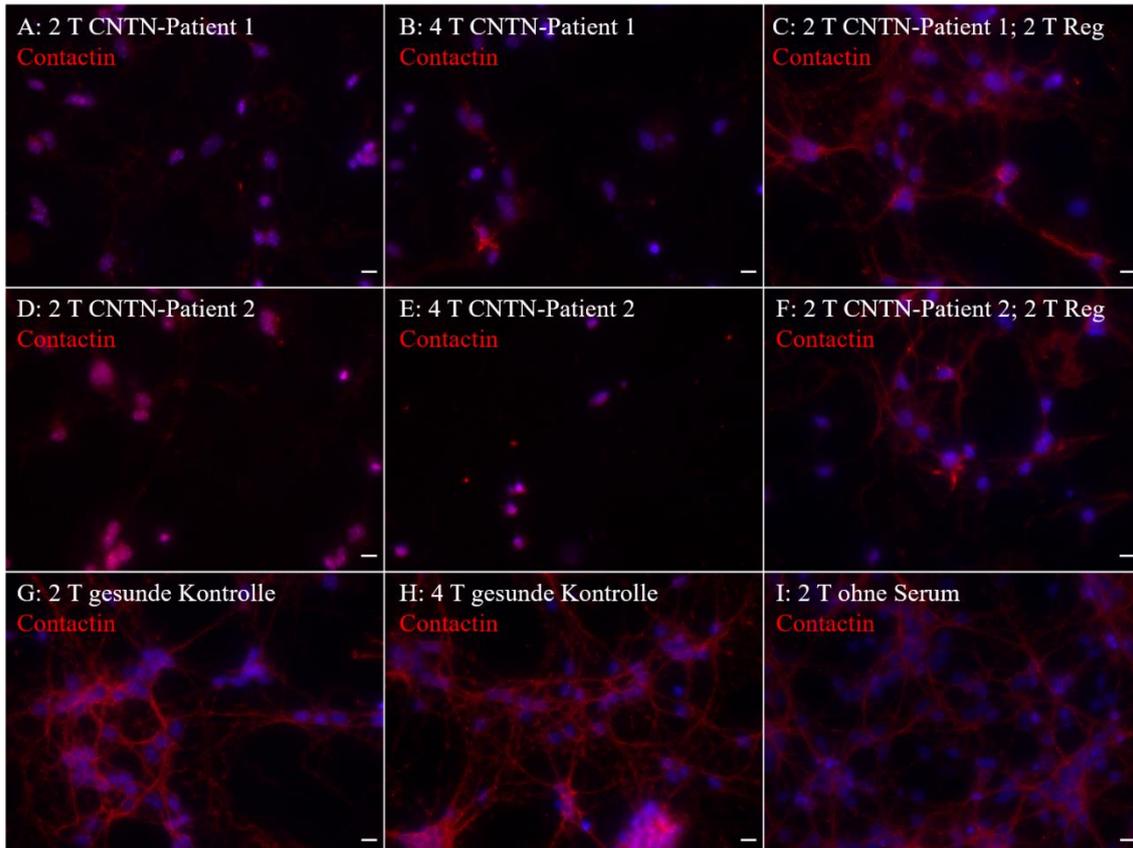


Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung auf Contactin-1 nach zwei- sowie viertägiger Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum

Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum und für welchen Zeitraum die cerebellären Neurone inkubiert wurden. Contactin ist rot und die Zellkerne blau dargestellt. Der Maßstab beträgt jeweils 10µm. 2 T = zweitägige Inkubation; 4 T = viertägige Inkubation; 2 T Reg = folgende Regenerationsphase zweitägiger Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson

An den Spinalganglienneuronen wurden auf Grund der beschränkten Verfügbarkeit dieser Zellen nur ein- sowie zweitägige Inkubationen und keine Regenerationsversuche durchgeführt. Ebenso wie bei den cerebellären Neuronen zeigte sich die Contactin-1-Expression der Spinalganglienneurone nach Inkubation mit den jeweiligen Seren sowohl bei CNTN-Patient 1 als auch bei CNTN-Patientin 2 im Vergleich zur Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson deutlich vermindert, wobei der Effekt nach zweitägiger Inkubation ausgeprägter war (siehe Abbildung 32).

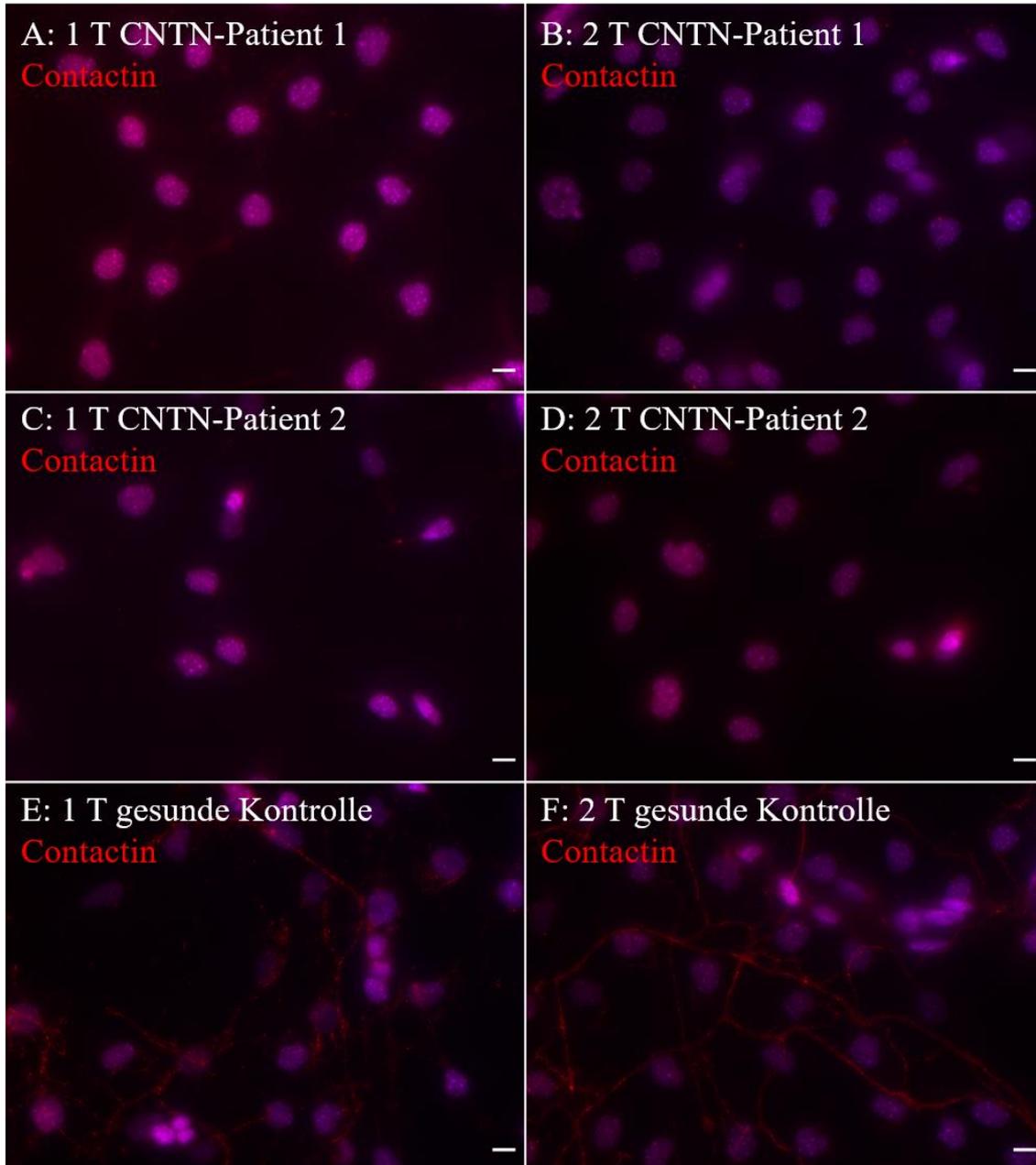


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung auf Contactin-1 nach ein- sowie zweitägiger Inkubation der Spinalganglienneurone mit Serum

Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum und für welchen Zeitraum die Spinalganglienneurone inkubiert wurden. Contactin ist rot und die Zellkerne blau dargestellt. Der Maßstab beträgt jeweils 10µm. 1 T = eintägige Inkubation; 2 T = zweitägige Inkubation.

Somit zeigte sich sowohl an cerebellären Neuronen als auch an Spinalganglienneuronen eine vom Einwirkungszeitraum abhängig verminderte Expression von Contactin-1-Protein, welche in cerebellären Neuronen in einer Regenerationsphase ohne Einwirkung von Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern reversibel war.

4.3.3.2 Unveränderte Neurofascin-Expression

Immunhistochemische Färbungen auf Neurofascin nach Inkubation wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Contactin-IgG-Patientenantikörper auch die Expression anderer neuronaler Proteine abgesehen von Contactin beeinflussen.

An den cerebellären Neuronen zeigte sich nach dreitägiger Inkubation mit dem jeweiligen Serum bei verblindeter Betrachtung der immunhistochemischen Färbung kein Unterschied in der Neurofascinexpression zwischen CNTN-Patient 1, CNTN-Patientin 2 und einer gesunden Kontrolle (siehe Abbildung 33). Cerebelläre Neurone, die nur mit Neuronen-Medium ohne Serum inkubiert worden war, zeigten im Vergleich zu den Präparaten, die mit Serum der CNTN-PatientInnen bzw. der gesunden Kontrollen inkubiert worden waren, eine erhöhte Neurofascinexpression (siehe Abbildung 33).

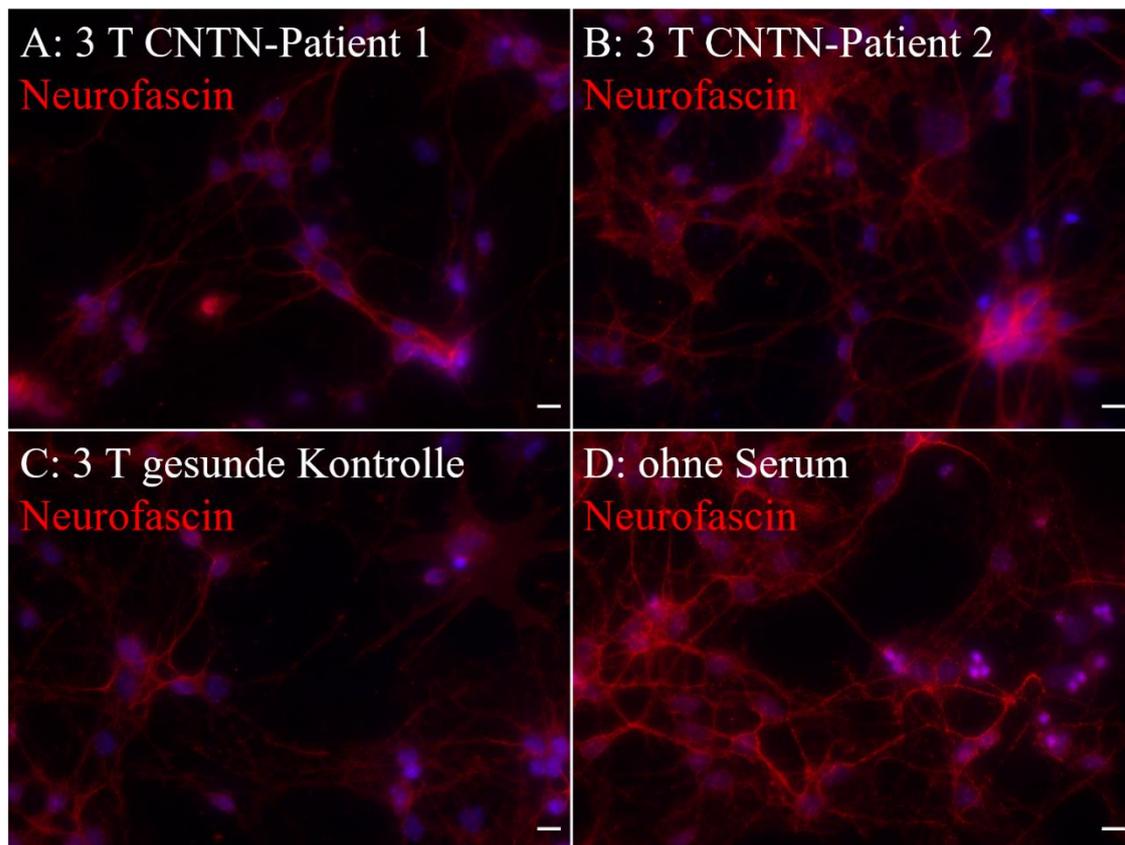


Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung auf Neurofascin nach dreitägiger Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum

Es ist jeweils angegeben womit die cerebellären Neurone vor der Färbung inkubiert wurden. Neurofascin ist rot und die Zellkerne blau dargestellt. Der Maßstab beträgt jeweils 10µm. 3 T = dreitägige Inkubation

Bei den Spinalganglienneuronen wurden die Inkubationen nur für zwei Tage durchgeführt, da die Spinalganglienneurone im Vergleich zu den cerebellären Neuronen bei längerer Aufbewahrungszeit spontan abstarben. Wie bei den cerebellären Neuronen zeigte sich auch bei den Spinalganglienneuronen nach zweitägiger Inkubation kein Unterschied in der Neurofascinexpression zwischen CNTN-Patient 1, CNTN-Patientin 2 und einer gesunden Kontrolle (siehe Abbildung 34). Es wurden auf Grund der beschränkten Zellzahl der Spinalganglienneurone keine Inkubationen mit reinem Neuronen-Medium ohne Serum durchgeführt.

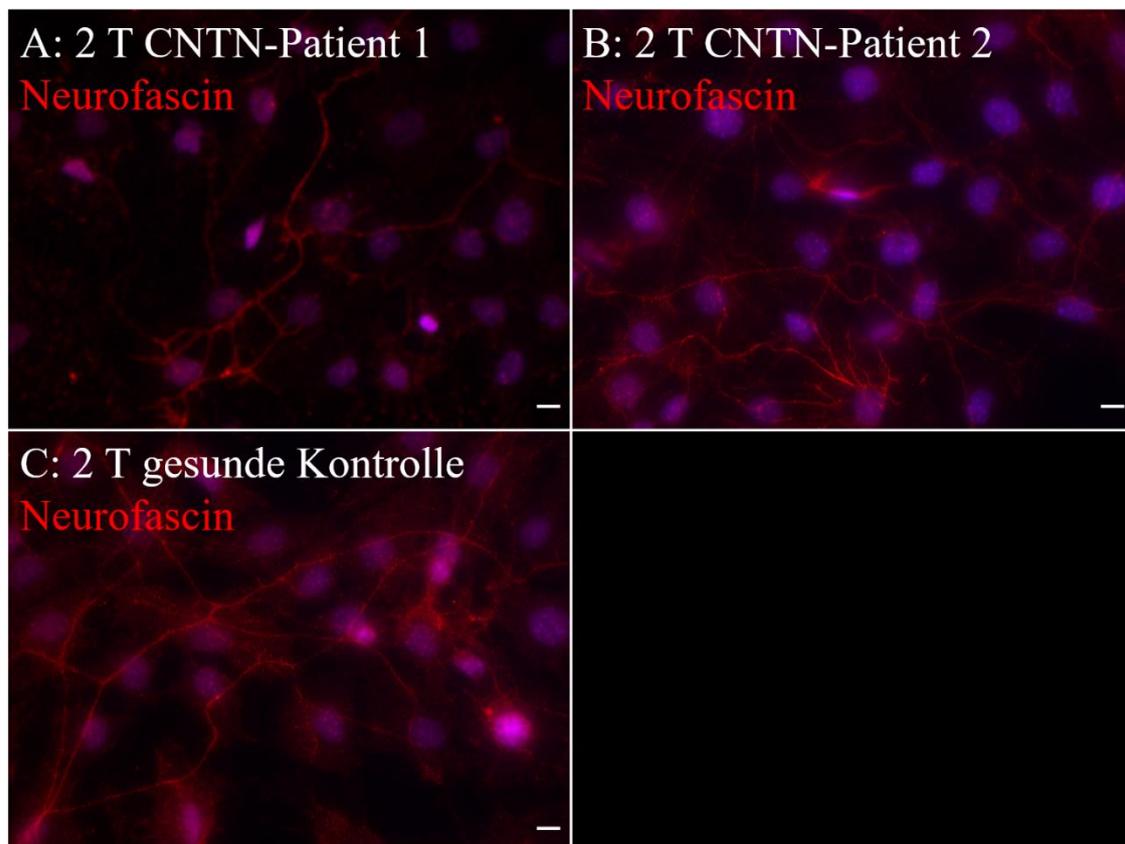


Abbildung 34: Immunhistochemische Färbung auf Neurofascin nach zweitägiger Inkubation der Spinalganglienneurone mit Serum

Es ist jeweils angegeben womit die Spinalganglienneurone vor der Färbung inkubiert wurden. Neurofascin ist rot und die Zellkerne blau dargestellt. Der Maßstab beträgt jeweils 10µm. 2 T = dreitägige Inkubation

4.3.3.3 Unveränderte Beta-III-Tubulin-Expression

Immunhistochemische Färbungen von Beta-III-Tubulin, dienten dazu die Neurone nach Inkubation mit Seren darzustellen. Beta-III-Tubulin ist ein Bestandteil der Mikrotubuli und wird nahezu ausschließlich in Neuronen exprimiert, weshalb Beta-III-Tubulin als neuronaler Marker eingesetzt wird. Immunhistochemische Färbungen auf Beta-III-Tubulin wurden nur an cerebellären Neuronen durchgeführt. Nach drei- sowie viertägiger Inkubation mit dem jeweiligen Serum zeigte sich bei verblindeter Betrachtung kein relevanter Unterschied zwischen CNTN-Patient 1, CNTN-Patientin 2 und einer gesunden Kontrollperson (siehe Abbildung 35). Insgesamt exprimierten die Zellen, die mit Serum behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen etwas weniger Beta-III-Tubulin.

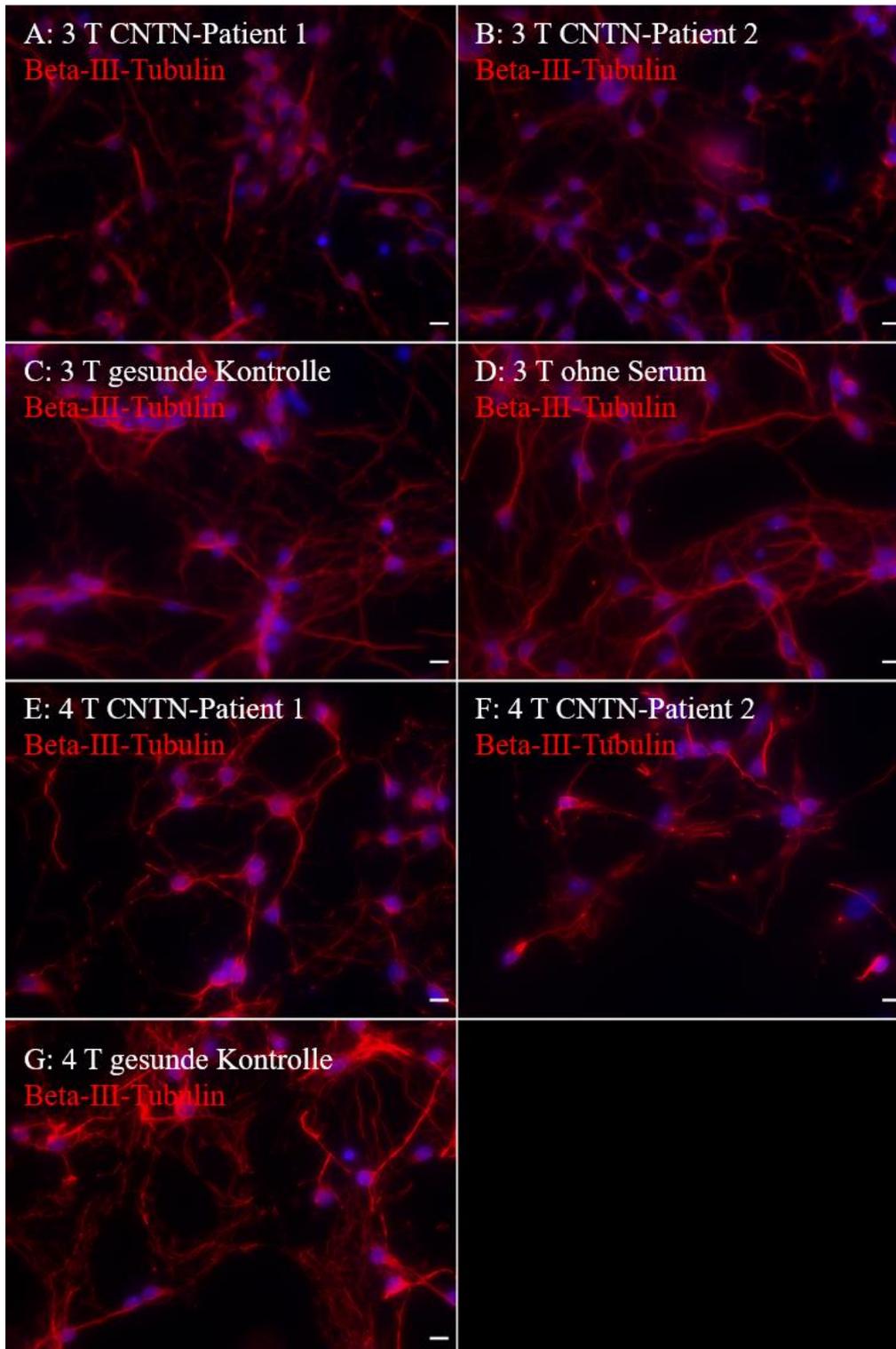


Abbildung 35: Immunhistochemische Färbung auf Beta-III-Tubulin nach mehrtägiger Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum

Es ist jeweils angegeben womit und für welchen Zeitraum die cerebellären Neurone vor der Färbung inkubiert wurden. Beta-III-Tubulin ist rot und die Zellkerne blau dargestellt. Der Maßstab beträgt jeweils 10µm. 3 T = dreitägige Inkubation, 4 T = viertägige Inkubation.

4.3.4 Bestätigung der verminderten zeitabhängigen Contactin-1 Expression nach Inkubation mit Contactin-IgG-Patientenantikörpern in Western Blots

Es wurden Western Blots mit Lysaten inkubierter cerebellärer Neurone durchgeführt, um die Proteinexpression von Contactin-1 sowie Neurofascin zu quantifizieren.

Bei dreitägigen Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum der CNTN-PatientInnen 1 und 2 dienten eine Inkubation ohne Serum, eine Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson und eine Inkubation mit Serum des IgM-Patienten 1 als Kontrollen. In der Expression von Neurofascin ergaben sich nur leichte Unterschiede (siehe Abbildung 37 und Abbildung 38). Nach Inkubation mit den Seren der CNTN-PatientInnen 1 und 2 zeigte sich die Contactin-1 Expression im Vergleich zur Inkubation mit den Seren einer gesunden Kontrolle bzw. auch mit Serum des IgM-Patienten 1 allerdings deutlich vermindert. Dieser Effekt war bei CNTN-Patient 1 nochmals deutlich ausgeprägter als bei CNTN-Patientin 2, was sich sowohl bei Betrachtung als auch bei der Quantifizierung der Intensitäten der Banden zeigte (siehe Abbildung 36 und Abbildung 38).

Es wurden auch Regenerationsversuche durchgeführt. Die Contactin-1 Expression wurde nach zwei- sowie viertägiger Inkubationszeit mit Seren der CNTN-PatientInnen 1 bzw. 2 sowie einer gesunden Kontrollperson im Vergleich zu Regenerationsversuchen, bei denen die Neurone zunächst für zwei Tage mit Serum der CNTN-PatientInnen 1 bzw. 2 und anschließend für zwei Tage mit Serum einer gesunden Kontrollperson inkubiert wurden, betrachtet. Die relative Contactin-1 Expression nach den Regenerationsversuchen wurde auf eine viertägige Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson bezogen. Neben der Bestätigung der zeitabhängig verringerten Contactin-1 Expression, zeigte sich auch eine geringe Regenerationstendenz, da die relative Contactin-1 Expression nach den Regenerationsversuchen etwas höher war als nach zweitägiger Inkubation mit Serum der CNTN-PatientInnen (siehe Abbildung 39, Abbildung 40 und Abbildung 41). Somit ließ sich die in den immunhistochemischen Färbungen beobachtete vom Inkubationszeitraum abhängige, reversibel verminderte Contactin-1-Expression im Western Blot bestätigen, wobei sich in der Quantifizierung ein ausgeprägterer Effekt durch Serum des CNTN-Patient 1 im Vergleich zu CNTN-Patientin 2 zeigte.

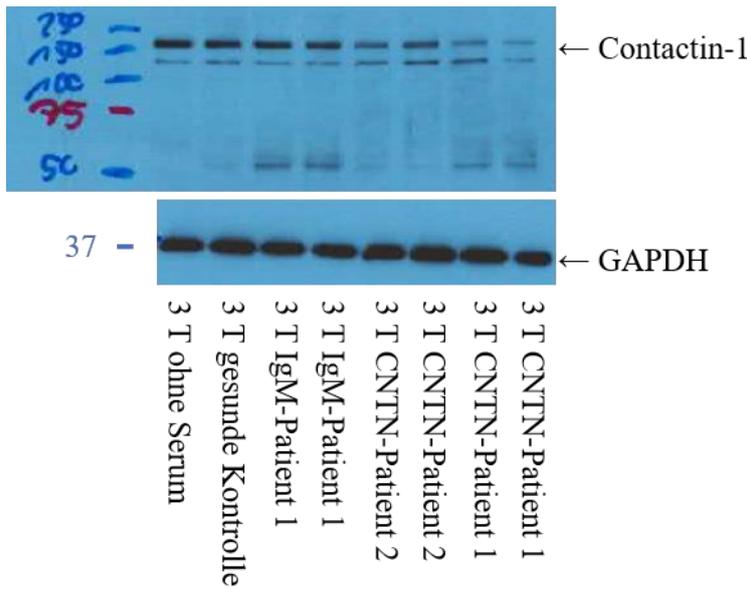


Abbildung 36: Western Blot zur Darstellung der Expression von Contactin-1 nach dreitägiger Inkubation cerebellärer Neurone

Der obere Western Blot repräsentiert Contactin-1 und der untere Western Blot die Ladekontrolle GAPDH. Die Proteinleiter stellt das Proteingewicht in kDa dar. Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum inkubiert wurde. 3 T = dreitägige Inkubation

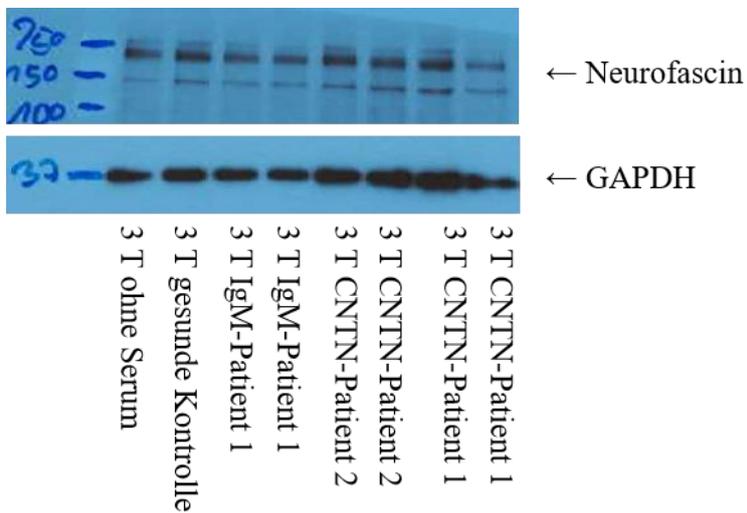


Abbildung 37: Western Blot zur Darstellung der Expression von Neurofascin nach dreitägiger Inkubation cerebellärer Neurone

Der obere Western Blot repräsentiert Neurofascin und der untere Western Blot die Ladekontrolle GAPDH. Die Proteinleiter stellt das Proteingewicht in kDa dar. Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum inkubiert wurde. 3 T = dreitägige Inkubation

**Relative Expression
von Contactin-1 und Neurofascin im Westernblot
nach dreitägiger Inkubation
cerebellärer Neurone mit Serum**

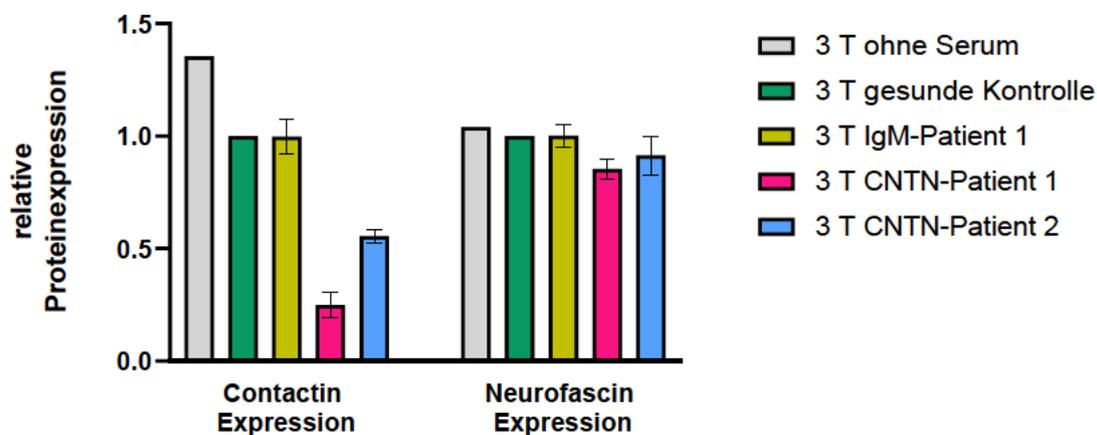


Abbildung 38: Relative Proteinexpression von Contactin-1 sowie Neurofascin im Western Blot nach dreitägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum

Mit ImageJ wurde die Intensität der obersten dargestellten Bande von Contactin-1 bzw. Neurofascin und GAPDH der in Abbildung 36 und Abbildung 37 dargestellten Western Blots ermittelt. Der Wert, der sich nach Inkubation mit Kontrollserum für den jeweiligen Zeitraum ergab, wurde im jeweiligen Western Blot als Standard gesetzt, sodass sich nach Inkubation mit Serum der gesunden Kontrolle eine relative Intensität von 100 % ergab. Die relativen Intensitäten der Contactin-1 bzw. Neurofascin Bande wurden ins Verhältnis zu den relativen Intensitäten der GAPDH Bande gesetzt, sodass sich hieraus die jeweilige relative Proteinexpression ergab. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum inkubiert wurde, wobei ohne Serum in grau, die gesunde Kontrolle in grün, IgM-Patient 1 in olivgrün, CNTN-Patient 1 in pink und CNTN-Patientin 2 in hellblau dargestellt sind. 3 T = dreitägige Inkubation

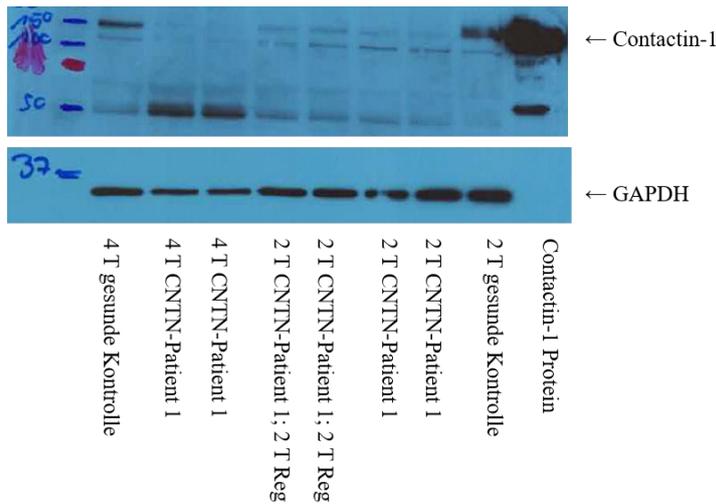


Abbildung 39: Western Blot zur Darstellung der Expression von Contactin-1 nach zwei- sowie viertägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum des CNTN-Patienten 1

Der obere Western Blot repräsentiert Contactin-1 und der untere Western Blot die Ladekontrolle GAPDH. Die Proteinleiter stellt das Proteingewicht in kDa dar. Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum und für welchen Zeitraum die cerebellären Neurone inkubiert wurden. Contactin-1-Protein wurde als Positivkontrolle eingesetzt. 2 T = zweitägige Inkubation; 4 T = viertägige Inkubation; 2 T Reg = folgende Regenerationsphase zweitägiger Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson

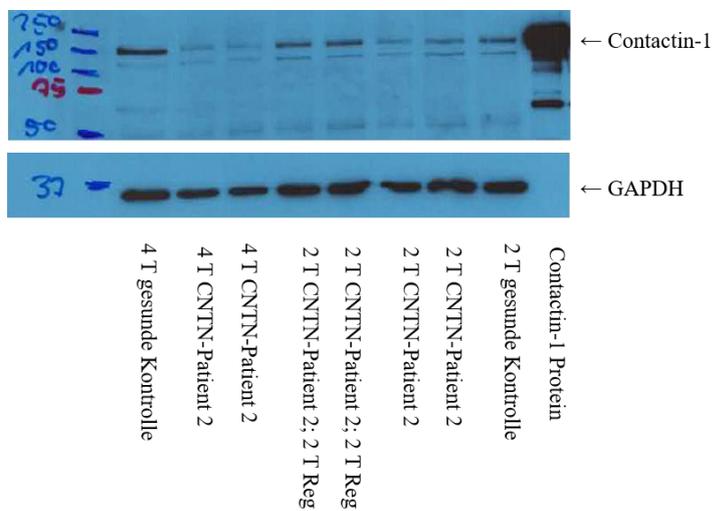


Abbildung 40: Western Blot zur Darstellung der Expression von Contactin-1 nach zwei- sowie viertägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum der CNTN-Patientin 2

Der obere Western Blot repräsentiert Contactin-1 und der untere Western Blot die Ladekontrolle GAPDH. Die Proteinleiter stellt das Proteingewicht in kDa dar. Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum und für welchen Zeitraum die cerebellären Neurone inkubiert wurden. Contactin-1-Protein wurde als Positivkontrolle eingesetzt. 2 T = zweitägige Inkubation; 4 T = viertägige Inkubation; 2 T Reg = folgende Regenerationsphase zweitägiger Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson

Relative Contactin-1 Expression im Westernblot nach zwei- sowie viertägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum

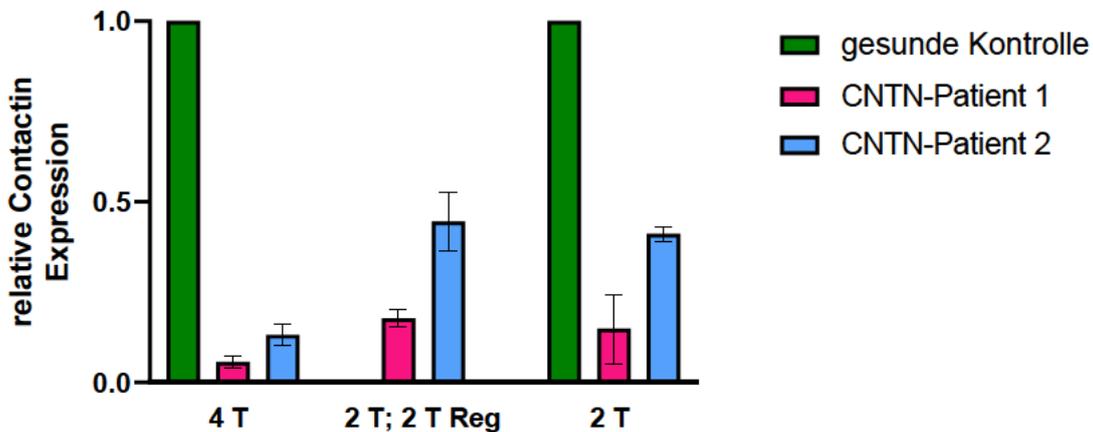


Abbildung 41: Relative Proteinexpression von Contactin-1 im Western Blot nach zwei- sowie viertägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum

Mit ImageJ wurde die Intensität der obersten dargestellten Bande von Contactin-1 bzw. Neurofascin und GAPDH der in Abbildung 39 und Abbildung 40 dargestellten Western Blots ermittelt. Der Wert, der sich nach Inkubation mit Kontrollserum für den jeweiligen Zeitraum ergab, wurde im jeweiligen Western Blot als Standard gesetzt, sodass sich nach Inkubation mit Serum der gesunden Kontrolle eine relative Intensität von 100 % ergab. Die relativen Intensitäten der Contactin-1 bzw. Neurofascin Bande wurden ins Verhältnis zu den relativen Intensitäten der GAPDH Bande gesetzt, sodass sich hieraus die jeweilige relative Proteinexpression ergab. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Es ist jeweils angegeben mit welchem Serum inkubiert wurde, wobei ohne Serum grau, die gesunde Kontrolle grün, IgM-Patient 1 olivgrün, CNTN-Patient 1 pink und CNTN-Patientin 2 hellblau dargestellt sind. 2 T = zweitägige Inkubation; 4 T = viertägige Inkubation; 2 T Reg = folgende Regenerationsphase zweitägiger Inkubation mit Serum einer gesunden Kontrollperson

4.3.5 Signifikant erhöhte LDH Werte nach Inkubation mit Contactin-1-IgG4- Patientenantikörpern

Um zu untersuchen, ob die Contactin-1-IgG-Patientenantikörper mit unterschiedlichen dominierenden Subklassen zytotoxisch wirken, wurden nach mehrtägigen Inkubationen Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Die LDH-Aktivität diente hierbei als Maß für die quantitative Zytotoxizität. Die relative Zytotoxizität wurde ermittelt, indem die jeweiligen Werte zu den Werten der Positivkontrolle, bei denen durch Lyse der Zellen mittels Triton die maximale Menge an LDH freigesetzt wurde, ins Verhältnis gesetzt

wurden. Es wurden die Seren der beiden CNTN-PatientInnen sowie die Seren von zwei gesunden Kontrollpersonen eingesetzt.

An cerebellären Neuronen zeigte sich im ungepaarten T-Test die relative Zytotoxizität der CNTN-Patientin 2 mit überwiegend IgG4 signifikant erhöht sowohl gegenüber CNTN-Patient 1 mit überwiegend IgG3 als auch gegenüber gesunden Kontrollen (siehe Abbildung 42), jeweils nach dreitägiger ($p < 0,0001$) und viertägiger Inkubation ($p < 0,001$). Die relative Zytotoxizität von CNTN-Patient 1 zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen. Nach zweitägiger Inkubation zeigte sich bei den cerebellären Neuronen kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 42).

Auch mit den Spinalganglienneuronen wurden Zytotoxizitätsassays durchgeführt, wobei sich bei den Werten der Triplets eine höhere Streubreite als bei den cerebellären Neuronen zeigte. Eine mögliche Erklärung wäre hierfür die im Vergleich zu den cerebellären Neuronen deutlich geringere Zellzahl, die eingesetzt wurde, da die Spinalganglienneurone aus murinen Embryonen nur in sehr beschränkter Zahl verfügbar waren. Nach zweitägiger Inkubation an Spinalganglienneuronen zeigte sich wie bei den cerebellären Neuronen für das Serum der CNTN-Patientin 2 mit überwiegend IgG4 eine signifikant erhöhte relative Zytotoxizität ($p < 0,01$) im ungepaarten T-Test sowohl gegenüber den zwei gesunden Kontrollpersonen als auch gegenüber CNTN-Patient 1 mit überwiegend IgG3 (siehe Abbildung 43). Nach dreitägiger Inkubation an Spinalganglienneuronen zeigten sich große 95 %-Konfidenzintervalle und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der relativen Zytotoxizität (siehe Abbildung 43). Die Ergebnisse nach viertägiger Inkubation von Spinalganglienneuronen konnten nicht verwertet werden, da sich auch für die Negativkontrollen deutlich erhöhte Werte zeigten, sodass von einem spontanen Absterben der Zellen ausgegangen werden muss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in den Zytotoxizitätsassays für CNTN-Patientin 2 sowohl gegenüber CNTN Patient 1 als auch gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Werte ergaben, wobei dieser Effekt an cerebellären Neuronen nach drei- sowie viertägiger Inkubation und an Spinalganglienneuronen nach zweitägiger Inkubation nachweisbar war.

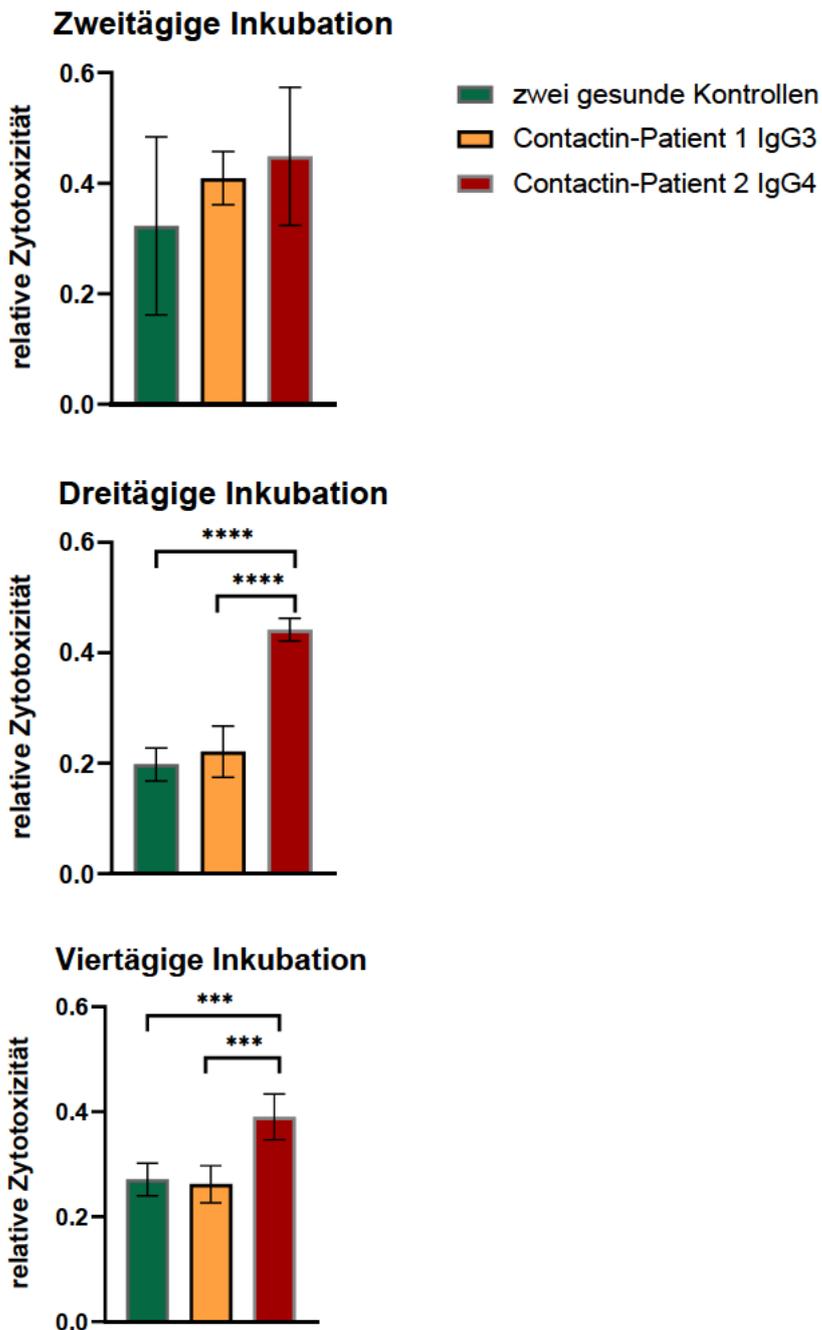
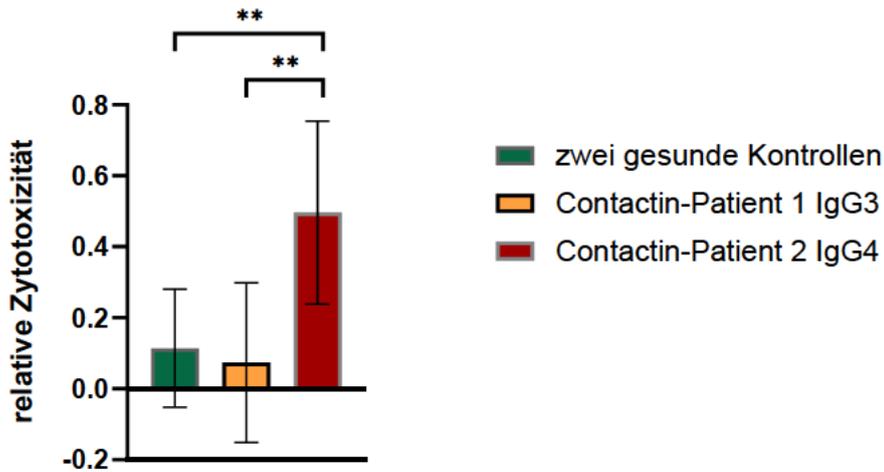


Abbildung 42: Zytotoxizitätsassays nach mehrtägiger Inkubation an cerebellären Neuronen

Die Werte von CNTN-Patient 1 mit überwiegend IgG3-Autoantikörpern werden orange, von CNTN-Patientin 2 mit überwiegend IgG4-Autoantikörpern braun und von den beiden gesunden Kontrollen grün dargestellt. Auf der y-Achse ist die relative Zytotoxizität, prozentual bezogen auf die Positivkontrolle, repräsentiert. Die Positivkontrolle entspricht einer relativen Zytotoxizität von 1,0. Die Fehlerbalken geben die 95 %-Konfidenzintervalle wieder. Zwischen statistisch im ungepaarten T-Test signifikant unterschiedlichen Werten wird eine Klammer gespannt. Das jeweils erreichte Signifikanzlevel wird mittels Sternen abgebildet.

(** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$)

Zweitägige Inkubation



Dreitägige Inkubation

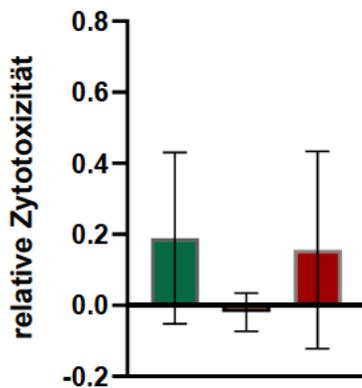


Abbildung 43: Zytotoxizitätsassays nach mehrtägiger Inkubation an Spinalganglienneuronen

Die Werte von CNTN-Patient 1 mit überwiegend IgG3-Autoantikörpern werden orange, von CNTN-Patientin 2 mit überwiegend IgG4-Autoantikörpern braun und von den beiden gesunden Kontrollen grün dargestellt. Auf der y-Achse ist die relative Zytotoxizität, prozentual bezogen auf die Positivkontrolle, repräsentiert. Die Positivkontrolle entspricht einer relativen Zytotoxizität von 1,0. Die Fehlerbalken geben die 95 %-Konfidenzintervalle wieder. Zwischen statistisch im ungepaarten T-Test signifikant unterschiedlichen Werten wird eine Klammer gespannt. Das jeweils erreichte Signifikanzlevel wird mittels Sternen abgebildet.

(** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$)

5 Diskussion

Einige Aspekte der folgenden Diskussion wurden bereits in Publikationen, in denen Ergebnisse dieser Promotion veröffentlicht wurden, dargestellt (Doppler et al., 2018; Stengel et al., 2019). Weitere Teilaspekte finden sich auch in einem von Julia Grüner verfassten Manuskript mit dem Titel „Anti-contactin-1 antibodies affect surface expression and sodium currents in dorsal root ganglia“, das sich zum Zeitpunkt des Verfassens der Monographie im Reviewverfahren befand.

5.1 Neurofascin-IgG-Autoantikörper bei (Para-)nodopathien

Bei zwei CIDP-Patienten wurden mittels Bindungsassays an Ischiadicuszupfnerven, ELISA sowie Bindungsassays an transfizierten HEK-Zellen Neurofascin-IgG-Autoantikörper detektiert. Es zeigte sich, dass die Autoantikörper von IgG-Patient 1 an Neurofascin-155, Neurofascin-186 sowie Neurofascin-140 banden, während die Autoantikörper von IgG-Patient 2 nur an Neurofascin-155 banden. Außerdem dominierte bei IgG-Patient 1 die Subklasse IgG3 und bei IgG-Patient 2 IgG4.

IgG-Patient 2 zeigte für die Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie typische Symptomatik, während IgG-Patient 1 mit einem bisher kaum beschriebenen Pan-Neurofascin-IgG3 Autoantikörper eine ungewöhnlich schwere Erkrankung zeigte. Auf diese Aspekte soll in den folgenden Kapiteln eingegangen werden.

5.1.1 IgG-Patient 2 als typisches Beispiel der vielfach beschriebenen Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl an beschriebenen CIDP-PatientInnen mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern (Burnor et al., 2018; Cortese et al., 2016; Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2020; Devaux et al., 2016; Garg et al., 2018; Kadoya et al., 2016; Kuwahara et al., 2018; Mathey et al., 2017; Ng et al., 2012; Ogata et al., 2015; Painous et al., 2018; Querol et al., 2014; Querol et al., 2017; Stengel et al., 2019; Zhang et al., 2019). Bei der großen Mehrzahl der in diesen Veröffentlichungen beschriebenen CIDP-PatientInnen waren Neurofascin-155-IgG-Autoantikörper der Subklasse IgG4 nachgewiesen worden, die wir auch bei IgG-Patient 2 detektierten. IgG-Patient 2 zeigte die typischen Aspekte, die bisher für die Neurofascin-155-IgG-(Para-)nodopathie beschrieben wurden.

Die Erkrankung manifestierte sich im Alter von 25 Jahren, was für eine CIDP ein ungewöhnlich junges Erkrankungsalter darstellt, da das durchschnittliche Erkrankungsalter der CIDP bei etwa 50 Jahren liegt (Vedeler et al., 2013). Ein junger Erkrankungsbeginn, typischerweise zwischen 20 und 30 Jahren, wurde jedoch als typisches Merkmal der Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie beschrieben (Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2020; Devaux et al., 2016; Kadoya et al., 2016; Ogata et al., 2015). Auch der bei IgG-Patient 2 vorliegende GBS-artige Beginn der Erkrankung ist ein typisches Merkmal der Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie (Burnor et al., 2018; Cortese et al., 2020).

Nahezu alle Veröffentlichungen zu PatientInnen mit Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathien identifizieren einen Tremor, welcher auch bei IgG-Patient 2 in Form eines ausgeprägten Intentionstremor vorlag, als charakteristisches Merkmal der Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie (Cortese et al., 2016; Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2020; Devaux et al., 2016; Kadoya et al., 2016; Kuwahara et al., 2018; Ogata et al., 2015; Painous et al., 2018; Querol et al., 2014). Mehrere Studien zeigten bereits eine Bindung an das Cerebellum von Ratten- bzw. Mäusehirnschnitten (Devaux et al., 2016; Querol et al., 2014) und auch bei IgG-Patient 2 konnte eine ausgeprägte Bindung des Serums an fixierten murinen cerebellären Neuronen gezeigt werden. Neben dem Tremor zeigte IgG-Patient 2 auch eine ausgeprägte sensible Ataxie, die sich in Form einer Pseudoathetose manifestierte. Eine sensible Ataxie wurde bereits mehrfach bei PatientInnen mit Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern (Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2020; Devaux et al., 2016; Kadoya et al., 2016) und auch bei PatientInnen mit Contactin-1-IgG4-Autoantikörpern beschrieben (Cortese et al., 2020; Miura et al., 2015), während eine sensible Ataxie nicht zu typischen Symptomen einer klassischen CIDP zählt und eher bei sensiblen Unterformen vorkommt (Vallat et al., 2010). Ein mögliches pathophysiologisches Korrelat der sensiblen Ataxie bei (Para-)nodopathien wäre die Affektion von Spinalganglienneuronen durch die Autoantikörper. Es konnte eine Bindung an fixierten murinen Spinalganglienneuronen durch das Serum von IgG-Patient 2 gezeigt werden und auch bei PatientInnen mit Contactin-1-IgG4-Autoantikörpern wurde bereits in der Literatur und im Rahmen dieser Promotion eine Bindung an murinen Spinalganglien bzw. fixierten Spinalganglienneuronen nachgewiesen (Miura et al., 2015).

Die ausgeprägte autonome Symptomatik des IgG-Patienten 2, die bisher noch nicht als typisches Merkmal einer Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie beschrieben wurde, wird in Kapitel 5.1.3 näher beleuchtet.

In der elektrophysiologischen Untersuchung von IgG-Patient 2 zeigte sich wie in anderen Studien von PatientInnen mit Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern das Bild einer demyelinisierenden Erkrankung (Ogata et al., 2015; Querol et al., 2014). Dieser Befund entspricht dem von Uncini beschriebenen Konzept der (Para-)nodopathie, bei dem sich elektrophysiologisch ein demyelinisierend erscheinendes Bild ergibt, auch wenn eigentlich keine Schädigung der Myelinscheide sondern des Ranvierschen Schnürringes vorliegt (Uncini & Vallat, 2018). Passiv-Transfer Versuche unterstützen dieses Konzept, denn Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörper führten in Lewis Ratten zu verminderten Nervenleitgeschwindigkeiten, ohne dass eine Demyelinisierung an den Nerven nachgewiesen werden konnte (Manso et al., 2019). Auch die sekundär axonale Schädigung, die sich durch Spontanaktivität in der elektromyographischen Untersuchung bei IgG-Patient 2 nachweisen ließ, entspricht dem Erklärungsmodell der (Para-)nodopathie von Uncini, der postuliert, dass es bei chronischer Dysfunktion des Ranvierschen Schnürringes zum andauernden Leitungsblock und zur axonalen Degeneration kommen kann (Uncini & Kuwabara, 2015).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IgG-Patient 2 die charakteristischen Merkmale der Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie aufweist.

5.1.2 IgG-Patient 1 mit Pan-Neurofascin-IgG3 Autoantikörpern und außergewöhnlich schwerer Erkrankung

Die klinische Symptomatik von IgG-Patient 1 entsprach hingegen nicht den typischen Merkmalen der Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie. Er zeigte mit einer Tetraplegie bei vollständiger Areflexie, Paresen aller Hirnnerven, einer autonomen Beteiligung und einer mehrmonatigen Beatmungspflichtigkeit ein für eine CIDP außergewöhnlich schweres Krankheitsbild. Bei IgG-Patient 1 war ein Pan-Neurofascin-Autoantikörper der Subklasse IgG3 nachgewiesen worden, der Reaktivität gegen drei Isoformen von Neurofascin, nämlich Neurofascin-155, -186 sowie -140, zeigte. Somit unterschied sich

sowohl die Subklasse als auch die Isoformenreaktivität von den bisher vielfach beschriebenen Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern.

In der Literatur gibt es ähnliche Fallberichte von PatientInnen mit außergewöhnlich schweren Krankheitsbildern bei Nachweis von Neurofascin-Autoantikörpern mit Reaktivität gegen mehrere Isoformen überwiegend der Subklasse IgG3. Exemplarische Fälle werden in Tabelle 38 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 38: Vergleich zwischen IgG-Patient 1 und exemplarischen Fallberichten von PatientInnen mit Autoantikörpern gegen mehrere Isoformen von Neurofascin

	IgG-Patient 1	Patient identifiziert von A.M. Brunder (Stengel et al., 2019)	Patientin identifiziert von A.M. Brunder (Stengel et al., 2019)	Patient Studie Burnor (Burnor et al., 2018)	Patient von Vallat (Vallat et al., 2018)
Diagnose	CIDP	CIDP	GBS	V.a. CIDP *	Nodopathie
Alter	71	63	74	50	8. Lebensdekade
Geschlecht	♂	♂	♀	♂	♂
Isoformenreaktivität (Titer)	155 (1:4000) 186 (1:2000) 140	155 (1:1000) 186 (1:500) 140	155 (1:300) 186 (1:200) 140	155 (1:800) 186 (1:1600) 140	155 (/) 186 (1:8000) 140 (1:8000)
Dominierende Subklasse	IgG3	IgG3, im Verlauf schwach IgG4	schwach IgG3	IgG4	IgG3
Paresen	Tetraplegie	Tetraplegie	nahezu Tetraplegie	Tetraplegie	Tetraplegie
Reflexstatus	Areflexie	keine Angaben	keine Angaben	Areflexie	Areflexie
Hirnnervenstatus	Paresen nahezu aller Hirnnerven, Locked-In-Symptomatik	Paresen nahezu aller Hirnnerven, Locked-In-Symptomatik	Dysphagie	Ptosis, Ophthalmoplegie, Fazialisparese bds., Dysphagie, Locked-In-Symptomatik	keine Angabe
Autonome Symptomatik	Asystolie nach Lagerung	schwere Blutdruckinstabilität, paralytischer Ileus	/	sympathische Hyper sensitivität mit labilem Blutdruck	keine Angabe

Beatmungspflichtigkeit	lange	lange	/	lange	lange
Therapieansprechen	/	fraglich Glukokortikosteroide	Plasmapherese	Rituximab und Cyclophosphamid	IVIg, Plasmapherese, Glukokortikosteroide
Outcome	Tod durch Sepsis nach mehrmonatiger Intensivtherapie	vollständige Erholung der Hirnnerven, residuelle Paresen der Extremitäten	vollständige Erholung	residuelle schwere Paresen der unteren Extremität	Vollständige Erholung der Paresen

*A.M. Brunder = Anna-Michelle Brunder, * = ohne Erfüllung der elektrophysiologischen Diagnosekriterien, bds. = beidseits*

Burnor et al. beschreiben eine ungewöhnlich schwere, jedoch behandelbare Neuropathie bei einem Patienten mit Autoantikörpern gegen alle drei Neurofascin-Isoformen (Burnor et al., 2018).

Vallat et al. beschreiben einen Patienten mit schwerem Verlauf, bei dem ebenso wie bei IgG-Patient 1 Neurofascin-Autoantikörper der Subklasse IgG3 gegen alle drei Isoformen nachgewiesen wurden (Vallat et al., 2018). Der Patient erholte sich unter verschiedenen Therapien vollständig und auch ein zuvor nachgewiesener Leitungsblock bildete sich zurück.

In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe (Promotionsprojekt von Anna-Michelle Brunder) wurden zwei PatientInnen mit Pan-Neurofascin-Autoantikörpern der Subklasse IgG3 identifiziert (Stengel et al., 2019). Der 63 jährige CIDP-Patient aus Anna-Michelle Brunders Studie ähnelte den klinischen Merkmalen von IgG-Patient 1 in erstaunlicher Weise, allerdings kam es nach langem Verlauf zu einer deutlichen Besserung. Bei der in dieser anderen Studie identifizierten GBS-Patientin waren Pan-Neurofascin-IgG3-Autoantikörper niedrigtitrig nachweisbar, passend zu dem niedrigen Titer war die Patientin weniger schwer betroffen und erholte sich unter Plasmapheresetherapie vollständig.

Auch Delmont beschrieb vier Fälle von PatientInnen mit Pan-Neurofascin-IgG-Autoantikörpern, wobei einer der Fälle auch von Cortese erwähnt wurde (Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2017). Bei drei der PatientInnen waren überwiegend die Subklasse

IgG4, bei einer Patientin überwiegend IgG3 nachgewiesen worden. Die PatientInnen unterschieden sich in den klinischen Symptomen deutlich von PatientInnen mit Neurofascin-155-IgG4 Autoantikörpern. Alle PatientInnen zeigten schwere Paresen mit Verlust der Gehfähigkeit. Zwei der vier PatientInnen, darunter auch die Patientin mit den IgG3 Autoantikörpern, litten an einer Hirnnervenbeteiligung und einer Beatmungspflichtigkeit. Unter IVIG-Therapie zeigten die PatientInnen eine deutliche Besserung. Bei zwei der PatientInnen war nach klinischer Besserung eine erneute Testung auf Autoantikörper erfolgt und bei beiden waren die Neurofascin-IgG-Autoantikörper dann nicht mehr nachweisbar, was für die Pathogenität der Pan-Neurofascin-Autoantikörper spricht.

Schwere Paresen bis zur Tetraplegie, schwere Hirnnervenbeteiligung bis zur Locked-In-Symptomatik, teilweise autonome Symptomatik, Beatmungspflichtigkeit und Erkrankung in höherem Lebensalter verbinden IgG-Patient 1 und die Fälle von Anna-Michelle-Brunder, Vallat, Burnor und Delmont. Bei allen war ein Pan-Neurofascin-IgG-Autoantikörper nachgewiesen worden. Die dominierende Subklasse war IgG3 bei IgG-Patient 1, beiden PatientInnen von Anna-Michelle-Brunder, dem Patienten von Vallat sowie einer Patientin von Delmont. Bei den weiteren PatientInnen von Delmont und dem Fall von Burnor war allerdings die Subklasse IgG4 überwiegend.

Der Nachweis der Pan-Neurofascin-Autoantikörper erfolgte überwiegend mittels ELISA und immunhistochemischen Methoden, wobei entweder Zellbindungsassays (Burnor et al., 2018; Delmont et al., 2017) oder Bindungsassays an Zupfnerven (Stengel et al., 2019; Vallat et al., 2018) eingesetzt wurden. Nur in der Studie von Burnor wurden keine ELISA-Untersuchungen durchgeführt. Bei einem Pan-Neurofascin-Antikörper würde man im Bindungsassay an Zupfnervpräparaten sowohl eine Bindung am paranodalen Axon an Neurofascin-155 als auch direkt im nodalen Bereich an Neurofascin-186 sowie -140 erwarten. IgG-Patient 1 zeigte allerdings nur eine Bindung am paranodalen Axon. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass der Titer für Neurofascin-186 deutlich niedriger war als der von Neurofascin-155, sodass die Bindung am paranodalen Axon dominierte. Die von Anna-Michelle Brunder identifizierten PatientInnen zeigten allerdings sowohl am paranodalen als auch am nodalen Axon eine Bindung, obwohl auch bei diesen PatientInnen der Titer für Neurofascin-155-Autoantikörper höher war als für

Neurofascin-186-Autoantikörper (Stengel et al., 2019). In dem Fallbericht von Vallat zeigte sich hingegen nur eine Bindung am nodalen Axon (Vallat et al., 2018). Anhand der Bindungsstruktur des Ranvierschen Schnürringes kann somit nicht zwischen Neurofascin-IgG-Autoantikörpern gegen verschiedene Unterformen unterschieden werden, sodass die immunhistochemischen Bindungsassays an Ischiadicuspfnervpräparaten immer durch Isoformen spezifische ELISA-Untersuchungen ergänzt werden sollten.

Auch wenn es bisher keine Studien zur pathogenen Wirkung von Pan-Neurofascin-IgG3 Autoantikörpern gibt, finden sich in den dargestellten Studien erste Hinweise auf einen pathogenen Effekt. So zeigte sich in allen Fallberichten mit Pan-Neurofascin-IgG-Autoantikörpern eine charakteristische klinische Symptomatik. Außerdem wurde bei zwei PatientInnen gezeigt, dass die Pan-Neurofascin-Autoantikörper nach klinischer Besserung nicht mehr nachweisbar waren (Delmont et al., 2017). Die teilweise vollständige Erholung unter immunsuppressiven Therapien unter anderem mit Rituximab (Burnor et al., 2018; Delmont et al., 2017; Stengel et al., 2019) und die Rückbildung von Leitungsblöcken (Vallat et al., 2018) entsprechen dem Konzept der (Para-)nodopathie, bei der eine Schädigung des Ranvierschen Schnürringes vorliegt, der rasch reversibel sein kann, solange kein sekundär axonaler Schaden vorliegt (Uncini & Vallat, 2018). IgG-Patient 1 verbesserte sich allerdings trotz Rituximabtherapie und zeitlich assoziiertem Rückgang der Neurofascin-IgG-Autoantikörpertiter kaum. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei IgG-Patient 1 bereits ein axonaler Schaden eingetreten war, was sich auch in der elektromyographischen Untersuchung in Form von Spontanaktivität zeigte. Der Patient von Anna-Michelle Brunder zeigte allerdings, dass auch nach langem schwerem Verlauf eine langsame kontinuierliche Erholung möglich ist. Der Patient war über eineinhalb Jahre tetraplegisch und beatmungspflichtig. Drei Jahre später war er zwar noch auf einen Rollstuhl angewiesen, lebte aber abgesehen von Unterstützung bei den Transfers eigenständig. Da IgG-Patient 1 an den Folgen einer Sepsis verstarb, kann bei ihm keine Aussage über den langfristigen Effekt der Therapie getroffen werden.

Insgesamt ergibt sich die Hypothese, dass es sich bei den dargestellten Patienten mit Pan-Neurofascin-IgG3-Autoantikörpern um eine neue Unterform der Neurofascin-

(Para-)nodopathie mit schwerem Verlauf bei Tetraplegie, Hirnnervenbeteiligung, langer Beatmungspflicht und potenzieller Reversibilität handelt.

5.1.3 Autonome Symptomatik bei IgG-Patient 1 und 2

Bei der klinischen Symptomatik der IgG-Patienten 1 und 2 war auffällig, dass beide an einer ausgeprägten autonomen Symptomatik litten. Bei IgG-Patient 1 äußerte sich die autonome Symptomatik in einem Kreislaufstillstand, der durch eine Lagerung des Patienten ausgelöst worden war. IgG-Patient 2 litt an einer ausgeprägten orthostatischen Hypotension, Blutdruckschwankungen, veränderter Hautfarbe, Hyperhidrose und Pollakisurie.

Zwar kommt eine autonome Beteiligung bei den meisten Formen generalisierter peripherer Polyneuropathien vor, allerdings ist die autonome Symptomatik oft nur subklinisch ausgeprägt (Dineen & Freeman, 2015). Sehr häufig ist eine autonome Symptomatik bei der diabetischen Neuropathie beschrieben (Freeman, 2014), wo die kardiovaskuläre autonome Neuropathie in einem Review mit einer Prävalenz von 20 – 60 % beziffert wurde (Spallone et al., 2011). Auch beim GBS zeigen bis zu zwei Drittel der PatientInnen eine autonome Symptomatik, wobei vor allem das kardiovaskuläre System in Form von Blutdruckschwankungen sowie Tachy- bzw. Bradykardien, das gastrointestinale System und die Blasenfunktion betroffen sind (Kaur et al., 2021). Bei der CIDP kommt eine Beteiligung der autonomen Fasern zwar häufig vor, ist dabei aber in der Mehrzahl der Fälle sehr mild ausgeprägt und betrifft vor allem das sudomotorische System (Figuroa et al., 2012; Stamboulis et al., 2006). In den Studien zur Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie wurde eine autonome Symptomatik bisher nicht als charakteristisches Merkmal beschrieben. Neben der autonomen Symptomatik bei unseren Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern gibt es einen Fallbericht zu einem schwer betroffenen Patienten mit einem Pan-Neurofascin-IgG4-Autoantikörpern, der auch eine sympathische Hypersensitivität mit labilen Blutdruckwerten beschreibt (Burnor et al., 2018). Die autonome Symptomatik wurde bei den Patienten allerdings nicht durch spezifische diagnostische Tests quantifiziert.

An präganglionären autonomen Typ B Fasern konnten wir eine Bindung durch die Neurofascin-Autoantikörper unserer Patienten nachweisen, was ein mögliches Korrelat für eine pathophysiologische Beteiligung der autonomen Fasern darstellt.

Ob die autonome Symptomatik ein weiteres charakteristisches Symptom bei bestimmten Formen von Neurofascin-IgG-Autoantikörpern darstellt, sollte in größeren Studien geklärt werden, wobei die autonome Symptomatik sowohl bei PatientInnen mit als auch ohne (para-)nodalen Autoantikörpern mit Hilfe diagnostischer Testung quantifiziert werden könnte. Mögliche Tests wären hierbei QSART (Quantitative sudomotor axon reflex test) zur Quantifizierung der Schweißsekretion oder auch eine Messung des Pulses in Zusammenhang mit einem Valsalvamanöver sowie eine Kipptischuntersuchung zur Detektion einer autonomen Beteiligung des kardiovagalen bzw. adrenergen Systems (Low et al., 2013).

5.1.4 Einfluss von IgG-Subklasse, Komplementbindungsverhalten und Therapieansprechen

Beim klinischen Vergleich der IgG-Patienten 1 und 2 fällt auf, dass IgG-Patient 1 deutlich schwerer betroffen ist als IgG-Patient 2. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich schweren Erkrankungen sind die unterschiedlichen prädominierenden Subklassen der Patienten. IgG-Patient 1 zeigte vor allem die Subklasse IgG3, während bei IgG-Patient 2 die Subklasse IgG4 dominierte.

Tabelle 38 zeigt weitere PatientInnen mit schwerer klinischer Symptomatik und auch hier dominiert abgesehen von einem Fall die Subklasse IgG3. IgG3 gilt als proinflammatorisch und ist im Gegensatz zu IgG4 in der Lage das Komplementsystem stark zu aktivieren (Bindon et al., 1988; Schumaker et al., 1976; Tao et al., 1993; Vidarsson et al., 2014), was eine ausgeprägtere und akutere Pathogenität erklären könnte. Wir konnten für IgG-Patient 1 eine ausgeprägte Bindung von C1q durch die Pan-Neurofascin-IgG3 Autoantikörper nachweisen. Auch weitere Studien zeigten für PatientInnen mit (para-)nodalen IgG3-Autoantikörpern eine Komplementaktivierung (Delmont et al., 2017; Vallat et al., 2018).

In Passiv-Transfer Versuchen mit Injektion von Contactin-IgG-Autoantikörpern konnte bei kurzzeitiger Patientenantikörperexposition für Seren mit überwiegend IgG3 eine

deutlichere pathogene Wirkung als für Seren mit überwiegend IgG4 nachgewiesen werden (Doppler et al., 2019), wobei ausgeprägtere motorische Defizite sowie elektrophysiologische Leitungsblöcke auftraten. Als mögliches pathophysiologisches Korrelat zeigte sich nach Injektion der IgG3-Seren eine Komplementablagerung an den Ranvierschen Schnürringen, die nach Injektion der IgG4-Seren nicht auftrat. Dieser Aspekt unterstützt die Hypothese, dass IgG3-Autoantikörper durch die Komplementaktivierung zu einer akutereren klinischen Symptomatik führen.

In der Literatur wurde in zwei Studien bei Patienten mit akuter Erkrankung IgG3- , bei Patienten mit chronischer Erkrankung IgG4-Autoantikörper detektiert und in einer weiteren Studie wurde bei einer Patientin ein Wechsel der dominierenden Subklassen von IgG3 in der akuten Phase zu IgG4 in Verlaufsseren beschrieben, was zu der Hypothese führte, dass der Subklassenswitch von IgG3 zu IgG4 eine Chronifizierung der Erkrankung anzeigt (Appeltshauser et al., 2020; Doppler et al., 2016; Doppler et al., 2015b). Unsere Ergebnisse bei IgG-Patient 1 widersprechen dieser Hypothese, da in zahlreichen Verlaufspuren über insgesamt sieben Monate IgG3 als dominierende Subklasse ohne Anstieg von IgG4 nachgewiesen wurde, obwohl bereits eine chronifizierte Erkrankung vorlag. Eine mögliche Alternativhypothese, die in weiteren Studien untersucht werden könnte, wäre, dass das Persistieren der Subklasse IgG3 zu einem sehr schweren Krankheitsbild führt.

Bei IgG-Patient 2 zeigte sich wie bei den meisten bisher beschriebenen Fällen zur Neurofascin-(Para-)nodopathie überwiegend die Subklasse IgG4. Typischerweise aktiviert die Subklasse IgG4 das Komplementsystem kaum (Bindon et al., 1988; Schumaker et al., 1976; Tao et al., 1993; Vidarsson et al., 2014). Bei IgG-Patient 2 wurde allerdings eine Bindung an C1q im Komplementbindungsassay nachgewiesen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass neben der dominierenden Subklasse auch IgG2 nachgewiesen wurde, welches in der Lage ist das Komplementsystem zu aktivieren (Schumaker et al., 1976; Tao et al., 1993; Vidarsson et al., 2014). Auch bei anderen PatientInnen mit überwiegend Contactin-IgG4 Autoantikörpern wurde bereits eine Bindung von C1q im Komplementbindungsassay berichtet, wenn neben IgG4 auch in geringerem Maße die komplementaktivierenden Subklassen IgG1, IgG2 oder IgG3 nachgewiesen wurden (Appeltshauser et al., 2017).

PatientInnen mit überwiegend IgG4 Autoantikörpern zeigen meist kaum Ansprechen auf eine IVIG-Therapie (Burnor et al., 2018; Cortese et al., 2020; Devaux et al., 2016; Kadoya et al., 2016; Querol et al., 2014). Auch bei IgG-Patient 2 war dies der Fall. Eine Erklärung ist, dass die fehlende Komplementaktivierung durch IgG4 für das geringe Ansprechen auf IVIG-Therapie verantwortlich ist (Appeltshauser et al., 2017; Querol et al., 2014). Aus dieser Erklärung ergibt sich die Frage, ob dann PatientInnen mit Autoantikörpern der komplementaktivierenden Subklasse IgG3 auf IVIG-Therapie ansprechen und tatsächlich zeigten einige PatientInnen mit paranodalen IgG3-Autoantikörpern eine deutliche Besserung unter IVIG-Therapie (Appeltshauser et al., 2020; Cortese et al., 2020). Weshalb IgG-Patient 1 sich unter IVIG-Therapie allerdings weiter verschlechterte, bleibt unklar. Der aggressive Verlauf bei IgG-Patient 1 könnte neben der Subklasse IgG3 auch durch die Epitope der Autoantikörper bedingt sein.

Bezüglich der Therapie gibt es mittlerweile etliche Fallberichte von PatientInnen mit IgG4-Autoantikörpern, die eine deutliche Besserung unter Rituximabtherapie gezeigt haben (Cortese et al., 2020; Doppler et al., 2015b; Querol et al., 2015). Es ist sogar eine erste randomisierte, kontrollierte Studie zu Rituximab bei PatientInnen mit paranodalen IgG4-Autoantikörpern geplant (Shimizu et al., 2020). IgG-Patient 2 zeigte unter Rituximabtherapie allerdings allergische Reaktionen, sodass diese nur verzögert verabreicht werden konnte, einige Monate nach der Rituximabgabe war sogar ein höherer Neurofascin-155-IgG-Autoantikörpertiter als vor der Therapie nachweisbar und leider besserten sich auch die Symptome des Patienten kaum. Auch IgG-Patient 1 erhielt eine Rituximabtherapie, worunter zwar der Titer der Neurofascin-IgG Autoantikörper abfiel, aber nur wenig klinische Besserung zu beobachten war. Dies könnte an dem bereits vorhanden axonalen Schaden gelegen haben.

Zusammenfassend profitierten die in dieser Promotion identifizierten Neurofascin-IgG-Patienten weder von einer IVIG-Therapie noch von Rituximab. Studien zum Therapieansprechen bei PatientInnen mit (para-)nodalen Autoantikörpern sollten bei der Auswertung sowohl die Subklasse als auch einen bereits vorhandenen axonalen Schaden berücksichtigen, da diese Aspekte mögliche Gründe für das fehlende Therapieansprechen darstellen.

5.1.5 Möglicher Einfluss des Epitopes auf Schwere der Erkrankung

Die Bindungsassays an Ischiadicuszupfnervpräparaten mit zuvor an transfizierten HEK-293-Zellen präinkubierten Seren führten zu der Hypothese, dass bei IgG-Patient 1 Autoantikörper vorliegen, die an unterschiedliche Epitope des Neurofascin-Proteins binden, da nach Präinkubation an Neurofascin-155 die paranodal axonale Bindung verschwand, während sie nach Präinkubation an Neurofascin-186 in abgeschwächter Form persistierte. Auch die Tatsache, dass für Neurofascin-155-IgG höhere Titer im Vergleich zu Neurofascin-186-IgG im ELISA festgestellt wurden, unterstützt die Hypothese des Vorliegens von Autoantikörpern mit mehreren Epitopen. Die Abbildung 3 zeigt den Aufbau der Neurofascin-Isoformen-155, -186 und -140, die jeweils unterschiedliche Fn-Domänen und sechs identische Ig-Domänen besitzen.

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Edgar Meinl (München) wurde durch Atay Vural (AG Meinl) eine Charakterisierung der Epitope mittels Bindung an verschiedene Neurofascin-Mutanten durchgeführt (Stengel et al., 2019). Hierbei zeigte sich, dass die Autoantikörper von IgG-Patient 2 an die für Neurofascin-155 spezifische Fn-Domäne Fn3Fn4 banden. Neurofascin-155 spezifische Teile der Fn-Domäne, wurden bereits mehrfach als Epitop von Neurofascin-155-IgG4 Autoantikörpern beschrieben (Delmont et al., 2017; Devaux et al., 2016; Ng et al., 2012). Die Autoantikörper von IgG-Patient 1 banden sowohl an Fn3, welches eine für Neurofascin-155 spezifische Domäne darstellt, als auch an die 6Ig-Domäne, welche in allen drei Neurofascin-Isoformen-155, -186 und -140 exprimiert wird. Somit bestätigte sich die aus den Versuchsergebnissen der Promotion gewonnene Hypothese, dass Autoantikörper mit zwei Epitopen vorlagen.

Eine mögliche Ursache für das Vorliegen von zwei Epitopen stellt das Phänomen des Epitopsreadings dar, wobei die Autoantikörper nicht auf das initiale Epitop beschränkt bleiben, sondern im Verlauf der Erkrankung auch Antikörper gegen weitere Epitope auftreten, was bei chronischem Verlauf einer Erkrankung durch die wiederholte Erkennung von körpereigenen Antigenen bedingt ist und bereits bei mehreren chronischen neurologischen Erkrankungen wie beispielsweise Multipler Sklerose oder Myasthenia gravis beschrieben wurde (Huijbers et al., 2014; Sinmaz et al., 2016; Vanderlugt & Miller, 1996). Das Phänomen des Epitopsreadings könnte auch erklären,

dass sich das Bindungsverhalten der Autoantikörper von IgG-Patient 1 an Ischiadicuspfnerven im Verlauf der Erkrankung verändert hat (siehe Abbildung 19).

Das Auftreten von zwei unterschiedlichen Epitopen stellt eine mögliche Ursache für die Schwere der Erkrankung von IgG-Patient 1 dar. Andere PatientInnen mit Pan-Neurofascin-Autoantikörpern, die weniger schwer betroffen waren, reagierten nur gegen die Ig-Domäne (Delmont et al., 2017). Bei der Myasthenia gravis wurde das Auftreten mehrerer Epitope bereits als Prädiktor eines schweren Krankheitsverlaufes identifiziert (Huijbers et al., 2014).

Dass sich die pathogene Wirkung von Autoantikörpern gegen dasselbe Antigen bei unterschiedlichen Epitopen deutlich unterscheiden kann, wurde in Passiv-Transfer Experimenten mit Acetylcholinrezeptoren gezeigt, wobei Autoantikörper, die gegen ein Epitop der Alpha-Untereinheit des Acetylcholinrezeptors gerichtet waren, in Ratten Myasthenie Symptome induzierten, während diese bei Autoantikörpern gegen die Beta-Untereinheit nicht auftraten (Tzartos et al., 1987).

Die ausgesprochene Schwere der Erkrankung könnte bei IgG-Patient 1 durch die Bindung an die 6Ig-Domäne bedingt sein, die allen drei Neurofascin-Isoformen gemeinsam ist, sodass es zu einem additiven pathogenen Effekt bei Beeinträchtigung der Funktion aller drei Isoformen kommen könnte.

5.1.6 Ausblick Pan-Neurofascin-IgG3-(Para-)nodopathie als Subtyp der Neurofascin-(Para-)nodopathie

Zusammenfassend ergibt sich aus den hier diskutierten Aspekten, dass bei der Testung auf (para-)nodale Autoantikörper der Bestimmung von Isoformenreaktivität, der Subklassenanalyse sowie der Epitopcharakterisierung eine hohe Bedeutung zukommt. Die Identifikation weiterer PatientInnen mit Neurofascin-Autoantikörpern unter Berücksichtigung oben genannter Parameter wird zeigen, ob die Pan-Neurofascin-IgG3-(Para-)nodopathie mit Reaktivität gegen mehrere Epitope tatsächlich einen neuen Subtyp der Neurofascin-(Para-)nodopathie darstellt, die sich mit einer außergewöhnlich schweren, potentiell reversiblen Erkrankung und den charakteristischen Symptomen von Tetraplegie, Hirnnervenbeteiligung und Beatmungspflichtigkeit von der Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie und von CIDP-PatientInnen ohne (para-)nodale

Autoantikörper abhebt. Hinsichtlich der Pathophysiologie sind insbesondere der Einfluss von Subklassen, Epitopen und die damit verbundene Wirkung des Komplementsystems relevant. Aus einer nachgewiesenen pathophysiologischen Wirkung des Komplementsystems könnten sich auch neue Therapieansätze wie der Einsatz von Eculizumab, der gegen den Komplementfaktor C5 gerichtet ist, ergeben.

5.2 Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper bei (Para-)nodopathien

Bisher haben sich die Studien zu (Para-)nodopathien auf IgG-Autoantikörper konzentriert. Im Rahmen dieser Promotion wurden Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern bei insgesamt fünf PatientInnen nachgewiesen. Zwei der Patienten litten an einer CIDP mit Erfüllung der INCAT-Diagnosekriterien, ein Patient an einem GBS und bei zwei der PatientInnen bestand der Verdacht auf eine CIDP Erkrankung ohne Erfüllung der INCAT-Diagnosekriterien. Bei keinem weiteren der untersuchten PatientInnen oder Kontrollen konnten IgM-Autoantikörper gegen Neurofascin-155, -186 oder Contactin-1 nachgewiesen werden. Die Detektion der IgM-Autoantikörper erfolgte mittels ELISA, was laut einem Review die am besten standardisierte Methode zum Nachweis von nervalen Autoantikörpern darstellt (Delmont & Hugh, 2015). Bei vier der fünf PatientInnen konnten die Neurofascin-155-IgM Autoantikörper mittels einer eindeutigen Bande im Western Blot bestätigt werden. Die Spezifität der Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper wurde außerdem durch Präabsorptionsexperimente an ELISA-Platten bestätigt.

(Para-)nodale IgM-Autoantikörper gegen Neurofascin wurden bisher nur in wenigen Studien mittels ELISA nachgewiesen, wobei die Neurofascin-IgM Antikörper hierbei häufig neben Neurofascin-155-IgG Autoantikörpern auftraten (Burnor et al., 2018; Delmont et al., 2020; Ng et al., 2012). Die bisher niedrige Detektionsrate von (para-)nodalen IgM-Autoantikörpern könnte dadurch bedingt sein, dass sich manche Studien komplett auf (para-)nodale IgG-Autoantikörper konzentrieren. Gerade einige großen Studien zur Detektion (para-)nodaler Autoantikörper führten keine IgM-Testung durch (Cortese et al., 2020; Ogata et al., 2015), andere Studien testeten nur bei positivem Ergebnis für IgG-Autoantikörper auch auf IgM (Delmont et al., 2020). Eine Studie, die alle Seren auch auf Neurofascin-IgM-Autoantikörper untersuchte, konnte diese bei 8 % der PatientInnen mit autoimmuner Neuropathie, 2 % der PatientInnen mit hereditärer

Neuropathie und 5 % der PatientInnen mit idiopathischer Neuropathie nachweisen (Burnor et al., 2018). Ein Fallbericht beschrieb einen Pan-Neurofascin-IgM-Autoantikörper bei einem GBS-Patienten in Zusammenhang mit einer Covid-19-Infektion (Tard et al., 2020). Eine weitere Studie fand 30 GBS- bzw. CIDP-PatientInnen mit (para-)nodalen IgM-Autoantikörpern, wobei die Autoantikörper lediglich in Zellbindungsassays an transfizierten HEK-Zellen detektiert wurden (Devaux et al., 2012), sodass diese Ergebnisse eventuell auch durch unspezifische Bindungen bedingt sein könnten.

(Para-)nodale IgM-Autoantikörper gegen Neurofascin-186 und Gliomedin wurden zwischenzeitlich auch mit einer Prävalenz von 12 % bei PatientInnen mit MMN nachgewiesen (Notturmo et al., 2014), was sich allerdings in einer nachfolgenden Studie nicht bestätigen ließ, und möglicherweise durch Probleme wie die Verwendung eines Rattenproteins und die Berechnung eines Grenzwertes aus wenigen Kontrollen erklärt werden kann (Doppler et al., 2015a).

Zusammenfassend wurden (para-)nodale IgM-Autoantikörper bei CIDP und GBS vereinzelt beschrieben, auch wenn sich abgesehen von einer Studie (Doppler et al., 2018), die im Rahmen dieser Promotion entstand, noch keine Studie explizit den IgM-Autoantikörpern bei (Para-)nodopathie gewidmet hat.

5.2.1 Vorkommen von IgM-Autoantikörpern bei inflammatorischen Polyneuropathien

Bei einigen Formen inflammatorischer Polyneuropathien hat sich bereits eine große Bedeutung von IgM-Autoantikörpern gezeigt. Bei der MMN besitzen IgM-Autoantikörper gegen das Gangliosid GM-1 bereits diagnostischen Stellenwert und treten je nach verwendeter Methode mit einer Prävalenz von 20-85 % auf (Vlam et al., 2012). Außerdem wurden bei etwa 50 % der PatientInnen mit einer monoklonalen IgM-Gammopathie assoziierten Neuropathie Anti-MAG-IgM-Autoantikörper nachgewiesen (Kuijf et al., 2009; Nobile-Orazio et al., 1994). Anti-Disialosyl-IgM-Autoantikörper konnten bei der sensiblen ataktischen Neuropathie beschrieben werden (Willison et al., 2001; Yuki & Uncini, 2014). Die Pathogenität der genannten IgM-Autoantikörper ist jedoch umstritten (siehe auch Kapitel 5.2.4).

Nachdem sich die diagnostische Bedeutung von IgM-Autoantikörpern bei der MMN und der monoklonalen IgM-Gammopathie assoziierten Neuropathie bereits gezeigt hat, sollte bei PatientInnen mit CIDP und GBS die Testung auf (para-)nodale IgM-Autoantikörper in größeren Studien durchgeführt werden, um deren Prävalenz und ihre Bedeutung zu untersuchen. Anhand der fünf PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM, die in dieser Promotion beschrieben werden, kann noch keine Aussage über die generelle Prävalenz dieser Autoantikörper bei CIDP- bzw. GBS-PatientInnen getroffen werden, da die Fallzahl dieser Promotionsarbeit für eine Prävalenzbestimmung nicht ausreichend ist und überwiegend zu diagnostischen Zwecken eingesandte Seren untersucht wurden, bei denen keine systematischen Kriterien zur Diagnosestellung einer CIDP angewendet werden konnten.

5.2.2 Klinische, elektrophysiologische und histopathologische (Para-)nodopathie Merkmale der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern

Hervorstechende Merkmale der fünf PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern sind ein akuter Erkrankungsbeginn (3/5), eine ausgeprägte Tetraparese (5/5), ein Tremor (4/5), eine sensible Ataxie (2/5) sowie neuropathische Schmerzen (4/5). Hierbei zeigt sich eine erstaunliche Ähnlichkeit zu den Merkmalen, die auch PatientInnen mit verschiedenen Formen von paranodalen IgG-Autoantikörpern aufweisen, wo akuter Erkrankungsbeginn, schwere motorisch betonte Polyneuropathie und Tremor als charakteristische Symptome einer IgG-(Para-)nodopathie angesehen werden (Doppler & Sommer, 2017). Dies legt nahe, dass paranodale IgM-Autoantikörper einen ähnlichen Effekt wie IgG-Autoantikörper aufweisen und bei den IgM-PatientInnen eine (Para-)nodopathie vorliegt. Es konnten bereits mehrere Studien zeigen, dass sich PatientInnen mit paranodalen IgG-Autoantikörpern in ihren klinischen Merkmalen von PatientInnen ohne Nachweis von paranodalen Autoantikörpern abheben, wobei sich für die verschiedenen IgG4 Autoantikörper gegen Neurofascin-155, Contactin-1 und CASPR-1 jeweils charakteristische klinische Merkmale herauskristallisiert haben (Koike & Katsuno, 2020; Tang et al., 2020; Vural et al., 2018).

Drei der vier CIDP-PatientInnen litten an einem derart ausgeprägten Tremor, dass er von den Patienten selbst als im Alltag beeinträchtigend beschrieben wurde. Auch der GBS-

Patient litt an einem Tremor, wobei dieser erst nach der akuten Phase der Erkrankung auftrat. Ein Tremor wurde, wie bereits zuvor diskutiert, auch bei der Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie als charakteristisches Symptom identifiziert (Cortese et al., 2016; Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2020; Devaux et al., 2016; Kadoya et al., 2016; Kuwahara et al., 2018; Ogata et al., 2015; Painous et al., 2018; Querol et al., 2014) und ebenfalls mehrmals bei PatientInnen mit Contactin-1 oder CASPR-1-IgG4 Autoantikörpern beschrieben (Cortese et al., 2020; Doppler et al., 2015b).

Eine sensible Ataxie wie sie bei zwei der fünf IgM-PatientInnen auftrat, wurde bereits bei der Contactin-1-, CASPR-1- sowie Neurofascin-155-IgG-(Para-)nodopathie beschrieben (Cortese et al., 2020; Devaux et al., 2016; Garg et al., 2018; Miura et al., 2015). Eine Affektion der Spinalganglienneurone durch die paranodalen IgG- bzw. IgM-Autoantikörper stellt hier ein mögliches pathophysiologisches Korrelat dar.

Auffällig sind auch die neuropathischen Schmerzen bei vier der fünf IgM-PatientInnen. Neuropathische Schmerzen sind bisher nur bei PatientInnen mit CASPR-1-IgG-Autoantikörpern als charakteristisches klinisches Merkmal beschrieben worden (Doppler et al., 2016). Interessanterweise wurden ausgeprägte Schmerzen auch bei weiteren drei der bisher beschriebenen PatientInnen mit Neurofascin-IgM-Autoantikörpern beschrieben (Burnor et al., 2018). Bei der CIDP kommen neuropathische Schmerzen im allgemeinen eher selten vor und sind dabei nur schwach ausgeprägt (Dyck & Tracy, 2018), sodass es sich bei den neuropathischen Schmerzen um ein charakteristisches klinisches Merkmal von PatientInnen mit Neurofascin-IgM-Autoantikörpern handeln könnte. Eine mögliche Ursache für die neuropathischen Schmerzen wäre eine Beteiligung der kleinen Nervenfasern, was auch die reduzierte Nervenfaserdichte in den Hautbiopsien von zwei der IgM-PatientInnen erklären könnte. Ein weiterer Erklärungsansatz für neuropathische Schmerzen würde sich aus der Affektion von Spinalganglienneuronen ergeben.

Die Identifikation von weiteren PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern in größeren Studien ist notwendig, um die hier diskutierten klinischen Merkmale und insbesondere den Tremor sowie die neuropathischen Schmerzen als charakteristisch zu bestätigen.

Auch wenn sich die klinischen Merkmale der IgM-PatientInnen sehr gut mit denen einer (Para-)nodopathie vereinbaren lassen, zeigten sich bei den diagnostischen Ergebnissen Unterschiede zwischen den IgM-PatientInnen und dem bisherigen Konzept der (Para-)nodopathie bei PatientInnen mit IgG-Autoantikörpern.

In der elektrophysiologischen Diagnostik zeigte sich bei den IgM-Patienten 1, 2, 4 und 5 ein demyelinisierendes Bild. Bei IgM-Patientin 3, bei der die IgM-Autoantikörper im Western Blot nicht bestätigt werden konnten, waren lediglich leicht verminderte Amplituden auffällig. Leitungsblöcke konnten bei den IgM-PatientInnen nicht nachgewiesen werden und zwei der IgM-PatientInnen mit klinischem Verdacht auf CIDP erfüllten die elektrophysiologischen INCAT-Diagnosekriterien nicht. Bei den PatientInnen mit paranodalen IgG-Autoantikörpern zeigen sich Befunde eines scheinbar demyelinisierenden Bildes, die auch die elektrophysiologischen Kriterien einer CIDP erfüllen (Delmont et al., 2017; Devaux et al., 2016; Doppler et al., 2015b; Fujita et al., 2018; Kouton et al., 2020; Ogata et al., 2015; Querol et al., 2013). Diese scheinbar demyelinisierenden Befunde können beim Konzept der (Para-)nodopathie durch eine Störung der Ranvierschen Schnürringe erklärt werden (Uncini & Kuwabara, 2015; Uncini & Vallat, 2018). Eine Studie konnte zeigen, dass sich die elektrophysiologischen Befunde parallel zu Schwankungen des Titers von Neurofascin-155-IgG-Autoantikörpern verbesserten bzw. verschlechterten (Fujita et al., 2018), was das Konzept der (Para-)nodopathie unterstützt, wonach die elektrophysiologischen Veränderungen direkt durch die Wirkung der paranodalen Autoantikörper am Ranvierschen Schnürring und eben nicht durch eine Demyelinisierung hervorgerufen werden. Typisch bei einer Schädigung des Ranvierschen Schnürringes sind auch Leitungsblöcke, sowie bei ausgeprägter Erkrankung ein sekundär axonaler Schaden (Uncini & Kuwabara, 2015). Ein axonaler Schaden, konnte bei den IgM-PatientInnen nachgewiesen werden. Da die IgM-PatientInnen in den elektrophysiologischen Untersuchungen ein scheinbar demyelinisierendes Bild boten, sind sie grundsätzlich mit dem Konzept der (Para-)nodopathie zu vereinbaren, auch wenn die für die IgG-(Para-)nodopathie charakteristischen Leitungsblöcke bei den identifizierten IgM-PatientInnen fehlten.

Auffallend war, dass zwei der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern zwar die klinischen Diagnosen einer CIDP erhielten, die elektrophysiologischen INCAT-

Diagnosekriterien allerdings nicht erfüllten. Hieraus ergibt sich, dass das Screening auf (para-)nodale Autoantikörper nicht nur auf PatientInnen mit Erfüllung der elektrophysiologischen Diagnosekriterien beschränkt werden sollte.

In den Suralisbiopsien der vier IgM-PatientInnen mit CIDP zeigte sich ein überwiegend axonales Schädigungsmuster und in zwei der drei durchgeführten Hautbiopsien zeigte sich eine verringerte intraepidermale Nervenfaserdichte. Bei drei der IgM-PatientInnen wurden frisch gezupfte Nervenfasern einer Suralisbiopsie bzw. myelinisierte Fasern einer Hautbiopsie analysiert, wobei sich die Lokalisation der paranodalen Proteine Contactin-1 und CASPR-1 und der nodalen Natriumkanäle sowie die Länge der Ranvierschen Schnürringe unauffällig zeigten. Auch bei PatientInnen mit IgG-Autoantikörpern gegen Neurofascin-155 bzw. Contactin-1 hatte sich ein axonales Schädigungsmuster gezeigt. Allerdings waren bei PatientInnen mit paranodalen IgG-Autoantikörpern passend zum Konzept der (Para-)nodopathie verlängerte Ranviersche Schnürringe und eine Zerstörung der paranodalen Architektur beobachtet worden (Doppler et al., 2015b; Koike et al., 2017; Koike & Katsuno, 2020). Bei der CIDP ohne Autoantikörper zeigt sich hingegen klassischerweise das Bild einer Makrophagen induzierten Demyelinisierung (Vital et al., 2000). Somit heben sich die Nervenbiopsien der IgM-PatientInnen mit CIDP durch die axonale Schädigung zwar deutlich von einer klassischen CIDP ab, allerdings war auch keine Zerstörung der Ranvierschen Schnürringe sichtbar, wie man sie bei einer klassischen IgG-(Para-)nodopathie erwarten würde.

Zusammenfassend passt die klinische Symptomatik, das axonale Schädigungsmuster in den Nervenbiopsien sowie die scheinbar demyelinisierenden Zeichen in den elektrophysiologischen Untersuchungen der IgM-PatientInnen zu einer (Para-)nodopathie, wobei die bei der IgG-(Para-)nodopathie typischerweise nachweisbare Zerstörung der Schnürringarchitektur fehlte. Der pathophysiologische Wirkmechanismus der Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper war nicht Ziel dieser Promotion. Studien insbesondere mit Passiv-Transfer- oder Zellkulturexperimenten könnten jedoch zeigen, inwieweit die IgM-Autoantikörper den Ranvierschen Schnürring histopathologisch sowie elektrophysiologisch schädigen und sie somit mit dem Konzept der (Para-)nodopathie in Einklang zu bringen sind.

5.2.3 Therapieansprechen auf Plasmapherese, Rituximab und IVIG unter Berücksichtigung der Komplementaktivierung

Von den PatientInnen mit nachgewiesenen Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern haben drei auf Plasmapherese, drei auf IVIG und einer sehr gut auf Rituximab angesprochen, wobei teilweise mehrere Therapien erhalten wurden (siehe Tabelle 37). Über das Therapieansprechen von PatientInnen mit (para-)nodalen IgM-Autoantikörpern ist bisher wenig bekannt. Ein CIDP- sowie ein AMAN-Patient, bei denen Neurofascin-186-IgM-Autoantikörper nachgewiesen worden waren, verbesserten sich unter IVIG-Therapie (Burnor et al., 2018). Zwei GBS-Patienten mit (para-)nodalen IgM-Autoantikörpern sprachen auf Plasmapherese an, wobei bei einem ein Pan-Neurofascin- und bei dem anderen ein Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper nachgewiesen worden war (Burnor et al., 2018; Tard et al., 2020).

Drei der IgM-PatientInnen profitierten von einer Plasmapheresetherapie. Die schnelle Besserung dieser Patienten spricht dafür, dass humorale Faktoren wie Autoantikörper oder Komplement für die Symptomatik verantwortlich waren. Auch bei den PatientInnen mit paranodalen IgG-Autoantikörpern wurde die Plasmapherese schon häufig als effektive Therapie berichtet (Burnor et al., 2018; Kadoya et al., 2016; Ng et al., 2012; Ogata et al., 2015; Querol et al., 2014).

Außerdem fällt auf, dass mehrere PatientInnen mit (para-)nodalen IgM-Autoantikörpern von einer IVIG-Therapie profitierten, während bei paranodalen IgG-Autoantikörpern ein Nichtansprechen auf IVIG als charakteristisches klinisches Merkmal der IgG4-(Para-)nodopathie identifiziert wurde (Burnor et al., 2018; Cortese et al., 2020; Devaux et al., 2016; Kadoya et al., 2016; Querol et al., 2014). IgM wirkt allerdings stark (Daha et al., 2011; Lintner et al., 2016; Sharp et al., 2019), IgG4 kaum komplementaktivierend (Bindon et al., 1988; Schumaker et al., 1976; Tao et al., 1993; Vidarsson et al., 2014), was eine mögliche Erklärung für das Ansprechen auf IVIG bei PatientInnen mit (para-)nodalen IgM-Autoantikörpern darstellt. Bei den GM1-IgM-Autoantikörpern konnte die Wirkung von IVIG sowohl in vivo als auch in vitro bereits belegt werden. In vitro Studien zeigten, dass die durch GM1-IgM-Autoantikörper induzierte Komplementaktivierung durch IVIG dosisabhängig reduziert wird (Malik et al., 1996; Piepers et al., 2010; Yuki et al., 2011) und bei der mit IgM-GM1-Autoantikörpern

assozierten MMN konnte eine Metaanalyse über vier Placebo korrelierte, randomisierte Studien einen Benefit durch IVIG belegen (van Schaik et al., 2005). Somit scheint ein Benefit durch IVIG auch bei Neurofascin-IgM-Autoantikörpern plausibel. Allerdings konnte mit den Seren der IgM-PatientInnen keine Komplementbindung von C1q detektiert werden. Dieses Ergebnis verwundert zunächst, da IgM-Autoantikörper in der Lage sind an C1q zu binden und somit über den klassischen Aktivierungsweg das Komplementsystem aktivieren können (Daha et al., 2011; Lintner et al., 2016; Sharp et al., 2019). Der niedrige Titer der Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper, der lediglich 1:100-1:400 betrug, stellt die wahrscheinlichste Ursache für den negativen Komplementbindungsassay dar, denn auch bei MMN-PatientInnen konnte gezeigt werden, dass GM1-IgM Autoantikörper in vitro teilweise bis zu einem Titer von 1:400 das Komplementsystem nicht aktivieren konnten (Piepers et al., 2010; Vlam et al., 2015) und bei GM1-IgM-Autoantikörpern korrelierte die Ausprägung der Komplementaktivierung mit dem Titer (Piepers et al., 2010; Vlam et al., 2015; Yuki et al., 2011). Es könnte sich hier also um ein methodisches Problem handeln, sodass die Komplementaktivierung durch Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper erst ab einem höheren Titer auch in vitro detektierbar ist.

Ob sich aus der Detektion von (para-)nodalen IgM-Autoantikörpern in der Zukunft auch therapeutische Konsequenzen ergeben, wird sich erst in größeren Studien durch die Detektion weiterer PatientInnen sowie den Vergleich des Therapieansprechens insbesondere von IVIG, Plasmapherese und Rituximab zeigen.

5.2.4 Epiphänomen oder pathogene Wirkung von Neurofascin-155-IgM?

Da über die Wirkung von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern bei Polyneuropathien bisher kaum Studien existieren, stellt sich die Frage, ob die Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper, die im Rahmen dieser Promotion bei fünf PatientInnen beschrieben wurden, pathogen sind oder lediglich als Epiphänomen auftreten.

IgM- gelten grundsätzlich als weniger pathogen als IgG-Autoantikörper. Den bereits bei Geburt vorhandenen polyreaktiven natürlichen IgM-Antikörpern wird sogar eine protektive Wirkung zugeschrieben, die Inflammation und auch Autoimmunität

unterdrückt (Ehrenstein et al., 2000; Grönwall & Silverman, 2014; Lobo, 2016). In Mäusen konnte außerdem gezeigt werden, dass es bei fehlender IgM Sekretion zum verstärkten Auftreten von Autoimmunität kommt (Boes et al., 2000; Ehrenstein et al., 2000).

Bei den GM1-IgM- wie auch bei den Anti-MAG-IgM-Autoantikörpern verdichten sich jedoch die Hinweise auf deren Pathogenität. So korrelieren die Titer von GM1-IgM-Autoantikörpern mit der Ausprägung der Muskelschwäche von PatientInnen (Cats et al., 2010) und im Modell an aus pluripotenten Stammzellen generierten Motoneuronen konnte eine durch Komplement vermittelte strukturelle Schädigung durch GM1-IgM-Patientenantikörper nachgewiesen werden (Harschnitz et al., 2016). In Suralisbiopsien von PatientInnen mit Anti-MAG-IgM fand sich weiterhin eine signifikant weitere Verteilung paranodaler Proteine, wobei die Weite der Verteilung von Neurofascin mit dem Anti-MAG-IgM-Autoantikörpertiter korrelierte (Kawagashira et al., 2020), und Passiv-Transfer-Experimente mit Anti-MAG-IgM aus Patientenseren führten in verschiedenen Tierarten zu komplementabhängiger Demyelinisierung (Hays et al., 1987; Monaco et al., 1995; Tatum, 1993).

Auch bei den Neurofascin-IgM-Autoantikörpern lassen sich bereits Hinweise auf die Pathogenität finden. So sind bei mehreren Patienten mit Neurofascin-IgM-Autoantikörpern bei klinischer Erholung keine IgM-Autoantikörper mehr nachweisbar. Neben IgM-Patient 1 mit einer CIDP und IgM-Patient 2 mit einer GBS-Erkrankung wurde auch bei zwei weiteren GBS- sowie einem AMAN-Patienten berichtet, dass die Neurofascin-IgM-Autoantikörper nach überstandener Erkrankung bzw. deutlicher Verbesserung nicht mehr detektierbar waren (Burnor et al., 2018; Tard et al., 2020). Weiterhin wurde in einem Passiv-Transfer-Experiment gezeigt, dass eine autoimmune experimentelle Neuritis in Lewis Ratten durch die Injektion von Pan-Neurofascin-IgM sowohl verlängert als auch verstärkt wird (Ng et al., 2012), was stark für einen pathogenen Effekt der Neurofascin-IgM-Autoantikörper spricht.

Burnor postuliert, dass bei PatientInnen mit (para-)nodalen IgG4-Autoantikörpern zuvor ein IgM-Autoantikörper vorgelegen habe (Burnor et al., 2018), da die reifenden B-Zellen Immunglobuline in der Reihenfolge $\text{IgM} \rightarrow \text{IgG3} \rightarrow \text{IgG1} \rightarrow \text{IgG2} \rightarrow \text{IgG4}$ produzieren (Collins & Jackson, 2013). Bei Infektionen ist ein Klassenwechsel von IgM als

Primärantwort zu IgG im Rahmen einer Sekundärantwort ein gut bekannter Mechanismus, sodass die Hypothese von Burnor zunächst gut nachvollziehbar scheint. Allerdings wird die Hypothese des Antikörperklassenwechsels durch die Verläufe von zwei der hier identifizierten IgM-PatientInnen in Frage gestellt. Bei IgM-Patientin 3 mit V.a. CIDP waren die Neurofascin-155-IgM-Autoantikörper in zahlreichen Proben über drei Jahre hinweg und bei IgM-Patient 5 mit einer chronisch progredienten elektrophysiologisch gesicherten CIDP retrospektiv sogar über 8 Jahre nachweisbar, sodass eine regelhafte Serokonversion von IgM zu IgG nahezu ausgeschlossen werden kann. Somit sind (para-)nodale IgM-Autoantikörper nicht nur als ein den (para-)nodalen IgG-Autoantikörpern vorausgehendes Phänomen einzustufen.

Da also mehrere Aspekte für die Pathogenität von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern sprechen, sollte die Testung auf IgM Autoantikörper in das Screening auf (para-)nodale Autoantikörper in Zukunft regelhaft miteinbezogen werden. Denn nur so kann sich zeigen, ob es sich bei Polyneuropathien mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern um eine IgM-(Para-)nodopathie handelt.

5.3 Cerebelläre Beteiligung bei Neurofascin-(Para-)nodopathien

IgG-Patient 2 mit Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern und auch vier der fünf IgM-PatientInnen zeigten in den klinischen Befunden einen ausgeprägten Tremor. Bei der Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathie wurde ein Tremor als charakteristisches Merkmal identifiziert (Cortese et al., 2016; Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2020; Devaux et al., 2016; Kadoya et al., 2016; Kuwahara et al., 2018; Ogata et al., 2015; Painous et al., 2018; Querol et al., 2014). Bei den Patienten mit Neurofascin-155-IgM Tremor war die Symptomatik so ausgeprägt, dass der Tremor von allen drei CIDP- und dem einen GBS-Patienten als störend beschrieben wurde. IgG-Patient 1 mit nachgewiesenen Pan-Neurofascin-IgG3-Autoantikörpern zeigte keinen Tremor, wobei dieser auch durch die aufgetretene Tetraplegie verschleiert gewesen sein könnte. Dieser Erklärungsansatz wird auch durch den Krankheitsverlauf von IgM-Patient 4 unterstützt, der seinen Tremor erst nach überstandener akuter Krankheitsphase, die mit einer schweren Tetraparese einherging, entwickelte.

Der Tremor ist ein Symptom das bei Polyneuropathien zwar vorkommen kann, dann aber meist sehr mild ausgeprägt ist (Deuschl & Bergman, 2002; Saifee et al., 2013;

Wasielewska et al., 2013). Bei der in Zusammenhang mit der IgM monoklonalen Gammopathie auftretenden Polyneuropathie zeigte sich in mehreren Studien ein häufiges Auftreten eines Tremors (Ahlskog et al., 2012; Bain et al., 1996; Saifee et al., 2013). Dies stellt einen spannenden Aspekt dar, da hier ebenfalls häufig Autoantikörper vorkommen.

Grundsätzlich stellt sich beim Tremor von PolyneuropathiepatientInnen die Frage, ob er durch eine periphere Beteiligung mit verbundenem sensiblem Defizit oder aber durch eine zentrale Beteiligung des Kleinhirnes bedingt ist (Deuschl & Bergman, 2002). Bei den Fällen zu Neurofascin-155-IgG4-(Para-)nodopathien wurde immer wieder eine cerebelläre Beteiligung vermutet. Neben dem Tremor traten bei den beschriebenen Fällen auch weitere Symptome eines cerebellären Syndroms wie eine Dysarthrie, Nystagmus, Gangataxien (Bailly et al., 2018; Demichelis et al., 2018; Devaux et al., 2016; Querol et al., 2014) sowie ein für eine sensible Beteiligung eher untypischer Tremor von Zunge oder Kopf sowie Stimme auf (Briani et al., 2019; Painous et al., 2018).

Außerdem gibt es zumindest für Neurofascin-IgG-Autoantikörper erste pathophysiologische Hinweise einer Wirkung auf das Kleinhirn. Bereits zwei Studien konnten eine Bindung von Seren mit Neurofascin-155-IgG4 an Kleinhirnschnitten von Ratten bzw. Mäusen zeigen (Devaux et al., 2016; Querol et al., 2014). Sowohl für IgG-Patient 1 als auch für IgG-Patient 2 konnte im Rahmen dieser Promotion eine Bindung an cerebelläre murine Neurone nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung an cerebelläre Neurone nicht auf die Neurofascin-IgG4-Patientenantikörper beschränkt bleibt, sondern auch bei Pan-Neurofascin-IgG3-Patientenantikörpern auftritt. IgM-Bindungsassays an cerebellären Neuronen zur Untersuchung der Seren mit Neurofascin-155-IgM konnten leider nicht etabliert werden.

Dass eine Schädigung von Neurofascin durch die Autoantikörper für die cerebelläre Symptomatik der PatientInnen verantwortlich sein könnte, zeigt sich auch in zwei Neurofascin-Knockout-Experimenten, bei denen die Tiere ohne Expression von Neurofascin-Protein eine schwere Ataxie entwickelten und eine Degeneration cerebellärer Purkinjezellen nachgewiesen werden konnte (Buttermore et al., 2012; Pillai et al., 2009).

Es stellt sich allerdings die Frage, ob (para-)nodale Autoantikörper aus dem Serum überhaupt die Bluthirnschranke überwinden können, um auf das Kleinhirn einzuwirken, da bislang keine intrathekale Synthese (para-)nodaler Autoantikörper gezeigt werden konnte. Allerdings ist die Bluthirnschranke bei CIDP-PatientInnen häufig gestört und es wurden bereits bei drei PatientInnen (para-)nodale Autoantikörper im Liquor bei gestörter Bluthirnschranke bzw. bei sehr hohem Autoantikörpertiter nachgewiesen (Appeltshauser et al., 2020; Shimizu et al., 2014; Stengel et al., 2019).

In mehreren Fallberichten von PatientInnen mit Neurofascin-155-IgG-Autoantikörpern trat unter Rituximabtherapie parallel zum Autoantikörperrückgang eine Verbesserung des Tremors auf (Demichelis et al., 2018; Painous et al., 2018), was ebenfalls für eine schädigende Wirkung der Autoantikörper auf cerebelläres Neurofascin spricht.

Ob der Tremor der in dieser Promotion beschriebenen Patienten tatsächlich von einer Kleinhirnschädigung durch Neurofascin-Autoantikörper hervorgerufen wurde, können nur weitere Studien zur pathogenetischen Wirkung auf das Kleinhirn zeigen, wobei unbedingt auch die Neurofascin-IgM-Autoantikörper berücksichtigt werden sollten.

5.4 Pathophysiologische Wirkung von Contactin-1-IgG4- bzw. -IgG3-Patientenantikörpern im Zellkulturmodell

Im zweiten Teilprojekt dieser Promotion wurde die pathophysiologische Wirkung von Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern auf cerebelläre Neurone sowie Spinalganglienneurone im Zellkulturmodell untersucht, wobei sich sowohl eine Bindung an den Neuronen als auch eine vom Einwirkungszeitraum abhängige sowie reversible Reduktion der Contactin-1-Expression zeigte. Teilaspekte der Diskussion zu den Zellkulturversuchen finden sich auch in dem von Julia Grüner verfassten Manuskript „Anti-contactin-1 antibodies affect surface expression and sodium currents in dorsal root ganglia“, das sich zum Zeitpunkt des Verfassens der Monographie im Reviewverfahren befand.

Bei den paranodalen Contactin-1-IgG-Autoantikörpern konnten Studien bereits Hinweise auf die Pathogenität der Patientenantikörper liefern. Allerdings fokussierten sich die meisten Arbeiten auf die Wirkung am Ranvierschen Schnürring peripherer Nerven. In Passiv-Transfer-Experimenten konnten eine Leitungsverlangsamung bzw.

Leitungsblöcke motorischer Nerven nachgewiesen werden (Doppler et al., 2019; Manso et al., 2016), wobei sich die Pathogenität von IgG4 stärker als von IgG1 (Manso et al., 2016) und die von IgG3 stärker als von IgG4 (Doppler et al., 2019) zeigte. Diese Ergebnisse sprechen stark für eine Schädigung des Contactin-Proteins, denn auch in Mäusen mit Contactin-1 Knockout war eine Leitungsverlangsamung nachweisbar (Boyle et al., 2001). Weiterhin war in Passiv-Transfer-Experimenten bei längerer Exposition mit Contactin-IgG-Patientenantikörpern der Contactin-1-/CASPR-1/Neurofascin-155-Protein Komplex vermindert nachweisbar (Manso et al., 2016), was die Leitungsverlangsamung durch eine Schädigung der Struktur des Ranvierschen Schnürringes erklärt.

Die Expression von Contactin-1 ist aber nicht auf den Ranvierschen Schnürring peripherer Nerven beschränkt, denn es wird in zahlreichen Neuronen nachgewiesen und ist dort in wichtige Prozesse wie das Auswachsen von Neuriten und auch die Proliferationsregulation involviert (Berglund et al., 1999; Buttiglione et al., 1996; Treubert & Brümmendorf, 1998; Xenaki et al., 2011). Auch in Contactin-1-Knockout-Experimenten bleibt die Wirkung nicht auf die peripheren Nerven beschränkt. So entwickelten Mäuse ohne Contactin-1 eine schwere Ataxie mit häufigen Stürzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Tiere als Korrelat hierzu ein Kleinhirn mit vermindertem Volumen entwickelten, die Axone der Körnerzellen nicht korrekt ausgerichtet waren und auch keine Faszikelbildung durch die Neuriten stattfand (Berglund et al., 1999), was die essentielle Bedeutung von Contactin-1 für die Neurone des Kleinhirns zeigt. Ein Experiment zur in vivo Wirkung von Contactin-Antikörpern führte in Wildtyp-Mäusen ebenfalls wie beim Knockout von Contactin-1 zum Ausbleiben einer Faszikelbildung, wobei diese Daten leider nur erwähnt aber nicht gezeigt wurden (Berglund et al., 1999).

Um die in vivo Wirkung von Contactin-1-IgG-Antikörpern aus Patientenserum auf Neurone zu zeigen, wurde in diesem Promotionsprojekt ein Zellkulturmodell eingesetzt, wobei bewusst Spinalganglienneurone und cerebelläre Körnerzellen ausgewählt wurden.

5.4.1 Spinalganglien und Cerebellum als mögliche Angriffspunkte paranodaler Autoantikörper und Bindung als experimentelles Korrelat

Spinalganglienneurone sind ein sehr wahrscheinlicher Angriffspunkt der Contactin-IgG-Autoantikörper, da bei PatientInnen mit Contactin-1-Autoantikörpern eine sensible Ataxie, die durch eine Schädigung der Spinalganglien erklärt werden könnte, als charakteristisches klinisches Merkmal auftritt (Cortese et al., 2020; Delmont et al., 2020; Miura et al., 2015). Es konnte bereits eine Expression von Contactin-1 an großen Spinalganglienneuronen nachgewiesen werden und außerdem zeigten Seren mit Contactin-1-IgG4-Patientenantikörpern eine Bindung an Schnitten von Spinalganglienneuronen, wobei Contactin-1 und die Bindung durch das Serum im Bereich des Zellkörpers und an den Paranodien kolokalisierten (Miura et al., 2015). Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Promotion sowohl für CNTN-Patient 1 mit überwiegend IgG3- als auch für CNTN-Patientin 2 mit überwiegend IgG4-Autoantikörpern eine Bindung an fixierten murinen Spinalganglienneuronen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung nicht auf PatientInnen mit überwiegend Contactin-1-IgG4-Autoantikörpern beschränkt bleibt. Im Gegensatz zu Miura wurden allerdings keine Unterschiede zwischen unterschiedlich großen Spinalganglienneuronen festgestellt, wobei die Größe der Spinalganglienneurone nicht ausgemessen wurde. Insgesamt stellt die Bindung an Spinalganglienneurone ein Korrelat für eine wahrscheinliche Beteiligung der Spinalganglienneurone bei (Para-)nodopathien dar.

Als zweite Neuronenart wurden cerebelläre Neurone ausgewählt. Besonders bei Neurofascin-(Para-)nodopathien wird auf Grund des assoziierten Tremors eine cerebelläre Beteiligung vermutet. Allerdings wurden auch bei Contactin-1-IgG-Autoantikörpern einige PatientInnen mit einem Tremor beschrieben (Cortese et al., 2020; Doppler et al., 2015b; Miura et al., 2015). Bei CNTN-Patientin 2 wurde im Rahmen der Promotion von Dr. Luise Appeltshauer eine umfassende Tremoranalyse durchgeführt, die den Verdacht auf einen cerebellären Tremor erbrachte (Appeltshauer, 2018; Doppler et al., 2015b). Unter Rituximabtherapie verbesserte sich der Tremor von CNTN-Patientin 2 unter parallelem Rückgang des Contactin-1-IgG-Autoantikörpertiters und verschwand

schließlich sogar, was eine Affektion des Cerebellums durch die Contactin-1-IgG-Autoantikörper sehr wahrscheinlich macht. Die Beteiligung des Kleinhirns bei der Contactin-1-(Para-)nodopathie ist auch insofern wahrscheinlich, da Contactin-1 im Kleinhirn und insbesondere auf den Körnerzellen exprimiert wird (Berglund et al., 1999; Buttiglione et al., 1996; Faivre-Sarrailh et al., 1992; Gennarini, 1989). In dieser Promotion wurden für die Zellkultur cerebelläre Neurone aus fünf Tage alten Mäusen verwendet, wobei diese zum größten Teil Körnerzellen entsprachen, da ein Protokoll speziell zur Gewinnung von Körnerzellen verwendet wurde (Lee et al., 2009) und bei Ratten desselben Alters der größte Anteil der cerebellären Zellen Körnerzellen sind (Altman, 1972). An Kleinhirnschnitten von Ratten konnte bereits eine Bindung von Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern im Bereich der Körnerzell- sowie der Molekularschicht nachgewiesen werden (Doppler et al., 2015b). Sowohl bei CNTN-Patient 1 als auch bei CNTN-Patientin 2 konnte eine deutliche Bindung des Serums an cerebelläre Körnerzellen nachgewiesen werden, was für eine mögliche Affektion des Kleinhirns durch Contactin-1-IgG-Autoantikörper spricht.

Dass die Bindung sowohl an Spinalganglienneuronen als auch an cerebellären Neuronen nachgewiesen werden konnte, liefert auch einen Hinweis darauf, dass Contactin-1-IgG-Autoantikörper nicht nur auf das periphere, sondern auch auf das zentrale Nervensystem wirken können. Dieser Aspekt ist auch deshalb interessant, da insbesondere im asiatischen Raum bei den Neurofascin-(Para-)nodopathien eine Assoziation mit kombiniert demyelinisierenden Erkrankungen des peripheren sowie des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden konnte (Devaux et al., 2016; Kawamura et al., 2013; Ogata et al., 2016), wobei dieser Zusammenhang an europäischen PatientInnen nicht bestätigt werden konnte (Cortese et al., 2016; Vural et al., 2018; Vural et al., 2016).

Da die Wirkung von Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern im Rahmen des Promotionsprojektes allerdings im Zellkulturmodell untersucht wurde, stellt sich die Frage, ob die Contactin-1-IgG-Autoantikörper im PatientInnen überhaupt die Bluthirn- bzw. Blutspinalganglienschranke überwinden können, um Spinalganglienneurone bzw. cerebelläre Neurone zu erreichen. Auch wenn bisher keine intrathekale Synthese von (para-)nodalen Autoantikörpern nachgewiesen wurde, konnten im Liquor von drei PatientInnen bei gestörter Bluthirnschranke bzw. bei sehr hohem Autoantikörpertiter

(para-)nodale Pan-Neurofascin-, Contactin-1 bzw. CASPR-1-IgG-Autoantikörper detektiert werden (Appelthausen et al., 2020; Stengel et al., 2019). Bei einer CIDP liegt häufig eine gestörte Bluthirnschranke und auch Blutnervschranke vor, denn sowohl in Suralisbiopsien von CIDP-PatientInnen als auch bei der Inkubation von Endothelzellen der Bluthirnschranke mit Seren von CIDP-PatientInnen konnte eine verminderte Expression von verschiedenen Tight-Junction Proteinen nachgewiesen werden und außerdem wurde in Liquoranalysen bei mehr als der Hälfte der GBS bzw. CIDP-PatientInnen eine Störung der Bluthirnschranke festgestellt (Brettschneider et al., 2005; Kanda, 2004; Shimizu et al., 2014). Über eine gestörte Bluthirnschranke könnten (para-)nodale Autoantikörper aus dem Serum auch Neurone des zentralen Nervensystems wie Körnerzellen des Kleinhirns angreifen. Die Spinalganglien sind sogar noch leichter zugänglich, da die Blutspinalganglienschranke auf Grund einer hohen Anzahl von Kapillaren durchlässiger ist (Jacobs et al., 1976; Kanda, 2013; Reinhold & Rittner, 2020), womit auch Spinalganglienneurone durch Autoantikörper aus dem Serum angegriffen werden könnten. Somit lassen die Ergebnisse aus dem Zellkulturmodell also durchaus auch Rückschlüsse auf die mögliche Affektion von Spinalganglienneuronen bzw. cerebellären Neuronen bei PatientInnen mit Contactin-1-IgG-Autoantikörpern zu.

5.4.2 Veränderte Contactin-1-Proteinexpression nach Inkubation mit Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern

Die Bindung von Contactin-1-IgG-Antikörpern aus den Seren von CIDP-PatientInnen an Spinalganglienneurone sowie cerebelläre Körnerzellen zeigt, dass diese mit den Neuronen interagieren. An dieses Versuchsergebnis anknüpfend drängt sich die Frage auf, ob die Contactin-1-IgG-Patientenantikörper auch die Expression paranodaler Proteine in den Neuronen verändern. Tatsächlich war nach Inkubation der Neurone mit den Contactin-1-IgG-Patientenantikörper enthaltenden Seren im Vergleich zu Kontrollseren sowohl in immunhistochemischen Färbungen als auch im Western Blot eine verminderte Expression von Contactin-1 bei unveränderter Expression von Neurofascin nachweisbar. Auch Labasque führte Inkubationsversuche mit Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern überwiegend der Subklasse IgG4 an myelinisierten Spinalganglien-/Schwannzell-Kokulturen durch und zeigte nach 36-stündiger Inkubation einen verminderten immunhistochemischen Nachweis von CASPR-1, wobei die

Expression von Contactin-1 nach Inkubation leider nicht untersucht wurde (Labasque et al., 2014). Dennoch sind die Ergebnisse der verminderten Contactin-1 Expression aus dieser Promotion gut mit denen von Labasque zu vereinbaren, da Contactin-1 und CASPR-1 im Komplex vorkommen (Peles, 1997; Rios et al., 2000). Außerdem kann CASPR-1 auch nur durch Contactin-1 effektiv zur Zelloberfläche transportiert werden (Boyle et al., 2001; Faivre-Sarrailh et al., 2000), sodass bei verminderter Expression von Contactin-1 auch die Oberflächenexpression von CASPR-1 vermindert wäre.

Im Gegensatz zu Labasque wurden die Inkubationsversuche im Rahmen dieser Promotion für unterschiedliche Zeiträume durchgeführt, wodurch ein über die Zeit zunehmender Effekt beobachtet werden konnte. Die über längere Zeiträume durchgeführten Zellkulturversuche können die Vorgänge im menschlichen Körper besser nachbilden, da auch in PatientInnen die Neurone einer chronischen Exposition der Contactin-1-IgG-Autoantikörper ausgesetzt sind.

Im Western Blot zeigte sich außerdem, dass die verminderte Expression von Contactin-1-Protein nach Inkubation mit dem Serum von CNTN-Patient 1 ausgeprägter war als mit dem von CNTN-Patientin 2. Dies ist gut nachvollziehbar, da bei CNTN-Patient 1 überwiegend die Subklasse IgG3 vorlag, während bei CNTN-Patientin 2 die Subklasse IgG4 dominierte und auch in Passiv-Transfer-Experimenten hatte sich durch Contactin-1-IgG3-Patientenantikörper eine ausgeprägtere Pathogenität als durch Contactin-1-IgG4-Patientenantikörper gezeigt (Doppler et al., 2019).

Sowohl in immunhistochemischen Färbungen als auch im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Contactin-1-Expression nach Inkubation mit Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern nicht dauerhaft vermindert ist. Werden die Zellen nach der Inkubation mit dem Antikörper enthaltenden Serum anschließend mit Serum von gesunden Kontrollpersonen inkubiert, so steigt die Expression von Contactin-1 wieder deutlich an, was eine Reversibilität der verminderten Proteinexpression anzeigt. Dieser reversible Effekt ist gut mit den bisherigen Erkenntnissen bei (Para-)nodopathien zu vereinbaren. Bei einer Rituximabtherapie, die die Autoantikörperproduktion unterbindet, zeigten sich bei vielen PatientInnen, unter anderem bei CNTN-Patientin 2 (Appeltshauer, 2018; Doppler et al., 2015b), die Symptome zumindest teilweise rasch reversibel (Burnor et al., 2018; Doppler et al., 2016; Querol et al., 2015; Vural et al.,

2018). Auch in Passiv-Transfer-Versuchen zeigte sich ein Reversibilitätseffekt, denn durch zweimalige Contactin-1-IgG-Patientenantikörper-Injektionen hervorgerufene Leitungsblöcke, waren nach einer einwöchigen Pause ohne Injektionen nicht mehr nachweisbar (Doppler et al., 2019). Die reversibel verminderte Contactin-1-Expression der Zellkulturexperimente sind insgesamt gut mit dem Konzept der (Para-)nodopathie zu vereinbaren, wobei sich rasch reversible elektrophysiologische Veränderungen zeigen, die auf eine vorübergehende Leitungsstörung am Ranvierschen Schnürring zurückgeführt werden (Uncini & Kuwabara, 2015; Uncini & Vallat, 2018).

Das hier untersuchte Zellkulturmodell spricht dafür, dass diese reversiblen klinischen sowie elektrophysiologischen Veränderungen bei der Contactin-IgG-(Para-)nodopathie durch eine Patientenantikörper-bedingte verminderte Contactin-1-Expression in Neuronen teilweise erklärt werden könnten.

5.4.3 Fraglicher zytotoxischer Effekt durch Contactin-1-IgG4-Patientenantikörper

Für das Serum von CNTN-Patientin 2 mit überwiegend IgG4 konnte in den LDH-Assays ein leichter zytotoxischer Effekt gezeigt werden. Die zytotoxische Wirkung war im Vergleich zu CNTN-Patient 1 sowie im Vergleich zu Kontrollserum zwar statistisch signifikant, allerdings ließ sich in den immunhistochemischen Färbungen mit dem neuronalen Marker Beta-III-Tubulin kein Unterschied zwischen den Färbungen der CNTN-PatientInnen 1 und 2 beziehungsweise den Kontrollseren feststellen, was den zytotoxischen Effekt wieder relativiert. Außerdem zeigte sich eine Regenerationstendenz der Contactin-1-Proteinexpression, sodass hier zumindest ein bestimmter Anteil an vitalen Neuronen vorhanden gewesen sein muss, womit eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung durch Contactin-1-IgG4-Patientenantikörper in Frage gestellt werden sollte.

Insgesamt wurde der LDH Assay als sehr sensitive Methode zur Detektion von Zytotoxizität bewertet (Broussas et al., 2013). Allerdings wurde für IgG4-Antikörper bislang keine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität beschrieben (Davies & Sutton, 2015) und für die im Rahmen dieser Promotion durchgeführten LDH-Assays kann eine durch Zellen des Immunsystems vermittelte Zytotoxizität ausgeschlossen werden, da Serum und kein Vollblut eingesetzt wurde. Auch eine komplementvermittelte

Zytotoxizität ist unwahrscheinlich, da IgG4, die überwiegend im Serum von CNTN-Patientin 2 vorhandene Subklasse, das Komplementsystem nur in geringem Maße aktiviert (Bindon et al., 1988; Schumaker et al., 1976; Tao et al., 1993; Vidarsson et al., 2014). Das Serum von CNTN-Patient 1 mit überwiegend IgG3, die das Komplementsystem aktivieren würden (Bindon et al., 1988; Schumaker et al., 1976; Tao et al., 1993; Vidarsson et al., 2014), zeigte allerdings keine Zytotoxizität, sodass eine komplementvermittelte Zytotoxizität auch durch neben IgG4 vorhandenes IgG3 im Serum von CNTN-Patientin 2 nahezu ausgeschlossen werden kann. Da Patientenserum und keine aufgereinigten Contactin-1-IgG-Patientenantikörper verwendet wurden, könnte die im LDH-Assay nachgewiesene zytotoxische Wirkung auch auf weitere im Serum vorhandene neurotoxische Bestandteile wie beispielsweise Zytokine zurückzuführen sein, da Zytokine aus der Familie der Interferone oder der Tumornekrosefaktoren eine Apoptose von Zellen induzieren können (Clemens, 2003).

Um zu klären, ob von Contactin-1-IgG4-Patientenantikörpern tatsächlich eine zytotoxische Wirkung auf Neurone ausgeübt wird, könnten in weiteren Versuchen aufgereinigte Contactin-1-IgG-Patientenantikörper verwendet werden, um unspezifische zytotoxische Effekte durch weitere Serumbestandteile ausschließen zu können. Um daran anschließend zu untersuchen, ob die zytotoxische Wirkung subklassenspezifisch ist, könnten für die LDH-Assays aufgereinigte subklassenspezifische Contactin-1-IgG4-Patientenantikörper im Vergleich zu Contactin-1-IgG3-Patientenantikörpern eingesetzt werden.

5.4.4 Internalisierung von Contactin-1 als möglicher pathophysiologischer Mechanismus

Es stellt sich die Frage, mit welchem Pathomechanismus die Ergebnisse der Zellkulturversuche zu vereinbaren sind. Die vom Einwirkungszeitraum der Contactin-1-IgG-Antikörper abhängige Verminderung des Contactin-1-Proteins, die sich in Abwesenheit der Patientenantikörper reversibel zeigt, lässt an eine Internalisierung von Contactin-1 durch die Antikörperwirkung denken, wobei die Pathogenität durch Serum mit überwiegend IgG3-Patientenantikörpern ausgeprägter war als durch Serum mit überwiegend IgG4-Patientenantikörpern.

Um die Hypothese der Internalisierung durch Serum mit überwiegend IgG3-Patientenantikörpern weiter zu verifizieren, führte Prof. Dr. Carmen Villmann im Institut für Klinische Neurobiologie die Inkubationsversuche mit Seren von den CNTN-PatientInnen 1 und 2 auch an mit Contactin-1 transfizierten HEK-293 Zellen durch (Grüner et al., eingereicht): Die zeitabhängige reversible Reduktion von Contactin-1 durch Contactin-1-IgG-Patientenantikörper ließ sich hierbei für Serum des CNTN-Patienten 1 mit überwiegend IgG-3-Antikörpern an HEK-293-Zellen reproduzieren, wobei sich für Serum der CNTN-Patientin 2 mit überwiegend IgG4-Antikörpern in den HEK-293-Zellen kein relevanter Unterschied im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle zeigte (Grüner et al., eingereicht). Da in transfizierten HEK-293-Zellen im Gegensatz zu Neuronen eine sehr rasche und kontinuierliche Neuexpression von transfiziertem Protein erfolgt, könnte dies die weniger stark ausgeprägten Effekte von Serum mit überwiegend IgG4 überdecken, die in den Zellkulturexperimenten mit Neuronen sichtbar waren. Um zu untersuchen, ob die verminderte Expression von Contactin-1 Protein die gesamte Zelle betrifft oder auf die Zelloberfläche beschränkt ist, führte Prof. Dr. Carmen Villmann Western Blots nach Biotinylierung der Membranproteine durch (Atak et al., 2015). Hier zeigte sich nach Inkubation mit CNTN-Patient-1-Serum eine signifikante Verminderung der Oberflächenproteinexpression von Contactin-1 bei unveränderter Gesamtzellproteinexpression desselben Proteins (Grüner et al., eingereicht). Dies spricht stark dafür, dass Contactin-1-IgG-Patientenantikörper über eine Endozytose zu einer Internalisierung von Contactin-1-Oberflächenprotein führen, die vor allem über die Subklasse IgG3 vermittelt wird. Eine Internalisierung von Proteinen wurde schon bei einigen autoimmunen neurologischen Erkrankungen unter anderem bei verschiedenen Enzephalitiden als pathogener Mechanismus identifiziert (Hara et al., 2017; Hughes et al., 2010; Lai et al., 2009; Petit-Pedrol et al., 2014; Piegras et al., 2015).

Für (Para-)nodopathien, bei denen häufig die Subklasse IgG4 dominiert, wurde bisher allerdings ein blockierender Effekt durch IgG4 als pathogener Mechanismus angenommen. Sowohl für Contactin-1-IgG4 als auch für CASPR-1-IgG4-Patientenantikörper konnte in Zellaggregationsassays an transfizierten Zellen gezeigt werden, dass die IgG4-Antikörper die Interaktion des Contactin-1-/CASPR-1-Komplexes mit Neurofascin-155 vermindern (Cortese et al., 2020; Labasque et al., 2014). Diese Ergebnisse wurden dadurch erklärt, dass die IgG4-Patientenantikörper die Protein-

Protein-Interaktion blockieren. Interessanterweise konnte für Neurofascin-155-IgG4-Patientenantikörper allerdings keine verminderte Zellinteraktion beobachtet werden (Manso et al., 2019), sodass wohl nicht alle paranodalen Autoantikörper über denselben Wirkmechanismus verfügen. Labasque erwähnte in seiner Studie explizit, dass eine Internalisierung von Proteinen zwar denkbar wäre, aber eine Internalisierung nicht beobachtet wurde (Labasque et al., 2014).

Grundsätzlich gelten IgG4-Autoantikörper als wenig pathogen, wobei sie teilweise sogar als „antiinflammatorisch“ oder als „innocent bystanders“ betitelt werden und bei Allergien ist die Bildung von IgG4 sogar mit einer Toleranzentwicklung assoziiert (Aalberse et al., 2009; Konecny, 2018; Lighaam & Rispen, 2016). IgG4 kann auf Grund seiner Struktur einige Pathomechanismen, die vom Fc-Rezeptor abhängig sind, nicht bewirken, beispielsweise aktiviert IgG4 das Komplementsystem nicht und kann keine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität vermitteln (Konecny, 2020). Auch eine Internalisierung ist über IgG4 nicht möglich, da das dafür benötigte Crosslinking einer bivalenten Bindung bedarf, welche durch das monovalente IgG4 nicht möglich ist (Aalberse et al., 2009; Konecny, 2018, 2020; Van der Neut Kolfshoten et al., 2007). Die meisten Erkrankungen, bei denen IgG4 pathogen wirken, werden deshalb über einen blockierenden Effekt vermittelt (Konecny, 2018).

Es drängt sich die Frage auf, ob auch die Ergebnisse der Zellkulturexperimente dieses Promotionsprojektes gerade bei CNTN-Patientin 2 mit überwiegend IgG4-Antikörpern durch einen blockierenden Effekt erklärbar wären. In den immunhistochemischen Färbungen ist durchaus denkbar, dass die Patientenantikörper die Bindung des Primärantikörpers blockieren und so eine verminderte Contactin-1-Expression nur vorgetäuscht wäre. Die Ergebnisse der Western Blots sind allerdings nicht rein durch einen blockierenden Effekt zu erklären, da davon auszugehen ist, dass eine eventuelle Antigen-Antikörper Interaktion durch die Inkubation in SDS Puffer bei 95 °C aufgelöst werden würde. Außerdem befanden sich die Banden der nachgewiesenen Proteine auf der zu erwartenden Höhe, während bei Nachweis eines Protein-Patientenantikörperkomplexes eine Bande mit deutlich höherem Molekulargewicht entstanden wäre. Weiterhin würde bei einer Blockierung der Effekt direkt einsetzen und

es wäre schwierig zu erklären, weshalb die Verminderung des nachweisbaren Contactin-1 vom Zeitraum der Einwirkung von Patientenantikörpern abhängig ist.

Wenn durch IgG4 also keine Internalisierung von Proteinen ausgelöst werden kann, stellt sich die Frage, wie dies damit zu vereinbaren ist, dass die Ergebnisse der Zellkulturexperimente auf eine durch die Patientenantikörper vermittelte Internalisierung hinweisen. Es wurden keine subklassenspezifischen Patientenantikörper verwendet, sodass neben den jeweils dominierenden Subklassen auch anderen Subklassen vertreten waren durch die eine Internalisierung ausgelöst werden könnte. So lagen bei CNTN-Patientin 2 neben der dominierenden Subklasse IgG4, auch die Subklassen IgG3 sowie IgG2 vor (Doppler et al., 2015b). Es wäre also denkbar, dass die Subklassen IgG3 und IgG2 im Serum von CNTN-Patientin 2 zu einer Internalisierung geführt haben, die aber weniger stark ausgeprägt war, da diese Subklassen im Vergleich zu CNTN-Patient 1 auch nur in geringerem Ausmaß vorhanden waren. Auch bei anderen Erkrankungen, bei denen IgG4-Patientenantikörper nachgewiesen wurden, konnte eine Internalisierung beobachtet werden, die durch zusätzlich vorhandene Subklassen IgG1-IgG3 hervorgerufen wurde. Bei der Dipeptidyl-Peptidase-like Protein 6 (DPPX) -Enzephalitis wurde nach Inkubation mit DPPX-IgG-Patientenantikörpern eine reversibel verringerte Membranexpression von DPPX nachgewiesen (Hara et al., 2017; Piepgras et al., 2015), weshalb von einer Antikörper vermittelten Internalisierung auszugehen ist. Die Subklassen der DPPX-Patientenantikörper waren IgG1 und IgG4, wobei die Internalisierung am ehesten über IgG1 vermittelt wurde (Koneczny, 2020). Bei der Myasthenia gravis konnte bei Versuchen unter Einsatz von Gesamt IgG gegen MuSK eine Internalisierung beobachtet werden (Cole et al., 2010), während es unter Einsatz von aufgereinigten MuSK-IgG4-Patientenantikörpern zu keiner Internalisierung kam (Huijbers et al., 2013), was ebenfalls zu der Hypothese führte, dass die Internalisierung durch IgG1-IgG3 hervorgerufen wurde.

Letztendlich weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass es durch CNTN-IgG-Patientenantikörper zu einer reversiblen Internalisierung von Contactin-Protein in Neuronen kommt. Eine subklassenspezifische Durchführung der Zellkulturexperimente mit aufgereinigten Subklassen-Patientenantikörpern könnte bestätigen, dass dieser Effekt durch die Subklassen IgG1-IgG3 vermittelt wird. Der Pathomechanismus der reversiblen Internalisierung geht auch für PatientInnen mit der Hoffnung einher, dass die dadurch

hervorgerufenen Symptome rasch reversibel sind, solange keine strukturelle Schädigung der Neurone eingetreten ist.

Sollte sich die pathologische Wirkung von paranodalen Patientenantikörpern auf Neurone in weiterführenden Studien bestätigen, könnte dies zu einer Aufweitung des Begriffes der (Para-)nodopathie führen, der nicht nur auf den Ranvierschen Schnürring begrenzt wäre.

5.4.5 Ideen für weitere Inkubationsversuche im Zellkulturmodell

Bisher wurden die pathophysiologischen Mechanismen paranodaler Patientenantikörper an Neuronen kaum untersucht, weshalb hier noch einige Gedanken aufgeführt werden, welche weiteren Aspekte in einem Zellkulturmodell berücksichtigt werden könnten.

Da unsere Ergebnisse zeigen, dass sich bei den Contactin-IgG-Patientenantikörpern die Ausprägung der Effekte je nach dominierender Subklasse unterscheiden, könnten sowohl Zytotoxizitätsassays als auch Inkubations- und Regenerationsversuche mit einer standardisierten Menge subklassenspezifischer, aufgereinigter IgG-Patientenantikörper durchgeführt werden, was auch Einflüsse unterschiedlich hoher Antikörpertiter sowie unspezifische Effekte durch weitere im Serum vorhandene Stoffe ausschließt, sodass dann Erkenntnisse über subklassenspezifische Effekte möglich wären. Um die durch uns vermutete Internalisierung unmittelbar zu zeigen, könnten inkubierte vitale Zellen mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie im Zeitraffer dargestellt werden. Hierfür könnte beispielsweise das Protokoll von Cole übertragen werden, der eine Internalisierung von MuSK an Myoblasten nachwies (Cole et al., 2010). Um die Einwirkung sowohl auf Zellkörper, Axone, Myelinscheide und insbesondere auch auf Ranviersche Schnürringe gleichzeitig untersuchen zu können, wäre es interessant Inkubationsexperimente mit paranodalen Patientenantikörpern an Kokulturen von Neuronen mit Schwannzellen bzw. Oligodendrozyten durchzuführen, die die Pathomechanismen im menschlichen Körper unter Einfluss des Zusammenspiels von Axon und Myelinscheide realitätsnäher abbilden könnten. Eventuell könnten hierfür sogar Zellen aus pluripotenten Stammzellen menschlicher Hautbiopsien gewonnen werden. Nur weitere Studien zu dem Einfluss paranodaler Patientenantikörper auf Neurone können zeigen, ob die Affektion der Neurone für die Symptome der PatientInnen mitverantwortlich ist, was zur Ausdehnung des Erkrankungsmodelles der (Para-)nodopathie führen würde.

6 Zusammenfassung und Relevanz der Ergebnisse

Die (Para-)nodopathie ist neben der primär axonalen und der primär demyelinisierenden Polyneuropathie eine neue Krankheitsentität, die sich durch eine Schädigung der Funktion des Ranvierschen Schnürringes auszeichnet. Die Forschung zu (para-)nodalen Autoantikörpern fokussierte sich bislang hauptsächlich auf Neurofascin-155- und Contactin-1-Autoantikörper der Subklasse IgG4.

In dieser Studie wurden die Seren von insgesamt 264 PatientInnen mit CIDP, GBS oder anderen Formen von Polyneuropathien mittels Bindungsassays an murinen Ischiadicuszupfnerven und gegebenenfalls ELISA auf das Vorhandensein (para-)nodaler Autoantikörper gescreent. ELISA Untersuchungen dienten im Falle des Nachweises von (para-)nodalen Autoantikörpern zur Titerbestimmung und bei IgG-Autoantikörpern zur Subklassenanalyse. Positive Autoantikörperbefunde wurden bei IgG-Autoantikörpern mittels Bindungsassays an transfizierten HEK-293-Zellen und bei IgM-Autoantikörpern mittels Western Blot bestätigt. Weiterhin wurde die zeitabhängige Wirkung von Contactin-1-Autoantikörpern im Zellkulturmodell an murinen Spinalganglienneuronen sowie murinen cerebellären Neuronen untersucht, wobei nach Inkubationen der Zellen mit Contactin-1-Autoantikörper enthaltenden Seren die Proteinexpression von Contactin-1 und Neurofascin sowohl mittels immunhistochemischen Färbungen als auch mittels Western Blot dargestellt wurde und außerdem Zytotoxizitätsassays durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse dieser Promotion zeigen, dass die (Para-)nodopathie nicht auf die bisher am häufigsten beschriebene Erkrankung mit IgG4-Autoantikörpern beschränkt werden sollte. Bei der folgenden dreigliedrigen Darstellung der Ergebnisse wird auf die drei Leitfragen zur Zielsetzung dieser Arbeit aus Kapitel 1.5 Bezug genommen.

1. Bei dem extrem schwer betroffenen IgG-Patient 1 konnte ein Pan-Neurofascin-IgG3-Autoantikörper nachgewiesen werden. Als charakteristische Symptome für diese Autoantikörper konnten in Übereinstimmung mit weiteren Fallberichten Tetraplegie, Beatmungspflichtigkeit sowie eine schwere Hirnnervenbeteiligung bis zur Locked-In-Symptomatik identifiziert werden. Als mögliche Ursachen für den schweren Verlauf kommen sowohl die Subklasse IgG3 mit ausgeprägter Komplementaktivierungskomponente, als auch das Vorhandensein von zwei

Epitopen unter anderem der 6Ig-Domäne, die allen Neurofascin-Isoformen gemeinsam ist, in Betracht. Die PatientInnen mit Pan-Neurofascin-IgG3-Autoantikörpern stellen einen weiteren Subtyp der (Para-)nodopathien dar und heben sich deutlich von den PatientInnen mit den bisher hauptsächlich beschriebenen Neurofascin-155-IgG4-Autoantikörpern ab, die wie IgG-Patient 2 charakteristischerweise in jungem Alter an einer CIDP mit Tremor ohne Besserung unter IVIG-Therapie leiden.

2. Es wurden fünf PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern identifiziert, die eine akut beginnende Erkrankung mit Tetraparese, Tremor und neuropathischen Schmerzen zeigten. Ob sich dieser Phänotyp als charakteristisch für eine Neurofascin-155-IgM-(Para-)nodopathie bestätigt, sollte in weiteren Studien untersucht werden.
3. Im murinen Zellkulturmodell an cerebellären Neuronen und Spinalganglienneuronen zeigte sich nach Inkubation mit Contactin-1-IgG-Patientenantikörpern eine zeitabhängige, rasch reversible Verminderung der Contactin-1-Protein-Expression in immunhistochemischen Färbungen sowie Western Blots, die durch eine Internalisierung des Contactin-1-Proteins erklärbar wäre. Der Angriff von Autoantikörpern an Spinalganglienneuronen und cerebellären Neurone sollte in weitere pathophysiologische Überlegungen miteinbezogen werden, da hierdurch typische Symptome der (Para-)nodopathie wie eine sensible Ataxie oder ein cerebellärer Tremor erklärt werden könnten.

7 Literaturverzeichnis

- Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J., & Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*, 39(4), 469-477.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2009.03207.x>
- Ahlskog, M. C., Kumar, N., Mauermann, M. L., & Klein, C. J. (2012). IgM-monoclonal gammopathy neuropathy and tremor: A first epidemiologic case control study. *Parkinsonism Relat Disord*, 18(6), 748-752.
<https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.03.007>
- Albers, J. W., Donofrio, P. D., & McGonagle, T. K. (1985). Sequential electrodiagnostic abnormalities in acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve*, 8(6), 528-539.
<https://doi.org/10.1002/mus.880080609>
- Altman, J. (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. III. Maturation of the components of the granular layer. *J Comp Neurol*, 145(4), 465-513. <https://doi.org/10.1002/cne.901450403>
- American-Academy-of-Neurology. (1991). Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). Report from an Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology*, 41(5), 617-618.
- Ang, C. W., Jacobs, B. C., & Laman, J. D. (2004). The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol*, 25(2), 61-66.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2003.12.004>
- Appeltshauser, L. (2018). *Detektion und Charakterisierung von Autoantikörpern gegen paranodale Proteine bei Patienten mit inflammatorischer Polyneuropathie* Universität Würzburg, Graduate Schools.
urn:nbn:de:bvb:20-opus-169457
- Appeltshauser, L., Brunder, A.-M., Heinius, A., Körtvélyessy, P., Wandinger, K.-P., Junker, R., Villmann, C., Sommer, C., Leypoldt, F., & Doppler, K. (2020). Antiparanodal antibodies and IgG subclasses in acute autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 7(5), e817.
<https://doi.org/10.1212/nxi.0000000000000817>

- Appeltshauser, L., Weishaupt, A., Sommer, C., & Doppler, K. (2017). Complement deposition induced by binding of anti-contactin-1 auto-antibodies is modified by immunoglobulins. *Exp Neurol*, 287(Pt 1), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.10.006>
- Asbury, A. K., Arnason, B. G., & Adams, R. D. (1969). The inflammatory lesion in idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis. *Medicine (Baltimore)*, 48(3), 173-215. <https://doi.org/10.1097/00005792-196905000-00001>
- Asbury, A. K., & Cornblath, D. R. (1990). Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, 27 Suppl, S21-24. <https://doi.org/10.1002/ana.410270707>
- Atak, S., Langhofer, G., Schaefer, N., Kessler, D., Meiselbach, H., Delto, C., Schindelin, H., & Villmann, C. (2015). Disturbances of Ligand Potency and Enhanced Degradation of the Human Glycine Receptor at Affected Positions G160 and T162 Originally Identified in Patients Suffering from Hyperekplexia. *Front Mol Neurosci*, 8, 79. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00079>
- Bailly, L., Mongin, M., Delorme, C., Apartis, E., Saheb, S., Viala, K., & Roze, E. (2018). Tremor Associated with Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy and Anti-Neurofascin-155 Antibodies. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*, 8, 606. <https://doi.org/10.7916/d81560zw>
- Bain, P. G., Britton, T. C., Jenkins, I. H., Thompson, P. D., Rothwell, J. C., Thomas, P. K., Brooks, D. J., & Marsden, C. D. (1996). Tremor associated with benign IgM paraproteinaemic neuropathy. *Brain*, 119(3), 789-799. <https://doi.org/10.1093/brain/119.3.789>
- Barnes, P. J. (2017). Glucocorticosteroids. *Handb Exp Pharmacol*, 237, 93-115. https://doi.org/10.1007/164_2016_62
- Berghs, S., Aggujaro, D., Dirx, R., Jr., Maksimova, E., Stabach, P., Hermel, J. M., Zhang, J. P., Philbrick, W., Slepnev, V., Ort, T., & Solimena, M. (2000). betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol*, 151(5), 985-1002. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.985>
- Berglund, E. O., Murai, K. K., Fredette, B., Sekerková, G., Marturano, B., Weber, L., Mugnaini, E., & Ranscht, B. (1999). Ataxia and Abnormal Cerebellar Microorganization in Mice with Ablated Contactin Gene Expression. *Neuron*, 24(3), 739-750. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)81126-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81126-5)

- Bhat, M. A., Rios, J. C., Lu, Y., Garcia-Fresco, G. P., Ching, W., Martin, M. S., Li, J., Einheber, S., Chesler, M., Rosenbluth, J., Salzer, J. L., & Bellen, H. J. (2001). Axon-Glia Interactions and the Domain Organization of Myelinated Axons Requires Neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron*, 30(2), 369-383. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00294-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00294-x)
- Bindon, C. I., Hale, G., Brüggemann, M., & Waldmann, H. (1988). Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med*, 168(1), 127-142. <https://doi.org/10.1084/jem.168.1.127>
- Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B. C., Marshak-Rothstein, A., & Chen, J. (2000). Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(3), 1184-1189. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1184>
- Boyle, M. E. T., Berglund, E. O., Murai, K. K., Weber, L., Peles, E., & Ranscht, B. (2001). Contactin Orchestrates Assembly of the Septate-like Junctions at the Paranode in Myelinated Peripheral Nerve. *Neuron*, 30(2), 385-397. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)00296-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00296-3)
- Brandes, R., Lang, F., & Schmidt, R. F. (2019). *Physiologie des Menschen* (32 ed.). Springer Lehrbuch. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-56468-4>
- Brettschneider, J., Claus, A., Kassubek, J., & Tumani, H. (2005). Isolated blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction: prevalence and associated diseases. *J Neurol*, 252(9), 1067-1073. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0817-9>
- Briani, C., Salvalaggio, A., Ruiz, M., Cacciavillani, M., Rinaldi, F., Callegari, I., Gasparotti, R., & Franciotta, D. (2019). Tongue tremor in neurofascin-155 IgG4 seropositive chronic inflammatory polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol*, 330, 178-180. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.01.017>
- Broussas, M., Broyer, L., & Goetsch, L. (2013). Evaluation of antibody-dependent cell cytotoxicity using lactate dehydrogenase (LDH) measurement. *Methods Mol Biol*, 988, 305-317. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-327-5_19
- Burnor, E., Yang, L., Zhou, H., Patterson, K. R., Quinn, C., Reilly, M. M., Rossor, A. M., Scherer, S. S., & Lancaster, E. (2018). Neurofascin antibodies in

autoimmune, genetic, and idiopathic neuropathies. *Neurology*, 90(1), e31-e38. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000004773>

Burt, R. K., Balabanov, R., Tavee, J., Han, X., Sufit, R., Ajroud-Driss, S., Jovanovic, B., Quigley, K., Arnautovic, I., Helenowski, I., & Sharrack, B. (2020). Hematopoietic stem cell transplantation for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol*, 267(11), 3378-3391. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10010-6>

Buttermore, E. D., Piochon, C., Wallace, M. L., Philpot, B. D., Hansel, C., & Bhat, M. A. (2012). Pinceau Organization in the Cerebellum Requires Distinct Functions of Neurofascin in Purkinje and Basket Neurons during Postnatal Development. *J Neurosci*, 32(14), 4724-4742. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5602-11.2012>

Buttiglione, M., Revest, J.-M., Rougon, G., & Faivre-Sarrailh, C. (1996). F3 Neuronal Adhesion Molecule Controls Outgrowth and Fasciculation of Cerebellar Granule Cell Neurites: A Cell-Type-Specific Effect Mediated by the Ig-like Domains. *Mol Cell Neurosci*, 8(1), 53-69. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0043>

Cao-Lormeau, V.-M., Blake, A., Mons, S., Lastère, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A.-L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S. K., Willison, H. J., Musset, L., Manuguerra, J.-C., Despres, P., Fournier, E., Mallet, H.-P., Musso, D., Fontanet, A., Neil, J., & Ghawché, F. (2016). Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*, 387(10027), 1531-1539. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)00562-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)00562-6)

Cats, E. A., Jacobs, B. C., Yuki, N., Tio-Gillen, A. P., Piepers, S., Franssen, H., Van Asseldonk, J. T., Van Den Berg, L. H., & Van Der Pol, W. L. (2010). Multifocal motor neuropathy: Association of anti-GM1 IgM antibodies with clinical features. *Neurology*, 75(22), 1961-1967. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e3181ff94c2>

Chevret, S., Hughes, R. A., & Annane, D. (2017). Plasma exchange for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001798.pub3>

Chiò, A., Cocito, D., Bottacchi, E., Buffa, C., Leone, M., Plano, F., Mutani, R., & Calvo, A. (2007). Idiopathic chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an

epidemiological study in Italy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 78(12), 1349-1353. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.114868>

Chiò, A., Cocito, D., Leone, M., Giordana, M. T., Mora, G., & Mutani, R. (2003). Guillain-Barré syndrome: a prospective, population-based incidence and outcome survey. *Neurology*, 60(7), 1146-1150. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000055091.96905.d0>

Clemens, M. J. (2003). Interferons and apoptosis. *J Interferon Cytokine Res*, 23(6), 277-292. <https://doi.org/10.1089/107999003766628124>

Cole, R. N., Ghazanfari, N., Ngo, S. T., Gervásio, O. L., Reddel, S. W., & Phillips, W. D. (2010). Patient autoantibodies deplete postsynaptic muscle-specific kinase leading to disassembly of the ACh receptor scaffold and myasthenia gravis in mice. *J Physiol*, 588(17), 3217-3229. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.190298>

Collins, A., & Jackson, K. (2013). A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function [Hypothesis and Theory]. *Front Immunol*, 4(235). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00235>

Cortese, A., Devaux, J. J., Zardini, E., Manso, C., Taieb, G., Carra Dallièrè, C., Merle, P., Osera, C., Romagnolo, S., Visigalli, N., Piscosquito, G., Salsano, E., Alfonsi, E., Moglia, A., Pareyson, D., Marchioni, E., & Franciotta, D. (2016). Neurofascin-155 as a putative antigen in combined central and peripheral demyelination. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 3(4), e238. <https://doi.org/10.1212/nxi.0000000000000238>

Cortese, A., Lombardi, R., Briani, C., Callegari, I., Benedetti, L., Manganeli, F., Luigetti, M., Ferrari, S., Clerici, A. M., Marfia, G. A., Rigamonti, A., Carpo, M., Fazio, R., Corbo, M., Mazzeo, A., Giannini, F., Cosentino, G., Zardini, E., Currò, R., Gastaldi, M., Vegezzi, E., Alfonsi, E., Berardinelli, A., Kouton, L., Manso, C., Giannotta, C., Doneddu, P., Dacci, P., Piccolo, L., Ruiz, M., Salvalaggio, A., De Michelis, C., Spina, E., Topa, A., Bisogni, G., Romano, A., Mariotto, S., Mataluni, G., Cerri, F., Stancanelli, C., Sabatelli, M., Schenone, A., Marchioni, E., Lauria, G., Nobile-Orazio, E., Devaux, J., & Franciotta, D. (2020). Antibodies to neurofascin, contactin-1, and contactin-associated protein 1 in CIDP. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 7(1), e639. <https://doi.org/10.1212/nxi.0000000000000639>

Cortese, I., Chaudhry, V., So, Y. T., Cantor, F., Cornblath, D. R., & Rae-Grant, A. (2011). Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic

disorders: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 76(3), 294-300. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e318207b1f6>

Coutinho, A. E., & Chapman, K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*, 335(1), 2-13. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>

Daha, N. A., Banda, N. K., Roos, A., Beurskens, F. J., Bakker, J. M., Daha, M. R., & Trouw, L. A. (2011). Complement activation by (auto-) antibodies. *Mol Immunol*, 48(14), 1656-1665. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.04.024>

Dalakas, M. C. (2002). Mechanisms of action of IVIg and therapeutic considerations in the treatment of acute and chronic demyelinating neuropathies. *Neurology*, 59(12 Suppl 6), S13-21. https://doi.org/10.1212/wnl.59.12_suppl_6.s13

Dalakas, M. C. (2015). Pathogenesis of immune-mediated neuropathies. *Biochim Biophys Acta*, 1852(4), 658-666. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.013>

Davidson, A. I., Halstead, S. K., Goodfellow, J. A., Chavada, G., Mallik, A., Overell, J., Lunn, M. P., McConnachie, A., Van Doorn, P., & Willison, H. J. (2016). Inhibition of Complement in Guillain-Barré Syndrome: The ICA-GBS Study. *J Peripher Nerv Syst*. <https://doi.org/10.1111/jns.12194>

Davies, A. M., & Sutton, B. J. (2015). Human IgG4: a structural perspective. *Immunol Rev*, 268(1), 139-159. <https://doi.org/10.1111/imr.12349>

Davis, J. Q., & Bennett, V. (1993). Ankyrin-binding activity of nervous system cell adhesion molecules expressed in adult brain. *J Cell Sci Suppl*, 17, 109-117. https://doi.org/10.1242/jcs.1993.supplement_17.16

Delmont, E., Brodovitch, A., Kouton, L., Allou, T., Beltran, S., Brisset, M., Camdessanché, J. P., Cauquil, C., Cirion, J., Dubard, T., Echaniz-Laguna, A., Grapperon, A. M., Jauffret, J., Juntas-Morales, R., Kremer, L. D., Kuntzer, T., Labeyrie, C., Lanfranco, L., Maisonobe, T., Mavroudakis, N., Mecharles-Darrigol, S., Nicolas, G., Noury, J. B., Perie, M., Rajabally, Y. A., Remiche, G., Rouaud, V., Tard, C., Salort-Campana, E., Verschueren, A., Viala, K., Wang, A., Attarian, S., & Boucraut, J. (2020). Antibodies against the node of Ranvier: a

real-life evaluation of incidence, clinical features and response to treatment based on a prospective analysis of 1500 sera. *J Neurol*, 267(12), 3664-3672. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10041-z>

- Delmont, E., & Hugh, W. (2015). Diagnostic Utility of Auto Antibodies in Inflammatory Nerve Disorders. *J Neuromuscul Dis*, 2(2), 107-112. <https://doi.org/10.3233/jnd-150078>
- Delmont, E., Manso, C., Querol, L., Cortese, A., Berardinelli, A., Lozza, A., Belghazi, M., Malissart, P., Labauge, P., Taieb, G., Yuki, N., Illa, I., Attarian, S., & Devaux, J. J. (2017). Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain*, 140(7), 1851-1858. <https://doi.org/10.1093/brain/awx124>
- Demichelis, C., Franciotta, D., Cortese, A., Callegari, I., Serrati, C., Mancardi, G. L., Schenone, A., Leonardi, A., & Benedetti, L. (2018). Remarkable Rituximab Response on Tremor Related to Acute-Onset Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy in an Antineurofascin155 Immunoglobulin G4-Seropositive Patient. *Mov Disord Clin Pract*. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12662>
- Derksen, A., Ritter, C., Athar, P., Kieseier, B. C., Mancias, P., Hartung, H.-P., Sheikh, K. A., & Lehmann, H. C. (2014). Sural sparing pattern discriminates Guillain-Barré syndrome from its mimics. *Muscle Nerve*, 50(5), 780-784. <https://doi.org/10.1002/mus.24226>
- Deuschl, G., & Bergman, H. (2002). Pathophysiology of nonparkinsonian tremors. *Mov Disord*, 17 Suppl 3, S41-48. <https://doi.org/10.1002/mds.10141>
- Devaux, J. J., Miura, Y., Fukami, Y., Inoue, T., Manso, C., Belghazi, M., Sekiguchi, K., Kokubun, N., Ichikawa, H., Wong, A. H. Y., & Yuki, N. (2016). Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*, 86(9), 800-807. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000002418>
- Devaux, J. J., Odaka, M., & Yuki, N. (2012). Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barré syndrome. *J Peripher Nerv Syst*, 17(1), 62-71. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2012.00372.x>
- Diaz-Manera, J., Martinez-Hernandez, E., Querol, L., Klooster, R., Rojas-Garcia, R., Suarez-Calvet, X., Munoz-Blanco, J. L., Mazia, C., Straasheijm, K. R., Gallardo, E., Juarez, C., Verschuuren, J. J., & Illa, I. (2012). Long-lasting treatment effect

- of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology*, 78(3), 189-193.
<https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e3182407982>
- Dineen, J., & Freeman, R. (2015). Autonomic Neuropathy. *Semin Neurol*, 35(4), 458-468. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1558983>
- Dionne, A., Nicolle, M. W., & Hahn, A. F. (2010). Clinical and electrophysiological parameters distinguishing acute-onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy from acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve*, 41(2), 202-207. <https://doi.org/10.1002/mus.21480>
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Kramer, H. H., Ng, J. K., Meinl, E., Villmann, C., Brophy, P., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., Weishaupt, A., & Sommer, C. (2015a). Contactin-1 and Neurofascin-155/-186 Are Not Targets of Auto-Antibodies in Multifocal Motor Neuropathy. *PLoS One*, 10(7), e0134274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134274>
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Villmann, C., Martin, C., Peles, E., Krämer, H. H., Haarmann, A., Buttman, M., & Sommer, C. (2016). Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain*, 139(10), 2617-2630. <https://doi.org/10.1093/brain/aww189>
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Wilhelmi, K., Villmann, C., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., Maurer, M., Weishaupt, A., & Sommer, C. (2015b). Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(7), 720-728. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-309916>
- Doppler, K., Schuster, Y., Appeltshauser, L., Biko, L., Villmann, C., Weishaupt, A., Werner, C., & Sommer, C. (2019). Anti-CNTN1 IgG3 induces acute conduction block and motor deficits in a passive transfer rat model. *J Neuroinflammation*, 16(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1462-z>
- Doppler, K., & Sommer, C. (2017). Neue Entität der Paranodopathien: eine Zielstruktur mit therapeutischen Konsequenzen. *Aktuelle Neurologie*, 44(03), 194-199. <https://doi.org/10.1055/s-0043-101227>
- Doppler, K., Stengel, H., Appeltshauser, L., Grosskreutz, J., Man Ng, J. K., Meinl, E., & Sommer, C. (2018). Neurofascin-155 IgM autoantibodies in patients with

- inflammatory neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 89(11), 1145-1151. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-318170>
- Dyck, P. J., Lais, A. C., Ohta, M., Bastron, J. A., Okazaki, H., & Groover, R. V. (1975). Chronic inflammatory polyradiculoneuropathy. *Mayo Clin Proc*, 50(11), 621-637.
- Dyck, P. J., O'Brien, P. C., Oviatt, K. F., Dinapoli, R. P., Daube, J. R., Bartleson, J. D., Mokri, B., Swift, T., Low, P. A., & Windebank, A. J. (1982). Prednisone improves chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy more than no treatment. *Ann Neurol*, 11(2), 136-141. <https://doi.org/10.1002/ana.410110205>
- Dyck, P. J. B., & Tracy, J. A. (2018). History, Diagnosis, and Management of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *Mayo Clin Proc*, 93(6), 777-793. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2018.03.026>
- Ehrenstein, M. R., Cook, H. T., & Neuberger, M. S. (2000). Deficiency in Serum Immunoglobulin (Ig)M Predisposes to Development of IgG Autoantibodies. *J Exp Med*, 191(7), 1253-1258. <https://doi.org/10.1084/jem.191.7.1253>
- Einheber, S., Zanazzi, G., Ching, W., Scherer, S., Milner, T. A., Peles, E., & Salzer, J. L. (1997). The Axonal Membrane Protein Caspr, a Homologue of Neurexin IV, Is a Component of the Septate-like Paranodal Junctions That Assemble during Myelination. *J Cell Biol*, 139(6), 1495-1506. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.6.1495>
- Erlanger, J., & Gasser, H. S. (1937). Electrical Signs Of Nervous Activity. *Am J Psychiatry*, 93(6), 1472-1473. <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/ajp.93.6.1472-a>
- Eshed, Y., Feinberg, K., Poliak, S., Sabanay, H., Sarig-Nadir, O., Spiegel, I., Bermingham, J. R., Jr., & Peles, E. (2005). Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron*, 47(2), 215-229. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.06.026>
- Espérou, H., Jars-Guinestre, M. C., Bolgert, F., Raphaël, J. C., & Durand-Zaleski, I. (2000). Cost analysis of plasma-exchange therapy for the treatment of Guillain-Barré syndrome. French Cooperative Group on Plasma Exchange in Guillain-Barré Syndrome. *Intensive Care Med*, 26(8), 1094-1100. <https://doi.org/10.1007/s001340051323>

- European-Medicines-Agency. (2020, 11.12.2020). *MabThera | European Medicines Agency*.
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mabthera>
(zuletzt aufgerufen am 12.01.2020)
- Faivre-Sarrailh, C., & Devaux, J. J. (2013). Neuro-glial interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. *Front Cell Neurosci*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00196>
- Faivre-Sarrailh, C., Gauthier, F., Denisenko-Nehrbass, N., Le Bivic, A., Rougon, G., & Girault, J.-A. (2000). The Glycosylphosphatidyl Inositol-Anchored Adhesion Molecule F3/Contactin Is Required for Surface Transport of Paranodin/Contactin-Associated Protein (Caspr). *J Cell Biol*, 149(2), 491-502. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.491>
- Faivre-Sarrailh, C., Gennarini, G., Goridis, C., & Rougon, G. (1992). F3/F11 cell surface molecule expression in the developing mouse cerebellum is polarized at synaptic sites and within granule cells. *J Neurosci*, 12(1), 257-267. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-01-00257.1992>
- Figueroa, J. J., Dyck, P. J. B., Laughlin, R. S., Mercado, J. A., Massie, R., Sandroni, P., Dyck, P. J., & Low, P. A. (2012). Autonomic dysfunction in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology*, 78(10), 702-708. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e3182494d66>
- Fisher, M. (1956). An unusual variant of acute idiopathic polyneuritis (syndrome of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia). *N Engl J Med*, 255(2), 57-65.
<https://doi.org/10.1056/nejm195607122550201>
- Fokke, C., Van Den Berg, B., Drenthen, J., Walgaard, C., Van Doorn, P. A., & Jacobs, B. C. (2014). Diagnosis of Guillain-Barre syndrome and validation of Brighton criteria. *Brain*, 137(1), 33-43. <https://doi.org/10.1093/brain/awt285>
- Forsberg, A., Press, R., & Holmqvist, L. W. (2012). Residual disability 10 years after falling ill in Guillain-Barré syndrome: A prospective follow-up study. *J Neurol Sci*, 317(1-2), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.02.026>
- Freeman, R. (2014). Diabetic autonomic neuropathy. *Handb Clin Neurol*, 126, 63-79. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53480-4.00006-0>

- Fujita, A., Ogata, H., Yamasaki, R., Matsushita, T., & Kira, J.-I. (2018). Parallel fluctuation of anti-neurofascin 155 antibody levels with clinico-electrophysiological findings in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neurol Sci*, *384*, 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.11.035>
- Garg, N., Park, S. B., Yiannikas, C., Vucic, S., Howells, J., Noto, Y. I., Mathey, E. K., Pollard, J. D., & Kiernan, M. C. (2018). Neurofascin-155 IGG4 Neuropathy: Pathophysiological Insights, Spectrum of Clinical Severity and Response To treatment. *Muscle Nerve*, *57*(5), 848-851. <https://doi.org/10.1002/mus.26010>
- GBS-Study-Group-Italy. (2000). Guillain-Barré syndrome: an Italian multicentre case-control study. Guillain-Barré Syndrome Study Group. *Neurol Sci*, *21*(4), 229-234. <https://doi.org/10.1007/s100720070081>
- Gennarini, G. (1989). The mouse neuronal cell surface protein F3: a phosphatidylinositol- anchored member of the immunoglobulin superfamily related to chicken contactin. *J Cell Biol*, *109*(2), 775-788. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.2.775>
- Goodfellow, J. A., & Willison, H. J. (2016). Guillain-Barré syndrome: a century of progress. *Nature Reviews Neurology*, *12*(12), 723-731. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.172>
- Gorson, K. C., Allam, G., & Ropper, A. H. (1997). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: Clinical features and response to treatment in 67 consecutive patients with and without a monoclonal gammopathy. *Neurology*, *48*(2), 321-328. <https://doi.org/10.1212/wnl.48.2.321>
- Griffin, J. W., Li, C. Y., Ho, T. W., Tian, M., Gao, C. Y., Xue, P., Mishu, B., Cornblath, D. R., Macko, C., McKhann, G. M., & Asbury, A. K. (1996). Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, *39*(1), 17-28. <https://doi.org/10.1002/ana.410390105>
- Griffin, J. W., Li, C. Y., Ho, T. W., Xue, P., Macko, C., Gao, C. Y., Yang, C., Tian, M., Mishu, B., Cornblath, D. R., McKhann, G. M., & Asbury, A. K. (1995). Guillain-Barré syndrome in northern China: The spectrum of neuropathological changes in clinically defined cases. *Brain*, *118*(3), 577-595. <https://doi.org/10.1093/brain/118.3.577>

- Grönwall, C., & Silverman, G. J. (2014). Natural IgM: Beneficial Autoantibodies for the Control of Inflammatory and Autoimmune Disease. *J Clin Immunol*, 34(S1), 12-21. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0025-4>
- Guillain, G. (1953). [Guillain-Barré syndrome]. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*, 54(2), 81-149. (Considérations sur le syndrome de Guillain et Barré.)
- Guillain, G., Barré, J. A., & Strohl, A. (1999). [Radiculoneuritis syndrome with hyperalbuminosis of cerebrospinal fluid without cellular reaction. Notes on clinical features and graphs of tendon reflexes. 1916]. *Ann Med Interne (Paris)*, 150(1), 24-32. (Sur un syndrome de radiculo-névrite avec hyperalbuminose du liquide céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Remarques sur les caractères cliniques et graphiques des réflexes tendineux.)
- Hadden, R. D. M., Cornblath, D. R., Hughes, R. A. C., Zielasek, J., Hartung, H. P., Toyka, K. V., & Swan, A. V. (1998). Electrophysiological classification of guillain-barré syndrome: Clinical associations and outcome. *Ann Neurol*, 44(5), 780-788. <https://doi.org/10.1002/ana.410440512>
- Hara, M., Ariño, H., Petit-Pedrol, M., Sabater, L., Titulaer, M. J., Martinez-Hernandez, E., Schreurs, M. W. J., Rosenfeld, M. R., Graus, F., & Dalmau, J. (2017). DPPX antibody-associated encephalitis. *Neurology*, 88(14), 1340-1348. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000003796>
- Harschnitz, O., Van Den Berg, L. H., Johansen, L. E., Jansen, M. D., Kling, S., Vieira De Sá, R., Vlam, L., Van Rheenen, W., Karst, H., Wierenga, C. J., Pasterkamp, R. J., & Van Der Pol, W. L. (2016). Autoantibody pathogenicity in a multifocal motor neuropathy induced pluripotent stem cell-derived model. *Ann Neurol*, 80(1), 71-88. <https://doi.org/10.1002/ana.24680>
- Hashimoto, Y., Ogata, H., Yamasaki, R., Sasaguri, T., Ko, S., Yamashita, K., Xu, Z., Matsushita, T., Tateishi, T., Akiyama, S. I., Maruyama, S., Yamamoto, A., & Kira, J.-I. (2018). Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy With Concurrent Membranous Nephropathy: An Anti-paranode and Podocyte Protein Antibody Study and Literature Survey. *Front Neurol*, 9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00997>
- Hassel, B., Rathjen, F. G., & Volkmer, H. (1997). Organization of the neurofascin gene and analysis of developmentally regulated alternative splicing. *J Biol Chem*, 272(45), 28742-28749. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28742>

- Hays, A. P., Latov, N., Takatsu, M., & Sherman, W. H. (1987). Experimental demyelination of nerve induced by serum of patients with neuropathy and an anti-MAG IgM M-protein. *Neurology*, *37*(2), 242-256. <https://doi.org/10.1212/wnl.37.2.242>
- Hmiel, L. K., Brorson, K. A., & Boyne, M. T. (2015). Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity. *Anal Bioanal Chem*, *407*(1), 79-94. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8108-x>
- Ho, T. W., Willison, H. J., Nachamkin, I., Li, C. Y., Veitch, J., Ung, H., Wang, G. R., Liu, R. C., Cornblath, D. R., Asbury, A. K., Griffin, J. W., & McKhann, G. M. (1999). Anti-GD1a antibody is associated with axonal but not demyelinating forms of Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, *45*(2), 168-173. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199902\)45:2<168::aid-ana6>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199902)45:2<168::aid-ana6>3.0.co;2-6)
- Hughes, E. G., Peng, X., Gleichman, A. J., Lai, M., Zhou, L., Tsou, R., Parsons, T. D., Lynch, D. R., Dalmau, J., & Balice-Gordon, R. J. (2010). Cellular and Synaptic Mechanisms of Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *J Neurosci*, *30*(17), 5866-5875. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0167-10.2010>
- Hughes, R. A., Bensa, S., Willison, H., Van Den Bergh, P., Comi, G., Illa, I., Nobile-Orazio, E., Van Doorn, P., Dalakas, M., Bojar, M., & Swan, A. (2001a). Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol*, *50*(2), 195-201. <https://doi.org/10.1002/ana.1088>
- Hughes, R. A., Brassington, R., Gunn, A. A., & Van Doorn, P. A. (2016). Corticosteroids for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001446.pub5>
- Hughes, R. A., & Cornblath, D. R. (2005). Guillain-Barré syndrome. *Lancet*, *366*(9497), 1653-1666. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(05\)67665-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(05)67665-9)
- Hughes, R. A., Raphaël, J. C., Swan, A. V., & van Doorn, P. A. (2001b). Intravenous immunoglobulin for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* (2), Cd002063. <https://doi.org/10.1002/14651858.Cd002063>
- Huijbers, M. G., Lipka, A. F., Plomp, J. J., Niks, E. H., van der Maarel, S. M., & Verschuuren, J. J. (2014). Pathogenic immune mechanisms at the

neuromuscular synapse: the role of specific antibody-binding epitopes in myasthenia gravis. *J Intern Med*, 275(1), 12-26.

<https://doi.org/10.1111/joim.12163>

Huijbers, M. G., Zhang, W., Klooster, R., Niks, E. H., Friese, M. B., Straasheijm, K. R., Thijssen, P. E., Vrolijk, H., Plomp, J. J., Vogels, P., Losen, M., Van Der Maarel, S. M., Burden, S. J., & Verschuuren, J. J. (2013). MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(51), 20783-20788.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1313944110>

Iijima, M., Koike, H., Hattori, N., Tamakoshi, A., Katsuno, M., Tanaka, F., Yamamoto, M., Arimura, K., & Sobue, G. (2008). Prevalence and incidence rates of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in the Japanese population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79(9), 1040-1043.

<https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.128132>

Illa, I., Ortiz, N., Gallard, E., Juarez, C., Grau, J. M., & Dalakas, M. C. (1995). Acute axonal Guillain-Barré syndrome with IgG antibodies against motor axons following parenteral gangliosides. *Ann Neurol*, 38(2), 218-224.

<https://doi.org/10.1002/ana.410380214>

Jacob, S., & Rajabally, Y. (2009). Current Proposed Mechanisms of Action of Intravenous Immunoglobulins in Inflammatory Neuropathies. *Curr Neuroparmacol*, 7(4), 337-342.

<https://doi.org/10.2174/157015909790031166>

Jacobs, B. C., Rothbarth, P. H., Van Der Meche, F. G. A., Herbrink, P., Schmitz, P. I. M., De Klerk, M. A., & Van Doorn, P. A. (1998). The spectrum of antecedent infections in Guillain-Barre syndrome: A case-control study. *Neurology*, 51(4), 1110-1115. <https://doi.org/10.1212/wnl.51.4.1110>

Jacobs, J. M., Macfarlane, R. M., & Cavanagh, J. B. (1976). Vascular leakage in the dorsal root ganglia of the rat, studied with horseradish peroxidase. *J Neurol Sci*, 29(1), 95-107. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(76\)90083-6](https://doi.org/10.1016/0022-510x(76)90083-6)

Joint-Task-Force-of-the-EFNS-and-the-PNS. (2010). Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--First Revision. *J Peripher Nerv Syst*, 15(1), 1-9.

<https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2010.00245.x>

- Kadoya, M., Kaida, K., Koike, H., Takazaki, H., Ogata, H., Moriguchi, K., Shimizu, J., Nagata, E., Takizawa, S., Chiba, A., Yamasaki, R., Kira, J. I., Sobue, G., & Ikewaki, K. (2016). IgG4 anti-neurofascin155 antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Clinical significance and diagnostic utility of a conventional assay. *J Neuroimmunol*, *301*, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.10.013>
- Kanda, T. (2004). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *75*(5), 765-769. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.025692>
- Kanda, T. (2013). Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *84*(2), 208-212. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302312>
- Katz, J. S., Saperstein, D. S., Gronseth, G., Amato, A. A., & Barohn, R. J. (2000). Distal acquired demyelinating symmetric neuropathy. *Neurology*, *54*(3), 615-615. <https://doi.org/10.1212/wnl.54.3.615>
- Kaur, D., Tiwana, H., Stino, A., & Sandroni, P. (2021). Autonomic neuropathies. *Muscle Nerve*, *63*(1), 10-21. <https://doi.org/10.1002/mus.27048>
- Kawagashira, Y., Koike, H., Takahashi, M., Ohyama, K., Iijima, M., Katsuno, M., Niwa, J.-I., Doyu, M., & Sobue, G. (2020). Aberrant Expression of Nodal and Paranodal Molecules in Neuropathy Associated With IgM Monoclonal Gammopathy With Anti-Myelin-Associated Glycoprotein Antibodies. *J Neuropathol Exp Neurol*, *79*(12), 1303-1312. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlaa085>
- Kawamura, N., Yamasaki, R., Yonekawa, T., Matsushita, T., Kusunoki, S., Nagayama, S., Fukuda, Y., Ogata, H., Matsuse, D., Murai, H., & Kira, J. (2013). Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology*, *81*(8), 714-722. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a1aa9c>
- Kiefer, R. (1998). Macrophage differentiation antigens in acute and chronic autoimmune polyneuropathies [published erratum appears in *Brain* 1998 Jun;121(Pt 6):1190]. *Brain*, *121*(3), 469-479. <https://doi.org/10.1093/brain/121.3.469>
- Kiefer, R., Kieseier, B. C., Stoll, G., & Hartung, H.-P. (2001). The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog*

Neurobiol, 64(2), 109-127. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00060-5](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00060-5)

Kieseier, B. C., Mathey, E. K., Sommer, C., & Hartung, H. P. (2018). Immune-mediated neuropathies. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 31. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0027-2>

Koike, H., Kadoya, M., Kaida, K.-I., Ikeda, S., Kawagashira, Y., Iijima, M., Kato, D., Ogata, H., Yamasaki, R., Matsukawa, N., Kira, J.-I., Katsuno, M., & Sobue, G. (2017). Paranodal dissection in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 88(6), 465-473. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-314895>

Koike, H., & Katsuno, M. (2020). Pathophysiology of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy: Insights into Classification and Therapeutic Strategy. *Neurol Ther*, 9(2), 213-227. <https://doi.org/10.1007/s40120-020-00190-8>

Kokubun, N., Nishibayashi, M., Uncini, A., Odaka, M., Hirata, K., & Yuki, N. (2010). Conduction block in acute motor axonal neuropathy. *Brain*, 133(10), 2897-2908. <https://doi.org/10.1093/brain/awq260>

Koneczny, I. (2018). A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00097>

Koneczny, I. (2020). Update on IgG4-mediated autoimmune diseases: New insights and new family members. *Autoimmun Rev*, 19(10), 102646. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102646>

Kouton, L., Boucraut, J., Devaux, J., Rajabally, Y. A., Adams, D., Antoine, J. C., Bourdain, F., Brodovitch, A., Camdessanché, J. P., Cauquil, C., Ciron, J., Dubard, T., Echaniz-Laguna, A., Grapperon, A. M., Juntas-Morales, R., Kremer, L., Kuntzer, T., Labeyrie, C., Lanfranco, L., Léger, J. M., Maisonobe, T., Mavrouidakis, N., Mecharles-Darrigol, S., Merle, P., Noury, J. B., Rouaud, V., Tard, C., Théaudin, M., Vallat, J. M., Viala, K., Attarian, S., & Delmont, E. (2020). Electrophysiological features of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy associated with IgG4 antibodies targeting neurofascin 155 or contactin 1 glycoproteins. *Clin Neurophysiol*, 131(4), 921-927. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2020.01.013>

- Kuijf, M. L., Eurelings, M., Tio-Gillen, A. P., van Doorn, P. A., van den Berg, L. H., Hooijkaas, H., Stork, J., Notermans, N. C., & Jacobs, B. C. (2009). Detection of anti-MAG antibodies in polyneuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Neurology*, *73*(9), 688-695. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b59a80>
- Kuitwaard, K., Van Koningsveld, R., Ruts, L., Jacobs, B. C., & Van Doorn, P. A. (2009). Recurrent Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *80*(1), 56-59. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.156463>
- Kuwabara, S. (2006). Long term prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a five year follow up of 38 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *77*(1), 66-70. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.065441>
- Kuwabara, S., Yuki, N., Koga, M., Hattori, T., Matsuura, D., Miyake, M., & Noda, M. (1998). IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*, *44*(2), 202-208. <https://doi.org/10.1002/ana.410440210>
- Kuwahara, M., Suzuki, H., Oka, N., Ogata, H., Yanagimoto, S., Sadakane, S., Fukumoto, Y., Yamana, M., Yuhara, Y., Yoshikawa, K., Morikawa, M., Kawai, S., Okazaki, M., Tsujimoto, T., Kira, J. I., & Kusunoki, S. (2018). Electron microscopic abnormality and therapeutic efficacy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin155 immunoglobulin G4 antibody. *Muscle Nerve*, *57*(3), 498-502. <https://doi.org/10.1002/mus.25757>
- Labasque, M., Hivert, B., Nogales-Gadea, G., Querol, L., Illa, I., & Faivre-Sarrailh, C. (2014). Specific ContactinN-Glycans Are Implicated in Neurofascin Binding and Autoimmune Targeting in Peripheral Neuropathies. *J Biol Chem*, *289*(11), 7907-7918. <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.528489>
- Lai, M., Hughes, E. G., Peng, X., Zhou, L., Gleichman, A. J., Shu, H., Matà, S., Kremens, D., Vitaliani, R., Geschwind, M. D., Bataller, L., Kalb, R. G., Davis, R., Graus, F., Lynch, D. R., Balice-Gordon, R., & Dalmau, J. (2009). AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol*, *65*(4), 424-434. <https://doi.org/10.1002/ana.21589>
- Lee, H. Y., Greene, L. A., Mason, C. A., & Manzini, M. C. (2009). Isolation and culture of post-natal mouse cerebellar granule neuron progenitor cells and neurons. *J Vis Exp* (23). <https://doi.org/10.3791/990>

- Lefter, S., Hardiman, O., & Ryan, A. M. (2017). A population-based epidemiologic study of adult neuromuscular disease in the Republic of Ireland. *Neurology*, 88(3), 304-313. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000003504>
- Lehmann, H. C., Burke, D., & Kuwabara, S. (2019). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: update on diagnosis, immunopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 90(9), 981-987. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-320314>
- Lehmann, H. C., & Hartung, H.-P. (2011). Plasma exchange and intravenous immunoglobulins: Mechanism of action in immune-mediated neuropathies. *J Neuroimmunol*, 231(1-2), 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.09.015>
- Lewis, R. A., Sumner, A. J., Brown, M. J., & Asbury, A. K. (1982). Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology*, 32(9), 958-964. <https://doi.org/10.1212/wnl.32.9.958>
- Lighaam, L. C., & Rispens, T. (2016). The Immunobiology of Immunoglobulin G4. *Semin Liver Dis*, 36(3), 200-215. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584322>
- Linker, R. A., & Kieseier, B. C. (2008). Innovative monoclonal antibody therapies in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*, 1(1), 33-42. <https://doi.org/10.1177/1756285608093945>
- Lintner, K. E., Wu, Y. L., Yang, Y., Spencer, C. H., Hauptmann, G., Hebert, L. A., Atkinson, J. P., & Yu, C. Y. (2016). Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. *Front Immunol*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00036>
- Liu, C. J., Dib-Hajj, S. D., Black, J. A., Greenwood, J., Lian, Z., & Waxman, S. G. (2001). Direct interaction with contactin targets voltage-gated sodium channel Na(v)1.9/NaN to the cell membrane. *J Biol Chem*, 276(49), 46553-46561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108699200>
- Lobo, P. I. (2016). Role of Natural Autoantibodies and Natural IgM Anti-Leucocyte Autoantibodies in Health and Disease. *Front Immunol*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00198>

- Low, P. A., Tomalia, V. A., & Park, K.-J. (2013). Autonomic Function Tests: Some Clinical Applications. *J Clin Neurol*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.3988/jcn.2013.9.1.1>
- Lunn, M. P., Manji, H., Choudhary, P. P., Hughes, R. A., & Thomas, P. K. (1999). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a prevalence study in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66(5), 677-680. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.5.677>
- Mader, A., Chromikova, V., & Kunert, R. (2013). Recombinant IgM expression in mammalian cells: A target protein challenging biotechnological production. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 04(04), 38-43. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.44a006>
- Magy, L., & Vallat, J.-M. (2009). Evidence-Based Treatment Of Chronic Immune-Mediated Neuropathies. *Expert Opin Pharmacother*, 10(11), 1741-1754. <https://doi.org/10.1517/14656560903036095>
- Mahdi-Rogers, M., Brassington, R., Gunn, A. A., van Doorn, P. A., & Hughes, R. A. (2017). Immunomodulatory treatment other than corticosteroids, immunoglobulin and plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*, 5(5), Cd003280. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003280.pub5>
- Malik, U., Oleksowicz, L., Latov, N., & Cardo, L. J. (1996). Intravenous gamma-globulin inhibits binding of anti-GM1 to its target antigen. *Ann Neurol*, 39(1), 136-139. <https://doi.org/10.1002/ana.410390121>
- Manso, C., Querol, L., Lleixà, C., Poncelet, M., Mekaouche, M., Vallat, J.-M., Illa, I., & Devaux, J. J. (2019). Anti-Neurofascin-155 IgG4 antibodies prevent paranodal complex formation in vivo. *J Clin Invest*, 129(6), 2222-2236. <https://doi.org/10.1172/jci124694>
- Manso, C., Querol, L., Mekaouche, M., Illa, I., & Devaux, J. J. (2016). Contactin-1 IgG4 antibodies cause paranode dismantling and conduction defects. *Brain*, 139(6), 1700-1712. <https://doi.org/10.1093/brain/aww062>
- Markvardsen, L. H., Debost, J. C., Harbo, T., Sindrup, S. H., Andersen, H., Christiansen, I., Otto, M., Olsen, N. K., Lassen, L. L., & Jakobsen, J. (2013). Subcutaneous immunoglobulin in responders to intravenous therapy with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Eur J Neurol*, 20(5), 836-842. <https://doi.org/10.1111/ene.12080>

- Martinez-Martinez, L., Lleixà, M. C., Boera-Carnicero, G., Cortese, A., Devaux, J., Siles, A., Rajabally, Y., Martinez-Piñeiro, A., Carvajal, A., Pardo, J., Delmont, E., Attarian, S., Diaz-Manera, J., Callegari, I., Marchioni, E., Franciotta, D., Benedetti, L., Lauria, G., De La Calle Martin, O., Juárez, C., Illa, I., & Querol, L. (2017). Anti-NF155 chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy strongly associates to HLA-DRB15. *J Neuroinflammation*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0996-1>
- Mathey, E. K., Derfuss, T., Storch, M. K., Williams, K. R., Hales, K., Woolley, D. R., Al-Hayani, A., Davies, S. N., Rasband, M. N., Olsson, T., Moldenhauer, A., Velhin, S., Hohlfeld, R., Meinl, E., & Linington, C. (2007). Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med*, 204(10), 2363-2372. <https://doi.org/10.1084/jem.20071053>
- Mathey, E. K., Garg, N., Park, S. B., Nguyen, T., Baker, S., Yuki, N., Yiannikas, C., Lin, C. S., Spies, J. M., Ghaoui, R., Barnett, M. H., Vucic, S., Pollard, J. D., & Kiernan, M. C. (2017). Autoantibody responses to nodal and paranodal antigens in chronic inflammatory neuropathies. *J Neuroimmunol*, 309, 41-46. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.05.002>
- Mathey, E. K., Park, S. B., Hughes, R. A., Pollard, J. D., Armati, P. J., Barnett, M. H., Taylor, B. V., Dyck, P. J., Kiernan, M. C., & Lin, C. S. (2015). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(9), 973-985. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-309697>
- McKhann, G. M., Cornblath, D. R., Ho, T., Griffin, J. W., Li, C. Y., Bai, A. Y., Wu, H. S., Yei, Q. F., Zhang, W. C., Zhaori, Z., Jiang, Z., & Asbury, A. K. (1991). Clinical and electrophysiological aspects of acute paralytic disease of children and young adults in northern China. *Lancet*, 338(8767), 593-597. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)90606-p](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)90606-p)
- McLeod, J. G., Pollard, J. D., Macaskill, P., Mohamed, A., Spring, P., & Khurana, V. (1999). Prevalence of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in New South Wales, Australia. *Ann Neurol*, 46(6), 910-913. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199912\)46:6<910::AID-ANA14>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199912)46:6<910::AID-ANA14>3.0.CO;2-2)
- McOmbe, P. A., Pollard, J. D., & McLeod, J. G. (1987). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain*, 110(6), 1617-1630. <https://doi.org/10.1093/brain/110.6.1617>

- Misawa, S., Kuwabara, S., Sato, Y., Yamaguchi, N., Nagashima, K., Katayama, K., Sekiguchi, Y., Iwai, Y., Amino, H., Suichi, T., Yokota, T., Nishida, Y., Kanouchi, T., Kohara, N., Kawamoto, M., Ishii, J., Kuwahara, M., Suzuki, H., Hirata, K., Kokubun, N., Masuda, R., Kaneko, J., Yabe, I., Sasaki, H., Kaida, K. I., Takazaki, H., Suzuki, N., Suzuki, S., Nodera, H., Matsui, N., Tsuji, S., Koike, H., Yamasaki, R., & Kusunoki, S. (2018). Safety and efficacy of eculizumab in Guillain-Barré syndrome: a multicentre, double-blind, randomised phase 2 trial. *Lancet Neurol*, 17(6), 519-529. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(18\)30114-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30114-5)
- Miura, Y., Devaux, J. J., Fukami, Y., Manso, C., Belghazi, M., Wong, A. H. Y., & Yuki, N. (2015). Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain*, 138(6), 1484-1491. <https://doi.org/10.1093/brain/awv054>
- Monaco, S., Ferrari, S., Bonetti, B., Moretto, G., Kirshfink, M., Nardelli, E., Nobile-Orazio, E., Zanusso, G., Rizzuto, N., & Tedesco, F. (1995). Experimental induction of myelin changes by anti-MAG antibodies and terminal complement complex. *J Neuropathol Exp Neurol*, 54(1), 96-104. <https://doi.org/10.1097/00005072-199501000-00012>
- Moss, K. R., Bopp, T. S., Johnson, A. E., & Höke, A. (2020). New Evidence for Secondary Axonal Degeneration in Demyelinating Neuropathies. *Neurosci Lett*, 744, 135595. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135595>
- Müller, L., & Zeller, D. (2018). Warum leitet das Axon? – Von der Funktion zum pathophysiologischen Verständnis. *Klinische Neurophysiologie*, 49(04), 225-230. <https://doi.org/10.1055/a-0736-9286>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway-Immunologie* (L. Seidler, Trans.; Vol. 9). Springer-Verlag, Berlin Deutschland. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>
- Mygland, A., & Monstad, P. (2001). Chronic polyneuropathies in Vest-Agder, Norway. *Eur J Neurol*, 8(2), 157-165. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2001.00187.x>
- Mygland, A., Monstad, P., & Vedeler, C. (2005). Onset and course of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve*, 31(5), 589-593. <https://doi.org/10.1002/mus.20297>

- Ng, J. K. M., Malotka, J., Kawakami, N., Derfuss, T., Khademi, M., Olsson, T., Linington, C., Odaka, M., Tackenberg, B., Pruss, H., Schwab, J. M., Harms, L., Harms, H., Sommer, C., Rasband, M. N., Eshed-Eisenbach, Y., Peles, E., Hohlfeld, R., Yuki, N., Dornmair, K., & Meinl, E. (2012). Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology*, *79*(23), 2241-2248. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e31827689ad>
- Niles, M. J., Matsuuchi, L., & Koshland, M. E. (1995). Polymer IgM assembly and secretion in lymphoid and nonlymphoid cell lines: evidence that J chain is required for pentamer IgM synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, *92*(7), 2884-2888. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2884>
- Nobile-Orazio, E., Cocito, D., Jann, S., Uncini, A., Beghi, E., Messina, P., Antonini, G., Fazio, R., Gallia, F., Schenone, A., Francia, A., Pareyson, D., Santoro, L., Tamburin, S., Macchia, R., Cavaletti, G., Giannini, F., & Sabatelli, M. (2012). Intravenous immunoglobulin versus intravenous methylprednisolone for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*, *11*(6), 493-502. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70093-5](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70093-5)
- Nobile-Orazio, E., Gallia, F., Terenghi, F., & Bianco, M. (2017). Comparing treatment options for chronic inflammatory neuropathies and choosing the right treatment plan. *Expert Rev Neurother*, *17*(8), 755-765. <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1340832>
- Nobile-Orazio, E., Manfredini, E., Carpo, M., Meucci, N., Monaco, S., Ferrari, S., Bonetti, B., Cavaletti, G., Gemignani, F., Durelli, L., Barbieri, S., Allaria, S., Sgarzi, M., & Scarlato, G. (1994). Frequency and clinical correlates of anti-neural IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol*, *36*(3), 416-424. <https://doi.org/10.1002/ana.410360313>
- Notturmo, F., Di Febo, T., Yuki, N., Fernandez Rodriguez, B. M., Corti, D., Nobile-Orazio, E., Carpo, M., De Lauretis, A., & Uncini, A. (2014). Autoantibodies to neurofascin-186 and gliomedin in multifocal motor neuropathy. *J Neuroimmunol*, *276*(1-2), 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.09.001>
- Oaklander, A. L., Lunn, M. P., Hughes, R. A., van Schaik, I. N., Frost, C., & Chalk, C. H. (2017). Treatments for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP): an overview of systematic reviews. *Cochrane Database Syst Rev*, *1*(1), Cd010369. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010369.pub2>

- Odaka, M., Yuki, N., & Hirata, K. (2003). Patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy initially diagnosed as Guillain-Barré syndrome. *J Neurol*, 250(8), 913-916. <https://doi.org/10.1007/s00415-003-1096-y>
- Ogata, H., Matsuse, D., Yamasaki, R., Kawamura, N., Matsushita, T., Yonekawa, T., Hirotani, M., Murai, H., & Kira, J.-I. (2016). A nationwide survey of combined central and peripheral demyelination in Japan. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 87(1), 29-36. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-309831>
- Ogata, H., Yamasaki, R., Hiwatashi, A., Oka, N., Kawamura, N., Matsuse, D., Kuwahara, M., Suzuki, H., Kusunoki, S., Fujimoto, Y., Ikezoe, K., Kishida, H., Tanaka, F., Matsushita, T., Murai, H., & Kira, J. I. (2015). Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol*, 2(10), 960-971. <https://doi.org/10.1002/acn3.248>
- Oh, S. J., Kurokawa, K., De Almeida, D. F., Ryan, H. F., & Claussen, G. C. (2003). Subacute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*, 61(11), 1507-1512. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000096166.28131.4c>
- Painous, C., López-Pérez, M., Illa, I., & Querol, L. (2018). Head and voice tremor improving with immunotherapy in an anti-NF155 positive CIDP patient. *Ann Clin Transl Neurol*, 5(4), 499-501. <https://doi.org/10.1002/acn3.539>
- Peles, E. (1997). Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J*, 16(5), 978-988. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.978>
- Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., Clary, D. O., Schilling, J., Barnea, G., Plowman, G. D., Grumet, M., & Schlessinger, J. (1995). The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase beta is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell*, 82(2), 251-260. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90312-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90312-7)
- Petit-Pedrol, M., Armangue, T., Peng, X., Bataller, L., Cellucci, T., Davis, R., McCracken, L., Martinez-Hernandez, E., Mason, W. P., Kruer, M. C., Ritacco, D. G., Grisold, W., Meaney, B. F., Alcalá, C., Silveis-Smitt, P., Titulaer, M. J., Balice-Gordon, R., Graus, F., & Dalmau, J. (2014). Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the

- effects of antibodies. *Lancet Neurol*, 13(3), 276-286.
[https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(13\)70299-0](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(13)70299-0)
- Piepers, S., Jansen, M. D., Cats, E. A., Van Sorge, N. M., Van Den Berg, L. H., & Van Der Pol, W. L. (2010). IVIg inhibits classical pathway activity and anti-GM1 IgM-mediated complement deposition in MMN. *J Neuroimmunol*, 229(1-2), 256-262. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.08.023>
- Piepgras, J., Höltje, M., Michel, K., Li, Q., Otto, C., Drenckhahn, C., Probst, C., Schemann, M., Jarius, S., Stöcker, W., Balint, B., Meinck, H.-M., Buchert, R., Dalmau, J., Ahnert-Hilger, G., & Ruprecht, K. (2015). Anti-DPPX encephalitis. *Neurology*, 85(10), 890-897.
<https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000001907>
- Pillai, A. M., Thaxton, C., Pribisko, A. L., Cheng, J.-G., Dupree, J. L., & Bhat, M. A. (2009). Spatiotemporal ablation of myelinating glia-specific neurofascin (Nfasc NF155) in mice reveals gradual loss of paranodal axoglial junctions and concomitant disorganization of axonal domains. *J Neurosci Res*, 87(8), 1773-1793. <https://doi.org/10.1002/jnr.22015>
- Poliak, S., & Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*, 4(12), 968-980.
<https://doi.org/10.1038/nrn1253>
- Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pevny, L., Stewart, C. L., Xu, X., Chiu, S.-Y., Shrager, P., Furley, A. J. W., & Peles, E. (2003). Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol*, 162(6), 1149-1160.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200305018>
- Querol, L., & Illa, I. (2015). Paranodal and other autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies. *Curr Opin Neurol*, 28(5), 474-479.
<https://doi.org/10.1097/wco.0000000000000233>
- Querol, L., Nogales-Gadea, G., Rojas-Garcia, R., Diaz-Manera, J., Pardo, J., Ortega-Moreno, A., Sedano, M. J., Gallardo, E., Berciano, J., Blesa, R., Dalmau, J., & Illa, I. (2014). Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology*, 82(10), 879-886.
<https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000000205>
- Querol, L., Nogales-Gadea, G., Rojas-Garcia, R., Martinez-Hernandez, E., Diaz-Manera, J., Suárez-Calvet, X., Navas, M., Araque, J., Gallardo, E., & Illa, I.

- (2013). Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*, 73(3), 370-380.
<https://doi.org/10.1002/ana.23794>
- Querol, L., Rojas-García, R., Diaz-Manera, J., Barcena, J., Pardo, J., Ortega-Moreno, A., Sedano, M. J., Seró-Ballesteros, L., Carvajal, A., Ortiz, N., Gallardo, E., & Illa, I. (2015). Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2(5), e149.
<https://doi.org/10.1212/nxi.0000000000000149>
- Querol, L., Siles, A. M., Alba-Rovira, R., Jáuregui, A., Devaux, J., Faivre-Sarrailh, C., Araque, J., Rojas-Garcia, R., Diaz-Manera, J., Cortés-Vicente, E., Nogales-Gadea, G., Navas-Madroñal, M., Gallardo, E., & Illa, I. (2017). Antibodies against peripheral nerve antigens in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Sci Rep*, 7(1), 14411.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14853-4>
- Racine, R., & Winslow, G. M. (2009). IgM in microbial infections: Taken for granted? *Immunol Lett*, 125(2), 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.06.003>
- Rajabally, Y. A., & Uncini, A. (2012). Outcome and its predictors in Guillain–Barré syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(7), 711-718.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-301882>
- Ranscht, B. (1988). Sequence of contactin, a 130-kD glycoprotein concentrated in areas of interneuronal contact, defines a new member of the immunoglobulin supergene family in the nervous system. *J Cell Biol*, 107(4), 1561-1573. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.4.1561>
- Rasband, M. N. (2010). The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci*, 11(8), 552-562.
<https://doi.org/10.1038/nrn2852>
- Rasband, M. N. (2011). Composition, assembly, and maintenance of excitable membrane domains in myelinated axons. *Semin Cell Dev Biol*, 22(2), 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.09.010>
- Rasband, M. N., & Peles, E. (2016). The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(3), a020495.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020495>

- Rees, J. H., Thompson, R. D., Smeeton, N. C., & Hughes, R. A. (1998). Epidemiological study of Guillain-Barré syndrome in south east England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *64*(1), 74-77. <https://doi.org/10.1136/jnnp.64.1.74>
- Reid, R. A., Bronson, D. D., Young, K. M., & Hemperly, J. J. (1994). Identification and characterization of the human cell adhesion molecule contactin. *Brain Res Mol Brain Res*, *21*(1-2), 1-8. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90372-7)
- Reinhold, A. K., & Rittner, H. L. (2020). Characteristics of the nerve barrier and the blood dorsal root ganglion barrier in health and disease. *Exp Neurol*, *327*, 113244. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113244>
- Rios, J. C., Melendez-Vasquez, C. V., Einheber, S., Lustig, M., Grumet, M., Hemperly, J., Peles, E., & Salzer, J. L. (2000). Contactin-Associated Protein (Caspr) and Contactin Form a Complex That Is Targeted to the Paranodal Junctions during Myelination. *J Neurosci*, *20*(22), 8354-8364. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-22-08354.2000>
- Ruts, L., Drenthen, J., Jacobs, B. C., & Van Doorn, P. A. (2010). Distinguishing acute-onset CIDP from fluctuating Guillain-Barre syndrome: A prospective study. *Neurology*, *74*(21), 1680-1686. <https://doi.org/10.1212/wnl.0b013e3181e07d14>
- Saifee, T. A., Schwingenschuh, P., Reilly, M. M., Lunn, M. P. T., Katschnig, P., Kassavetis, P., Pareés, I., Manji, H., Bhatia, K., Rothwell, J. C., & Edwards, M. J. (2013). Tremor in inflammatory neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *84*(11), 1282-1287. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-303013>
- Salzer, J. L. (2003). Polarized Domains of Myelinated Axons. *Neuron*, *40*(2), 297-318. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00628-7](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00628-7)
- Sander, H. W., & Latov, N. (2003). Research criteria for defining patients with CIDP. *Neurology*, *60*(8 Suppl 3), S8-15. https://doi.org/10.1212/wnl.60.8_suppl_3.s8
- Saperstein, D. S., Katz, J. S., Amato, A. A., & Barohn, R. J. (2001). Clinical spectrum of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Muscle Nerve*, *24*(3), 311-324. [https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200103\)24:3<311::aid-mus1001>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200103)24:3<311::aid-mus1001>3.0.co;2-a)

- Sathe, A., & Cusick, J. K. (2020). Biochemistry, Immunoglobulin M. In *StatPearls*. StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555995/>
- Schmidt, B., Toyka, K. V., Kiefer, R., Full, J., Hartung, H. P., & Pollard, J. (1996). Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Muscle Nerve*, 19(4), 474-487. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199604\)19:4<474::Aid-mus8>3.0.Co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199604)19:4<474::Aid-mus8>3.0.Co;2-9)
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2), S41-S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Schumaker, V. N., Calcott, M. A., Spiegelberg, H. L., & Müller-Eberhard, H. J. (1976). Ultracentrifuge studies of the binding of IgG of different subclasses to the Clq subunit of the first component of complement. *Biochemistry*, 15(23), 5175-5181. <https://doi.org/10.1021/bi00668a035>
- Sejvar, J. J., Baughman, A. L., Wise, M., & Morgan, O. W. (2011a). Population Incidence of Guillain-Barré Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, 36(2), 123-133. <https://doi.org/10.1159/000324710>
- Sejvar, J. J., Kohl, K. S., Gidudu, J., Amato, A., Bakshi, N., Baxter, R., Burwen, D. R., Cornblath, D. R., Cleerhout, J., Edwards, K. M., Heininger, U., Hughes, R., Khuri-Bulos, N., Korinthenberg, R., Law, B. J., Munro, U., Maltezou, H. C., Nell, P., Oleske, J., Sparks, R., Velentgas, P., Vermeer, P., & Wiznitzer, M. (2011b). Guillain-Barré syndrome and Fisher syndrome: Case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*, 29(3), 599-612. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.003>
- Shahrizaila, N., & Yuki, N. (2013). Bickerstaff brainstem encephalitis and Fisher syndrome: anti-GQ1b antibody syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 84(5), 576-583. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302824>
- Sharp, T. H., Boyle, A. L., Diebolder, C. A., Kros, A., Koster, A. J., & Gros, P. (2019). Insights into IgM-mediated complement activation based on in situ structures of IgM-C1-C4b. *Proc Natl Acad Sci USA*, 201901841. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901841116>

- Sheikh, K. A., Sun, J., Liu, Y., Kawai, H., Crawford, T. O., Proia, R. L., Griffin, J. W., & Schnaar, R. L. (1999). Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(13), 7532-7537. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7532>
- Sherman, D. L., Tait, S., Melrose, S., Johnson, R., Zonta, B., Court, F. A., Macklin, W. B., Meek, S., Smith, A. J., Cottrell, D. F., & Brophy, P. J. (2005). Neurofascins are required to establish axonal domains for saltatory conduction. *Neuron*, 48(5), 737-742. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.019>
- Shimizu, F., Sawai, S., Sano, Y., Beppu, M., Misawa, S., Nishihara, H., Koga, M., Kuwabara, S., & Kanda, T. (2014). Severity and Patterns of Blood-Nerve Barrier Breakdown in Patients with Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy: Correlations with Clinical Subtypes. *PLoS One*, 9(8), e104205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104205>
- Shimizu, S., Iijima, M., Fukami, Y., Tamura, N., Nakatochi, M., Ando, M., Nishi, R., Koike, H., Kaida, K., Koga, M., Kanda, T., Ogata, H., Kira, J. I., Mori, M., Kuwabara, S., & Katsuno, M. (2020). Efficacy and Safety of Rituximab in Refractory CIDP With or Without IgG4 Autoantibodies (RECIPE): Protocol for a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *JMIR Res Protoc*, 9(4), e17117. <https://doi.org/10.2196/17117>
- Sinmaz, N., Nguyen, T., Tea, F., Dale, R. C., & Brilot, F. (2016). Mapping autoantigen epitopes: molecular insights into autoantibody-associated disorders of the nervous system. *J Neuroinflammation*, 13(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0678-4>
- Sistani, L., Rodriguez, P. Q., Hultenby, K., Uhlen, M., Betsholtz, C., Jalanko, H., Tryggvason, K., Wernerson, A., & Patrakka, J. (2013). Neuronal proteins are novel components of podocyte major processes and their expression in glomerular crescents supports their role in crescent formation. *Kidney Int*, 83(1), 63-71. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.321>
- Sommer, C., Koch, S., Lammens, M., Gabreels-Festen, A., Stoll, G., & Toyka, K. V. (2005). Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology*, 65(12), 1924-1929. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000188879.19900.b7>

- Sommer, C., & Kommission-Leitlinien-der-DGN. (2018). *Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden, S2e-Leitlinie*. www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 17.12.2020)
- Spallone, V., Ziegler, D., Freeman, R., Bernardi, L., Frontoni, S., Pop-Busui, R., Stevens, M., Kempler, P., Hilsted, J., Tesfaye, S., Low, P., & Valensi, P. (2011). Cardiovascular autonomic neuropathy in diabetes: clinical impact, assessment, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Res Rev*, 27(7), 639-653. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1239>
- Stamboulis, E., Katsaros, N., Koutsis, G., Iakovidou, H., Giannakopoulou, A., & Simintzi, I. (2006). Clinical and subclinical autonomic dysfunction in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve*, 33(1), 78-84. <https://doi.org/10.1002/mus.20438>
- Stathopoulos, P., Alexopoulos, H., & Dalakas, M. C. (2015). Autoimmune antigenic targets at the node of Ranvier in demyelinating disorders. *Nat Rev Neurol*, 11(3), 143-156. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.260>
- Stengel, H., Vural, A., Brunder, A. M., Heinius, A., Appeltshauser, L., Fiebig, B., Giese, F., Dresel, C., Papagianni, A., Birklein, F., Weis, J., Huchtemann, T., Schmidt, C., Kortvelyessy, P., Villmann, C., Meinl, E., Sommer, C., Leypoldt, F., & Doppler, K. (2019). Anti-pan-neurofascin IgG3 as a marker of fulminant autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 6(5), e603. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000603>
- Susuki, K. (2013). Node of Ranvier disruption as a cause of neurological diseases. *ASN Neuro*, 5(3), 209-219. <https://doi.org/10.1042/an20130025>
- Susuki, K., Baba, H., Tohyama, K., Kanai, K., Kuwabara, S., Hirata, K., Furukawa, K., Furukawa, K., Rasband, M. N., & Yuki, N. (2007a). Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia*, 55(7), 746-757. <https://doi.org/10.1002/glia.20503>
- Susuki, K., Rasband, M. N., Tohyama, K., Koibuchi, K., Okamoto, S., Funakoshi, K., Hirata, K., Baba, H., & Yuki, N. (2007b). Anti-GM1 Antibodies Cause Complement-Mediated Disruption of Sodium Channel Clusters in Peripheral Motor Nerve Fibers. *J Neurosci*, 27(15), 3956-3967. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4401-06.2007>
- Susuki, K., Yuki, N., Schafer, D. P., Hirata, K., Zhang, G., Funakoshi, K., & Rasband, M. N. (2012). Dysfunction of nodes of Ranvier: A mechanism for anti-

ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Exp Neurol*, 233(1), 534-542.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.039>

Taieb, G., Le Quintrec, M., Pialot, A., Szwarc, I., Perrochia, H., Labauge, P., & Devaux, J. J. (2019). "Neuro-renal syndrome" related to anti-contactin-1 antibodies. *Muscle Nerve*, 59(3), E19-E21. <https://doi.org/10.1002/mus.26392>

Tait, S., Gunn-Moore, F., Collinson, J. M., Huang, J., Lubetzki, C., Pedraza, L., Sherman, D. L., Colman, D. R., & Brophy, P. J. (2000). An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction. *J Cell Biol*, 150(3), 657-666. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.3.657>

Tang, L., Huang, Q., Qin, Z., & Tang, X. (2020). Distinguish CIDP with autoantibody from that without autoantibody: pathogenesis, histopathology, and clinical features. *J Neurol*. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-09823-2>

Tao, M. H., Smith, R. I., & Morrison, S. L. (1993). Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation. *J Exp Med*, 178(2), 661-667.
<https://doi.org/10.1084/jem.178.2.661>

Tard, C., Maurage, C.-A., De Paula, A. M., Cassim, F., Delval, A., Kuchcinski, G., Davion, J.-B., Defebvre, L., Bouchiba, M., Jourdain, M., & Boucraut, J. (2020). Anti-pan-neurofascin IgM in COVID-19-related Guillain-Barré syndrome: Evidence for a nodo-paranodopathy. *Neurophysiologie Clinique*, 50(5), 397-399. <https://doi.org/10.1016/j.neucli.2020.09.007>

Tatum, A. H. (1993). Experimental paraprotein neuropathy, demyelination by passive transfer of human IgM anti-myelin-associated glycoprotein. *Ann Neurol*, 33(5), 502-506. <https://doi.org/10.1002/ana.410330514>

Thaxton, C., Pillai, A. M., Pribisko, A. L., Dupree, J. L., & Bhat, M. A. (2011). Nodes of Ranvier Act as Barriers to Restrict Invasion of Flanking Paranodal Domains in Myelinated Axons. *Neuron*, 69(2), 244-257.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.016>

Thaxton, C., Pillai, A. M., Pribisko, A. L., Labasque, M., Dupree, J. L., Faivre-Sarrailh, C., & Bhat, M. A. (2010). In vivo deletion of immunoglobulin domains 5 and 6 in neurofascin (Nfasc) reveals domain-specific requirements in myelinated axons. *J Neurosci*, 30(14), 4868-4876.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.5951-09.2010>

- Treubert, U., & Brümmendorf, T. (1998). Functional Cooperation of β 1-Integrins and Members of the Ig Superfamily in Neurite Outgrowth Induction. *J Neurosci*, *18*(5), 1795-1805. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-05-01795.1998>
- Tzartos, S., Hochschwender, S., Vasquez, P., & Lindstrom, J. (1987). Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis by monoclonal antibodies to the main immunogenic region of the acetylcholine receptor. *J Neuroimmunol*, *15*(2), 185-194. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(87\)90092-0](https://doi.org/10.1016/0165-5728(87)90092-0)
- Uncini, A., & Kuwabara, S. (2015). Nodopathies of the peripheral nerve: an emerging concept. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *86*(11), 1186-1195. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-310097>
- Uncini, A., Manzoli, C., Notturmo, F., & Capasso, M. (2010). Pitfalls in electrodiagnosis of Guillain-Barre syndrome subtypes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *81*(10), 1157-1163. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.208538>
- Uncini, A., Susuki, K., & Yuki, N. (2013). Nodoparanopathy: Beyond the demyelinating and axonal classification in anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Clin Neurophysiol*, *124*(10), 1928-1934. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2013.03.025>
- Uncini, A., & Vallat, J.-M. (2018). Autoimmune nodoparanopathies of peripheral nerve: the concept is gaining ground. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *89*(6), 627-635. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317192>
- Vallat, J.-M., Sommer, C., & Magy, L. (2010). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol*, *9*(4), 402-412. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70041-7](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70041-7)
- Vallat, J. M., Mathis, S., Magy, L., Bounolleau, P., Skarzynski, M., Heitzmann, A., Manso, C., Devaux, J., & Uncini, A. (2018). Subacute nodopathy with conduction blocks and anti-neurofascin 140/186 antibodies: an ultrastructural study. *Brain*, *141*(7), e56. <https://doi.org/10.1093/brain/awy134>
- Vallat, J. M., Yuki, N., Sekiguchi, K., Kokubun, N., Oka, N., Mathis, S., Magy, L., Sherman, D. L., Brophy, P. J., & Devaux, J. J. (2017). Paranodal lesions in

chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with anti-Neurofascin 155 antibodies. *Neuromuscul Disord*, 27(3), 290-293.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.10.008>

Van Den Berg, B., Walgaard, C., Drenthen, J., Fokke, C., Jacobs, B. C., & Van Doorn, P. A. (2014). Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol*, 10(8), 469-482.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.121>

Van Den Bergh, P. Y. K., & Piéret, F. (2004). Electrodiagnostic criteria for acute and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve*, 29(4), 565-574. <https://doi.org/10.1002/mus.20022>

Van Der Meché, F. G. A., & Schmitz, P. I. M. (1992). A Randomized Trial Comparing Intravenous Immune Globulin and Plasma Exchange in Guillain-Barré Syndrome. *N Engl J Med*, 326(17), 1123-1129.
<https://doi.org/10.1056/nejm199204233261705>

Van der Neut Kolfschoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W. K., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., den Bleker, T. H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L. A., De Baets, M. H., van de Winkel, J. G., Aalberse, R. C., & Parren, P. W. (2007). Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*, 317(5844), 1554-1557.
<https://doi.org/10.1126/science.1144603>

Van Koningsveld, R., Van Doorn, P. A., Schmitz, P. I., Ang, C. W., & Van der Meché, F. G. (2000). Mild forms of Guillain-Barré syndrome in an epidemiologic survey in The Netherlands. *Neurology*, 54(3), 620-625.
<https://doi.org/10.1212/wnl.54.3.620>

Van Schaik, I. N., Bril, V., Van Geloven, N., Hartung, H.-P., Lewis, R. A., Sobue, G., Lawo, J.-P., Praus, M., Mielke, O., Durn, B. L., Cornblath, D. R., Merkies, I. S. J., Sabet, A., George, K., Roberts, L., Carne, R., Blum, S., Henderson, R., Van Damme, P., Demeestere, J., Larue, S., D'Amour, C., Bril, V., Breiner, A., Kunc, P., Valis, M., Sussova, J., Kalous, T., Talab, R., Bednar, M., Toomsoo, T., Rubanovits, I., Gross-Paju, K., Sorro, U., Saarela, M., Auranen, M., Pouget, J., Attarian, S., Le Masson, G., Wielanek-Bachelet, A., Desnuelle, C., Delmont, E., Clavelou, P., Aufauvre, D., Schmidt, J., Zschuentssch, J., Sommer, C., Kramer, D., Hoffmann, O., Goerlitz, C., Haas, J., Chatzopoulos, M., Yoon, R., Gold, R., Berlit, P., Jaspert-Grehl, A., Liebetanz, D., Kutschenko, A., Stangel, M., Trebst, C., Baum, P., Bergh, F., Klehmet, J., Meisel, A., Klostermann, F., Oechtering, J., Lehmann, H., Schroeter, M., Hagenacker, T., Mueller, D., Sperfeld, A., Bethke, F., Drory, V., Algom, A., Yarnitsky, D., Murinson, B., Di Muzio, A., Ciccocioppo,

F., Sorbi, S., Mata, S., Schenone, A., Grandis, M., Lauria, G., Cazzato, D., Antonini, G., Morino, S., Cocito, D., Zibetti, M., Yokota, T., Ohkubo, T., Kanda, T., Kawai, M., Kaida, K., Onoue, H., Kuwabara, S., Mori, M., Iijima, M., Ohyama, K., Baba, M., Tomiyama, M., Nishiyama, K., Akutsu, T., Yokoyama, K., Kanai, K., Van Schaik, I. N., Eftimov, F., Notermans, N. C., Visser, N., Faber, C., Hoeijmakers, J., Rejdak, K., Chyrchel-Paszkiewicz, U., Casanovas Pons, C., Alberti Aguiló, M., Gamez, J., Figueras, M., Marquez Infante, C., Benitez Rivero, S., Lunn, M., Morrow, J., Gosal, D., Lavin, T., Melamed, I., Testori, A., Ajroud-Driss, S., Menichella, D., Simpson, E., Chi-Ho Lai, E., Dimachkie, M., Barohn, R. J., Beydoun, S., Johl, H., Lange, D., Shtilbans, A., Muley, S., Ladha, S., Freimer, M., Kissel, J., Latov, N., Chin, R., Ubogu, E., Mumfrey, S., Rao, T., Macdonald, P., Sharma, K., Gonzalez, G., Allen, J., Walk, D., Hobson-Webb, L., & Gable, K. (2018). Subcutaneous immunoglobulin for maintenance treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (PATH): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol*, 17(1), 35-46. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(17\)30378-2](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(17)30378-2)

Vanderlugt, C. J., & Miller, S. D. (1996). Epitope spreading. *Curr Opin Immunol*, 8(6), 831-836. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(96\)80012-4](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(96)80012-4)

Vedeler, C. A., Farbu, E., & Mellgren, S. I. (2013). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Acta Neurol Scand Suppl*(196), 48-51. <https://doi.org/10.1111/ane.12049>

Viala, K., Maisonobe, T., Stojkovic, T., Koutlidis, R., Ayrignac, X., Musset, L., Fournier, E., Léger, J. M., & Bouche, P. (2010). A current view of the diagnosis, clinical variants, response to treatment and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, 15(1), 50-56. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2010.00251.x>

Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>

Vital, C., Vital, A., & Lagueny, A. (2000). Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy: Immunopathological and Ultrastructural Study of Peripheral Nerve Biopsy in 42 Cases. *Ultrastruct Pathol*, 24(6), 363-369. <https://doi.org/10.1080/019131200750060023>

Vlam, L., Cats, E. A., Harschnitz, O., Jansen, M. D., Piepers, S., Veldink, J. H., Franssen, H., Stork, A. C. J., Heezius, E., Rooijackers, S. H. M., Herpers, B. L., Van Strijp, J. A., Van Den Berg, L. H., & Van Der Pol, W. L. (2015). Complement activity is associated with disease severity in multifocal motor neuropathy. *Neurol*

Neuroimmunol Neuroinflamm, 2(4), e119-e119.
<https://doi.org/10.1212/nxi.000000000000119>

Vlam, L., Van Der Pol, W. L., Cats, E. A., Straver, D. C., Piepers, S., Franssen, H., & Van Den Berg, L. H. (2012). Multifocal motor neuropathy: diagnosis, pathogenesis and treatment strategies. *Nat Rev Neurol*, 8(1), 48-58.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.175>

Volkmer, H., Hassel, B., Wolff, J. M., Frank, R., & Rathjen, F. G. (1992). Structure of the axonal surface recognition molecule neurofascin and its relationship to a neural subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J Cell Biol*, 118(1), 149-161. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.1.149>

Volkmer, H., Zacharias, U., Nörenberg, U., & Rathjen, F. G. (1998). Dissection of Complex Molecular Interactions of Neurofascin with Axonin-1, F11, and Tenascin-R, Which Promote Attachment and Neurite Formation of Tectal Cells. *J Cell Biol*, 142(4), 1083-1093.
<https://doi.org/10.1083/jcb.142.4.1083>

Voso, M. T., Pantel, G., Rutella, S., Weis, M., D'Alò, F., Urbano, R., Leone, G., Haas, R., & Hohaus, S. (2002). Rituximab reduces the number of peripheral blood B-cells in vitro mainly by effector cell-mediated mechanisms. *Haematologica*, 87(9), 918-925.

Vural, A., Doppler, K., & Meinl, E. (2018). Autoantibodies Against the Node of Ranvier in Seropositive Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy: Diagnostic, Pathogenic, and Therapeutic Relevance. *Front Immunol*, 9, 1029. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01029>

Vural, A., Göçmen, R., Kurne, A. T., Oğuz, K. K., Temuçin, Ç. M., Tan, E., Karabudak, R., Meinl, E., & Erdem Özdamar, S. (2016). Fulminant Central Plus Peripheral Nervous System Demyelination without Antibodies to Neurofascin. *Can J Neurol Sci*, 43(01), 149-156. <https://doi.org/10.1017/cjn.2015.238>

Wakerley, B. R., Uncini, A., & Yuki, N. (2014). Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes—new diagnostic classification. *Nat Rev Neurol*, 10(9), 537-544.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.138>

Wasielewska, A., Rudzińska, M., Tomaszewski, T., Banaszkiewicz, K., Wójcik-Pędziwiatr, M., Dec-Ćwiek, M., Zajączkowska, A., Izvorski, A., & Szczudlik, A. (2013). Tremor in neuropathies of different origin. *Neurol Neurochir Pol*, 47(6), 525-533. <https://doi.org/10.5114/ninp.2013.34695>

- Waxman, S. G., & Ritchie, J. M. (1993). Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol*, 33(2), 121-136. <https://doi.org/10.1002/ana.410330202>
- Whittam, D. H., Tallantyre, E. C., Jolles, S., Huda, S., Moots, R. J., Kim, H. J., Robertson, N. P., Cree, B. A. C., & Jacob, A. (2019). Rituximab in neurological disease: principles, evidence and practice. *Pract Neurol*, 19(1), 5-20. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2018-001899>
- Wijdicks, E. F., & Klein, C. J. (2017). Guillain-Barré Syndrome. *Mayo Clin Proc*, 92(3), 467-479. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.12.002>
- Willison, H. J., Jacobs, B. C., & Van Doorn, P. A. (2016). Guillain-Barré syndrome. *Lancet*, 388(10045), 717-727. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)00339-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)00339-1)
- Willison, H. J., O'Leary, C. P., Veitch, J., Blumhardt, L. D., Busby, M., Donaghy, M., Fuhr, P., Ford, H., Hahn, A., Renaud, S., Katifi, H. A., Ponsford, S., Reuber, M., Steck, A., Sutton, I., Schady, W., Thomas, P. K., Thompson, A. J., Vallat, J. M., & Winer, J. (2001). The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain*, 124(Pt 10), 1968-1977. <https://doi.org/10.1093/brain/124.10.1968>
- Winer, J. B., Hughes, R. A., Anderson, M. J., Jones, D. M., Kangro, H., & Watkins, R. P. (1988). A prospective study of acute idiopathic neuropathy. II. Antecedent events. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51(5), 613-618. <https://doi.org/10.1136/jnnp.51.5.613>
- Xenaki, D., Martin, I. B., Yoshida, L., Ohyama, K., Gennarini, G., Grumet, M., Sakurai, T., & Furley, A. J. W. (2011). F3/contactin and TAG1 play antagonistic roles in the regulation of sonic hedgehog-induced cerebellar granule neuron progenitor proliferation. *Development*, 138(3), 519-529. <https://doi.org/10.1242/dev.051912>
- Yuki, N. (1993). A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J Exp Med*, 178(5), 1771-1775. <https://doi.org/10.1084/jem.178.5.1771>
- Yuki, N., & Kuwabara, S. (2007). Axonal Guillain-Barré syndrome: carbohydrate mimicry and pathophysiology. *J Peripher Nerv Syst*, 12(4), 238-249. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2007.00153.x>

- Yuki, N., Taki, T., Takahashi, M., Saito, K., Yoshino, H., Tai, T., Handa, S., & Miyatake, T. (1994). Molecular mimicry between GQ1b ganglioside and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Fisher's syndrome. *Ann Neurol*, *36*(5), 791-793.
<https://doi.org/10.1002/ana.410360517>
- Yuki, N., & Uncini, A. (2014). Acute and chronic ataxic neuropathies with disialosyl antibodies: a continuous clinical spectrum and a common pathophysiological mechanism. *Muscle Nerve*, *49*(5), 629-635.
<https://doi.org/10.1002/mus.24192>
- Yuki, N., Watanabe, H., Nakajima, T., & Spath, P. J. (2011). IVIG blocks complement deposition mediated by anti-GM1 antibodies in multifocal motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *82*(1), 87-91.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.205856>
- Yuki, N., Yamada, M., Koga, M., Odaka, M., Susuki, K., Tagawa, Y., Ueda, S., Kasama, T., Ohnishi, A., Hayashi, S., Takahashi, H., Kamijo, M., & Hirata, K. (2001). Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol*, *49*(6), 712-720.
<https://doi.org/10.1002/ana.1012>
- Zhang, A., Desmazieres, A., Zonta, B., Melrose, S., Campbell, G., Mahad, D., Li, Q., Sherman, D. L., Reynolds, R., & Brophy, P. J. (2015). Neurofascin 140 is an embryonic neuronal neurofascin isoform that promotes the assembly of the node of Ranvier. *J Neurosci*, *35*(5), 2246-2254.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.3552-14.2015>
- Zhang, X., Zheng, P., Devaux, J. J., Wang, Y., Liu, C., Li, J., Guo, S., Song, Y., Wang, Q., Feng, X., & Wang, Y. (2019). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-NF155 IgG4 in China. *J Neuroimmunol*, *337*, 577074. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577074>

I Abkürzungsverzeichnis

AIDP	akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
AMAN	akute motorische axonale Neuropathie
AMSAN	akute motorisch-sensible axonale Neuropathie
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
BSA	Bovine Serum Albumin
Bzw.	beziehungsweise
CASPR	Contactin-associated-Protein-1
CIDP	chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
DADS	distal erworbene demyelinisierende symmetrische Polyneuropathie
DAPI	4,6 Diamidin-2-phenylindol
DE	Deutschland
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DNase	Desoxyribonuklease I
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPPX	Dipeptidyl-Peptidase-like Protein 6
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetal Bovine Serum
Fn-Domäne	Fibronectin-Domäne
g	Gramm
GBS	Guillain-Barré-Syndrom

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
Ig-Domäne	Immunglobulin-Domäne
INCAT	inflammatory neuropathy cause and treatment
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LDH	Lactate Dehydrogenase
mA	Milliampere
MADSAM	multifokale erworbene demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MEM	Minimal essential medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMN	multifokale motorische Neuropathie
MuSK	muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Normal Goat Serum
nm	Nanometer

PBS	Phosphate Buffered Saline
PDL	Poly-D-Lysine Hydrobromide
Pen/Strep	Penicillin/ Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PNP	Polyneuropathie
SDS	Dodecyl Sulfate Sodium Salt
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TMB	Tetramethylbenzidin
USA	United States of America
V	Volt
V.a	Verdacht auf
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ranvierscher Schnürring mit nodalem, paranodalem und juxtapanodalem Bereich, übernommen aus Susuki, 2013: „Node of Ranvier disruption as a cause of neurological diseases“	18
Abbildung 2: Proteine des Ranvierschen Schnürringes, übernommen aus Susuki, 2013: „Node of Ranvier disruption as a cause of neurological diseases“	19
Abbildung 3: Aufbau der Neurofascin-Isoformen.....	22
Abbildung 4: Schematischer Aufbau IgG-Monomer und IgM-Pentamer	24
Abbildung 5: Prinzip der Bindungsassays an Zupfnerven	57
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Präinkubation an ELISA Platten.....	68
Abbildung 7: Übersicht über Inkubationsversuche	77
Abbildung 8: Bindungsassays an murinen Ischiadicuszupfnerven	90
Abbildung 9: Streudiagramm Neurofascin-155-IgG ELISA	92
Abbildung 10: Streudiagramm Neurofascin-186-IgG ELISA	93
Abbildung 11: Streudiagramm Neurofascin-140-IgG ELISA	94
Abbildung 12: Streudiagramm Contactin-1-IgG ELISA.....	95
Abbildung 13: Balkendiagramm zur Darstellung der Subklassen und der C1q-Komplementbindung von beiden IgG-Patienten jeweils für Neurofascin-155	97
Abbildung 14: Bindungsassays an mit Neurofascin-155 transfizierten HEK-293-Zellen	99
Abbildung 15: Bindungsassays an mit Neurofascin-186 transfizierten HEK-293-Zellen	100
Abbildung 16: Bindungsassays an murinen cerebellären Neuronen.....	101
Abbildung 17: Bindungsassays an Rattenvorderwurzelzupfnervpräparaten.....	103
Abbildung 18. Bindungsassays an Ischiadicuszupfnervpräparaten mit präinkubierten Seren.....	105
Abbildung 19: Bindungsassay an Ischiadicuszupfnervpräparaten in Verlaufsseren von IgG-Patient 1	112
Abbildung 20: Bindungsassays an Ischiadicuszupfnervpräparaten mit Seren vor bzw. nach Plasmapheresetherapien von IgG-Patient 1	113
Abbildung 21: Streudiagramm Neurofascin-155-IgM ELISA.....	117
Abbildung 22: Streudiagramm Neurofascin-186-IgM ELISA.....	118

Abbildung 23: Streudiagramm Contactin-1-IgM ELISA	119
Abbildung 24: Präinkubation von Seren mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern an ELISA Platten.....	120
Abbildung 25: Western Blot zum Nachweis von Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern	122
Abbildung 26: Neurofascin-155-IgM-ELISA Verlaufswerte von IgM-Patient 1	130
Abbildung 27: Bindungsassays an murinen cerebellären Neuronen und murinen Spinalganglienneuronen	138
Abbildung 28: Subklassenspezifische Bindungsassays IgG3 sowie IgG4 von CNTN-Patient 1 und einer gesunden Kontrolle an cerebellären Neuronen.....	140
Abbildung 29: Subklassenspezifische Bindungsassays IgG1 sowie IgG4 von CNTN-Patientin 2 sowie einer gesunden Kontrolle an cerebellären Neuronen	141
Abbildung 30: Immunhistochemische Färbung auf Contactin-1 nach ein- sowie dreitägiger Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum	143
Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung auf Contactin-1 nach zwei- sowie viertägiger Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum	144
Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung auf Contactin-1 nach ein- sowie zweitägiger Inkubation der Spinalganglienneurone mit Serum	145
Abbildung 33: Immunhistochemische Färbung auf Neurofascin nach dreitägiger Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum.....	146
Abbildung 34: Immunhistochemische Färbung auf Neurofascin nach zweitägiger Inkubation der Spinalganglienneurone mit Serum	147
Abbildung 35: Immunhistochemische Färbung auf Beta-III-Tubulin nach mehrtägiger Inkubation der cerebellären Neurone mit Serum.....	149
Abbildung 36: Western Blot zur Darstellung der Expression von Contactin-1 nach dreitägiger Inkubation cerebellärer Neurone	151
Abbildung 37: Western Blot zur Darstellung der Expression von Neurofascin nach dreitägiger Inkubation cerebellärer Neurone	151
Abbildung 38: Relative Proteinexpression von Contactin-1 sowie Neurofascin im Western Blot nach dreitägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum	152

Abbildung 39: Western Blot zur Darstellung der Expression von Contactin-1 nach zwei- sowie viertägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum des CNTN-Patienten 1	153
Abbildung 40: Western Blot zur Darstellung der Expression von Contactin-1 nach zwei- sowie viertägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum der CNTN-Patientin 2	153
Abbildung 41: Relative Proteinexpression von Contactin-1 im Western Blot nach zwei- sowie viertägiger Inkubation cerebellärer Neurone mit Serum.....	154
Abbildung 42: Zytotoxizitätsassays nach mehrtägiger Inkubation an cerebellären Neuronen	156
Abbildung 43: Zytotoxizitätsassays nach mehrtägiger Inkubation an Spinalganglienneuronen	157

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Brighton-Diagnosekriterien für GBS übersetzt aus Sejvar et al., 2011b.....	11
Tabelle 2: Elektrophysiologische Brighton-Diagnosekriterien für GBS-Unterformen übersetzt aus Sejvar et al., 2011b	12
Tabelle 3: INCAT-Diagnosekriterien übersetzt aus Hughes et al., 2001a	12
Tabelle 4: Therapieempfehlung GBS	14
Tabelle 5: Therapieempfehlung CIDP.....	15
Tabelle 6: Antiinflammatorische Wirkmechanismen von IVIG, Glukokortikosteroiden und Plasmapherese	17
Tabelle 7: Nebenwirkungen von IVIG, Glukokortikosteroiden und Plasmapherese	17
Tabelle 8: Eigenschaften von IgM und den verschiedenen IgG-Subklassen	25
Tabelle 9: Studien mit Nachweis von Contactin-1-IgG-Autoantikörpern.....	30
Tabelle 10: Studien mit Nachweis von CASPR-1-IgG-Autoantikörpern	31
Tabelle 11: Studien mit Nachweis von Neurofascin-Autoantikörpern	32
Tabelle 12: Rituximab-Therapie.....	34
Tabelle 13: Verwendete Reagenzien	36
Tabelle 14: Verwendete Lösungen und Puffer	40
Tabelle 15: Verwendete Proteine und Komplement	44
Tabelle 16: Verwendete Antikörper	44
Tabelle 17: Verwendetes Verbrauchsmaterial.....	47
Tabelle 18: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial	49
Tabelle 19: Verwendete Software	51
Tabelle 20: Verwendete Zellen und Gewebe	51
Tabelle 21: Subgruppen des PatientInnenkollektives mit Durchschnittsalter und Geschlecht	54
Tabelle 22: PatientInnen mit Contactin-1-IgG-Autoantikörpern	55
Tabelle 23: Zusammenfassung der Kontroll- sowie Testwerte bei Zytotoxizitätsassays	82
Tabelle 24: Titer der Patienten mit Neurofascin-155-IgG-Autoantikörpern.....	96
Tabelle 25: Überblick über allgemeine Daten der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern.....	106
Tabelle 26: Überblick über klinische Aspekte der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern.....	106

Tabelle 27: Überblick über elektrophysiologische Untersuchungsergebnisse der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern	107
Tabelle 28: Überblick über invasive Untersuchungsergebnisse der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern	108
Tabelle 29: Überblick über experimentelle diagnostische Ergebnisse der Patienten mit Neurofascin-IgG-Autoantikörpern	108
Tabelle 30: Übersicht über Ergebnisse der experimentellen Diagnostik des IgG-Patient 1 in zeitlichem Zusammenhang mit den durchgeführten Therapien	110
Tabelle 31: Titer der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern.....	119
Tabelle 32: Überblick über allgemeine Daten der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern.....	123
Tabelle 33: Überblick über klinische Aspekte der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern.....	124
Tabelle 34: Überblick über elektroneuro- sowie elektromyographische Untersuchungsergebnisse der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern	124
Tabelle 35: Überblick über invasive Untersuchungsergebnisse der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern	126
Tabelle 36: Überblick über experimentelle diagnostische Ergebnisse der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern	127
Tabelle 37: Überblick über therapeutisches Ansprechen der PatientInnen mit Neurofascin-155-IgM-Autoantikörpern	127
Tabelle 38: Vergleich zwischen IgG-Patient 1 und exemplarischen Fallberichten von PatientInnen mit Autoantikörpern gegen mehrere Isoformen von Neurofascin.....	161

IV Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei Frau PD Dr. Kathrin Doppler bedanken. Ihre Betreuung war in jeglicher Hinsicht herausragend. Sie stand mir stets mit ihrem Rat zur Seite, unterstützte mich zu jeder Zeit und war immer offen für meine Vorschläge sowie neue Ideen. Ich bin Frau PD Dr. Kathrin Doppler sehr dankbar, dass ich durch sie die Möglichkeit bekam an einem so spannenden Thema arbeiten zu dürfen.

Auch Frau Prof. Dr. Claudia Sommer gilt mein Dank für ihre Ratschläge und ihre exzellente fachliche Unterstützung. Ich möchte mich ganz herzlich dafür bedanken, dass sowohl Frau Prof. Dr. Claudia Sommer als auch Frau PD Dr. Kathrin Doppler mich dadurch motivierten, dass sie mir immer zeigten, auf welche Weise die Forschungsarbeit direkte Relevanz für die Behandlung ihrer PatientInnen mit sich bringt.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Prof. Dr. Carmen Villmann bedanken, die meinem Promotionsprojekt durch ihre sehr konstruktiven Ratschläge immer wieder neue fachliche Impulse gab und auch zahlreiche Materialien für das Projekt zur Verfügung stellte. Auch Ihrem Team, insbesondere Dr. Natascha Schäfer, Dr. Vera Rauschenberger und Dieter Janzen vielen Dank für die Einarbeitung in neue Methoden und das sehr angenehme Arbeitsklima in dem Labor der AG Villmann.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Edgar Meinl, der durch das stetige Senden von Neurofascin-Protein aus München nach Würzburg die ELISA-Untersuchungen ermöglichte. Ihm und seinem Mitarbeiter Dr. Atay Vural danke ich auch für die Durchführung der Epitopcharakterisierung, die spannende Erkenntnisse über die Neurofascin-IgG-Autoantikörper erbrachte.

Vielen Dank allen einsendenden ÄrztInnen, ganz besonders dem Team der Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg sowie Florian Giese aus der Neurologie des Universitätsklinikums Halle und PD Dr. Julian Grosskreutz aus der Neurologie des Universitätsklinikums Jena für die Einsendung von Patientenserum, was die Identifikation von PatientInnen mit (Para-)nodopathien ermöglichte. Ganz besonderer Dank gilt natürlich den PatientInnen ohne deren Bereitschaft zur Einsendung von Serum diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Frau Dr. Luise Appeltshauer gilt mein großer Dank. Viele der von mir verwendeten Protokolle wurden sehr gewissenhaft von ihr etabliert und bei methodischen Problemen halfen mir ihre Ratschläge stets weiter. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir von ihr rekrutierte Patientenseren mit paranodalen Autoantikörpern für weiterführende Versuche zur Verfügung stellte und ich von ihr ermittelte Kontrollwerte in den ELISA-Untersuchungen zur Ermittlung der Grenzwerte verwenden konnte. Ihrer Doktorandin Katharina Starz danke ich für die Überlassung der Verlaufswerte von IgM-Patient 5.

Bei Frau Prof. Dr. Nurcan Üçeyler sowie Ihren Mitarbeitern Dr. Luisa Kress, Dr. Franziska Karl, Dr. Lukas Hofmann und Dr. Thomas Klein möchte ich mich für die vielen konstruktiven Ratschläge im Rahmen des AG-Seminars bedanken, die häufig zu neuen Ideen für das Promotionsprojekt führten.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei den Technischen Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Hiltrud Klüpfel, Kathleen Stahl und Sonja Gommersbach für die geduldige Einarbeitung und die stetige Unterstützung. Ganz besonderer Dank gilt auch Barbara Reuter, die mit ihrem außergewöhnlichen Engagement immer wieder Unmögliches möglich machte.

Bei den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe insbesondere Dr. Anastasia Kuzkina, Dr. Beate Hartmannsberger, Julia Grüner und Katharina Hecker bedanke ich mich sehr für die großartige Arbeitsatmosphäre und die guten gemeinsamen fachlichen sowie nicht fachlichen Gespräche.

Ganz besonders möchte ich meinen Mitpromovendinnen Anna-Michelle Brunder und Bianca Fiebig für das wunderbare Zusammenarbeiten und den fruchtbaren gemeinsamen Austausch danken.

Zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meiner Mama Marlene, meinem Papa Robert, meiner Schwester Antonia, meinem Opa Hans, meiner Oma Mina und Sebastian danken, die mich während des Promotionsprojektes zu jeder Zeit und in jeglicher Hinsicht unterstützen und immer großes Interesse an meiner Promotionsarbeit zeigten.

V Lebenslauf

Medizinische Ausbildung

seit 02/2021	Assistenzärztin an der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg
10/2013-06/2020	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
06/2020	Approbation als Ärztin, Gesamtnote 1,33
05/2020	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,0
04/2019	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 2,0
08/2015	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: 1,0
06/2016-03/2021	Experimentell-klinisches Promotionsprojekt in der AG Sommer/Doppler an der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg

Stipendien

10/2013 – 06/2020	Stipendiatin des Max-Weber-Programmes
09/2013 – 06/2020	Stipendiatin des Cusanuswerkes

Freiwilliges Soziales Jahr

08/2012 - 07/2013	„Weltwärts-Freiwilligendienst“ in Chile „Niños de las estrellas“, Schule für Menschen mit geistiger Behinderung
-------------------	--

Schule

2004-2012	Gymnasium Donauwörth Abitur, Note 1,0
-----------	--

Engagement

10/2013 – 06/2020	Arbeitskreis „Von Mensch zu Mensch“ Organisation und Durchführung von Freizeitaktivitäten für Menschen mit Behinderung in der Katholischen Hochschulgemeinde Würzburg
08/2013 - heute	Mitarbeit im Verein „Sternenkinder e.V.“ Unterstützender Verein der Schule „Niños de las estrellas“ für Menschen mit geistiger Behinderung in Chile

VI Veröffentlichungen, Auszeichnungen und Vorträge

Veröffentlichungen

- 08/2019 Stengel, H., Vural, A., Brunder, A. M., Heinius, A., Appeltshauer, L., Fiebig, B., Giese, F., Dresel, C., Papagianni, A., Birklein, F., Weis, J., Huchtemann, T., Schmidt, C., Kortvelyessy, P., Villmann, C., Meinel, E., Sommer, C., Leypoldt, F., & Doppler, K. (2019). *Anti-pan-neurofascin IgG3 as a marker of fulminant autoimmune neuropathy. Neurology, Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 6(5). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000603>
- 11/2018 Doppler, K., Stengel, H., Appeltshauer, L., Grosskreutz, J., Man Ng, J. K., Meinel, E., & Sommer, C. (2018). *Neurofascin-155 IgM autoantibodies in patients with inflammatory neuropathies. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 89(11), 1145-1151. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-318170>

Auszeichnungen und Vorträge

- 02/2020 Arnold-Haarmann Forschungspreis der Deutschen GBS CIDP Initiative e.V.
(Verleihung auf Grund der Coronapandemie ausstehend)
- 11/2019 Vortrag beim Sonderkolloquium des Friedrich Baur Institutes
„Diagnostik und Therapie neuromuskulärer Erkrankungen“
Vortrag: „Das klinische Spektrum der Anti-Neurofascin-Antikörper assoziierten Neuropathie“
- 10/2019 Posterpreis des Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2019, Kategorie Peripheres Nervensystem und seine Erkrankungen
„Charakterisierung klinischer Phänotypen der Neurofascin-(Para-)nodopathie in Assoziation mit unterschiedlichen Subklassen und Epitopen – Pan-Neurofascin-IgG3 im Vergleich zu Neurofascin-155-IgG4“
- 11/2018 Posterpreis des Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2018, Kategorie Periphere Nervenerkrankungen
„IgG- und IgM-Autoantikörper gegen Neurofascin-155 in einer Kohorte von Patienten mit Immunneuropathien – klinisches Bild, Elektrophysiologie und Therapieansprechen“