

**Die Effekte von IVIG auf die Antikörperbindung und
Komplementablagerung bei Anti-Neurofascin-positiver Nodoparanodopathie**

**The effects of IVIG on antibody binding and complement
deposition in anti-neurofascin associated neuropathy**



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

Vorgelegt von

Julia Messinger

aus

Saarlouis

Würzburg, 2022



This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> or send a letter to Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA. This CC license does not apply to third party material (attributed to another source) in this publication.

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Lars Dölken

1. Betreuerin: Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler

2. Betreuerin: Prof. Dr. med. Claudia Sommer

3. Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Carmen Villmann

4. Betreuerin: Prof. Dr. med Heike Rittner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

.....

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Inflammatorische Polyneuropathien.....	1
1.1.1	Definition, Unterteilung, Epidemiologie	1
1.1.2	Pathophysiologie	4
1.1.3	Klinisches Erscheinungsbild	5
1.1.4	Diagnosekriterien.....	6
1.1.5	Therapiestrategien.....	11
1.2	Aufbau des Ranvier'schen Schnürringes	17
1.2.1	Nodium	18
1.2.2	Paranodium	19
1.2.3	Paranodale Proteine	20
1.2.4	Juxtaparanodium	23
1.2.5	Pathophysiologie der Antikörper am Schnürring	24
1.2.6	Nodo-Paranodopathien als eigene Entität.....	25
1.2.7	Studienlage zu Autoantikörpern	26
1.3	Aufbau von Immunglobulinen	31
1.3.1	IgG	31
1.3.2	IgM	35
1.4	Das Komplementsystem	36
1.4.1	Aktivierung.....	37
1.4.2	Endstrecke und Zellyse.....	37
1.4.3	Rolle des Komplementsystems bei entzündlichen Neuropathien	39
1.5	Ziele der Arbeit	41
2	Material und Methoden	42
2.1	Materialauflistung.....	42
2.2	Patientengruppe und Kontrollgruppe	50
2.2.1	Fallzahlberechnung	50

2.2.2	Probengewinnung.....	51
2.2.3	Patientenkohorte	51
2.2.4	Kontrollen	52
2.2.5	Klinische Daten.....	52
2.2.6	Statistik und Graphiken.....	52
2.3	Methoden	53
2.3.1	Mäusezupfnerven	53
2.3.2	ELISA	54
2.3.3	Komplementbindungsassay mit C1q.....	59
2.3.4	ELISA mit IVIG Zugabe	61
2.3.5	ELISA mit Fab Fragmenten	64
2.3.6	KBA mit IVIG Zugabe	65
2.3.7	HEK-293-Zellkultur	67
2.3.8	LDH-Zytotoxizitäts-Assay.....	74
3	Ergebnisse.....	78
3.1	Detektion paranodaler Autoantikörper.....	78
3.1.1	Ergebnisse mittels Neurofascin-ELISA	78
3.1.2	Ergebnisse an Mäusezupfnerven.....	79
3.2	Bestimmung der Subklasse und Titer mittels ELISA	82
3.3	Anpassung der Verdünnung an den Neurofascin-IgG Titer und Subklassenbestimmung	83
3.4	Detektion von Autoantikörpern gegen Contactin-1	86
3.5	Bestätigungstests an HEK-Zellen	88
3.6	Komplementbindung durch NF-155-Autoantikörper	90
3.6.1	ELISA-basiertes Verfahren	90
3.6.2	HEK-Zell-basiertes Verfahren	99
3.7	Effekte von IVIG	101
3.7.1	Kein Effekt von IVIG auf die Antikörperbindung	101

3.7.2	Reduktion der durch Anti-NF-155 Autoantikörper induzierten Komplementablagerung durch IVIG	106
3.8	Untersuchungen der Zytotoxizität an HEK-Zellen.....	111
3.8.1	Effekte von Transfektion und Inkubation mit Serum.....	111
3.8.2	Komplement-abhängige Zellyse.....	111
3.8.3	Effekte von IVIG auf die Zellyse	115
3.9	Klinische Merkmale der Patienten/Patientinnen	121
3.9.1	Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen NF-155.....	121
3.9.2	Zusammenfassung der klinischen Merkmale	132
3.9.3	Patienten mit Autoantikörpern gegen Contactin-1	133
4	Diskussion	136
4.1	Evaluation der diagnostischen Methoden	137
4.2	Klinischer Phänotyp der NF-155-assoziierten Paranodopathie	138
4.3	Einfluss der IgG Subklasse.....	140
4.4	Komplementaktivierung als Teil des Pathomechanismus.....	141
4.5	Effekte von IVIG	143
4.6	Komplementkaskade als therapeutisches Ziel	146
4.7	Ausblick	147
5	Abstract	149
6	Zusammenfassung	151
7	Literaturverzeichnis.....	153
8	Abbildungsverzeichnis	172
9	Tabellenverzeichnis	174
10	Abkürzungsverzeichnis	176
11	Anhang.....	180

1 Einleitung

1.1 Inflammatorische Polyneuropathien

1.1.1 Definition, Unterteilung, Epidemiologie

Bei den inflammatorischen Polyneuropathien (PNP) handelt es sich um Erkrankungen des peripheren Nervensystems (PNS) mit autoimmuner Genese. Hierbei kann zwischen akuten Formen wie beispielsweise dem Guillain-Barré Syndrom (GBS) und subakut bis chronischen Formen wie der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) unterschieden werden. Des Weiteren zählt die vaskulitische Polyneuropathie zu den chronisch inflammatorischen Polyneuropathien (Glocker et al., 2020). Hierbei wird eine Polyneuropathie als chronisch deklariert, wenn der Krankheitsverlauf über acht Wochen andauert, während die akuten Formen sich innerhalb von vier Wochen entwickeln und der subakute Verlauf mit vier bis acht Wochen dazwischen liegt (Said & Krarup, 2013; Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019).

1.1.1.1 Akute Formen

Bei den akuten inflammatorischen Polyneuropathien ist insbesondere das GBS als rasch progrediente Polyradikuloneuropathie mit aufsteigenden Paresen, symmetrischem Befall, autonomen Dysfunktionen und monophasischem Verlauf zu nennen (Hahn, 1996). Die jährliche Inzidenz beträgt zwischen 0,8 bis 1,9 pro 100.000 Einwohnern in Europa und Nordamerika und steigt mit zunehmendem Alter (Bogliun et al., 2004; McGrogan et al., 2009; Sejvar et al., 2011). Männer scheinen in einem Verhältnis von 3:2 häufiger von der Erkrankung betroffen zu sein als Frauen (R. A. Hughes & Cornblath, 2005; Sejvar et al., 2011). In über 70 Prozent der Fälle ist eine circa drei Wochen vorangehende Infektion mit insbesondere pulmonalem oder gastrointestinalem Fokus zu eruieren, wobei 25 Prozent der GBS Patienten/Patientinnen mit *Campylobacter jejuni* in der Vorgeschichte infiziert sind (R. A. Hughes & Cornblath, 2005; Sudulagunta et al., 2015; McGrogan et al., 2009). Insgesamt scheint das Risiko an einem GBS zu erkranken nach einer *Campylobacter* Enteritis mit unter 2 von 10.000 Fällen eher gering zu sein (Tam et al., 2006). Als weitere Erreger kommen außerdem *Mykoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* B, Zytomegalievirus, Influenza und möglicherweise auch Covid-19 in Frage (Sedaghat & Karimi, 2020; van Doorn, Ruts, & Jacobs, 2008). In Lateinamerika wurde in Zusammenhang mit Arbovirusausbrüchen wie dem Zikavirus

oder Chikungunyavirus eine deutliche Erhöhung der Inzidenz des GBS beobachtet (Capasso, Ompad, Vieira, Wilder-Smith, & Tozan, 2019). Es werden vier Subgruppen des GBS unterschieden: akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikulneuropathie (AIDP) mit demyelinisierendem Muster in der Elektrophysiologie, die beiden Subtypen mit axonalem Befallsmuster akute motorische axonale Neuropathie (AMAN) und akute motorische und sensorische axonale Neuropathie (AMSAM) sowie das Miller-Fisher-Syndrom (MFS) mit okulomotorischer Beteiligung, Areflexie und Ataxie (McGrogan et al., 2009). In Nordamerika und Europa ist die AIDP mit über 90 Prozent der prädominante Subtyp und nur rund fünf Prozent der Erkrankten ist von den axonalen Subtypen betroffen, während in Japan und China die axonalen Subtypen 30 bis 47 Prozent der GBS Fälle ausmachen (R. A. Hughes & Cornblath, 2005).

1.1.1.2 Chronische Formen

Hauptvertreter dieser Gruppe ist die CIDP mit einer stark variierenden Prävalenz von 1 bis 9 pro 100.000 Einwohnern und einer Inzidenz zwischen 0,5 und 1,6 von 100.000 pro Jahr (Iijima et al., 2008; Merkies et al., 2019; Rajabally et al., 2009; Laughlin et al., 2009; McLeod et al., 1999). Es zeigt sich eine männliche Prädominanz, ein medianes Alter von 58 Jahren bei Erstdiagnose sowie eine Peak Prävalenz von 40 bis 60 Jahren (Laughlin et al., 2009). Die CIDP kann sowohl rezidivierend als auch progredient auftreten mit proximaler und/oder distaler Beteiligung sensibler sowie motorischer Nerven und symmetrischem Verteilungsmuster (Mathey et al., 2015). Es wird eine autoimmune Genese mit resultierender Demyelinisierung und sekundärer axonaler Schädigung vermutet, wobei die Variation des klinischen Phänotyps die Aufklärung der Pathogenese erschwert und eine Unterteilung in verschiedene Entitäten nahelegt (Mathey et al., 2015). In 94 Prozent der Fälle präsentiert sich die CIDP mit motorischen Defiziten und in 89 Prozent mit Beteiligung sensibler Nerven (Said & Krarup, 2013). Zur Diagnose einer CIDP werden die EAN-/PNS-Kriterien der European Academy of Neurology/ Peripheral Nerve Societies herangezogen (Van den Bergh et al., 2021). Da die Studie von Dezember 2018 bis Januar 2020 durchgeführt wurde, werden die Kriterien von 2010 verwendet, die im Weiteren näher erläutert werden (Van den Bergh et al., 2010).

Hiervon abzugrenzen ist die A-CIDP, eine chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie mit akutem Beginn, die schwierig von einem GBS zu differenzieren ist. Hierbei kommt es in den ersten vier Wochen zu einem ähnlichen klinischen Phänotyp, der jedoch bei der A-CIDP nach acht Wochen weiter fortschreitet (Alessandro et al., 2018). Insbesondere die Unterscheidung zwischen A-CIDP und GBS

mit therapiebezogener Verschlechterung der Symptomatik (GBS-TRF: treatment-related fluctuation) kann Schwierigkeiten bereiten. Die Differenzierung zwischen den beiden Formen ist jedoch enorm wichtig aufgrund der unterschiedlichen Prognose sowie des Therapieansprechens. Häufig sind die GBS Erkrankten schwerer betroffen und zeigen eine Beteiligung der Hirnnerven sowie respiratorische Komplikationen. Die Therapie eines GBS besteht vorwiegend aus der Gabe von IVIG oder Plasmapherese, während CIDP-Erkrankte oft eine langwirksame immunsuppressive Therapie, unter anderem mit Steroiden, benötigen (Alessandro et al., 2018). Fünf Prozent der Erkrankten mit der initialen Diagnose eines GBS sind eigentlich an einer A-CIDP erkrankt, während 16 Prozent der CIDP-Patienten/-Patientinnen einen GBS-artigen Erkrankungsbeginn zeigen (McCombe et al., 1987; Patnaik et al., 2021; Ruts et al., 2010).

Als CIDP-Variante wird die distale erworbene demyelinisierende symmetrische Neuropathie (distal acquired demyelinating symmetric neuropathy, DADS) beschrieben, die vor allem distale sensible Nerven symmetrisch betrifft und in 50 bis 70 Prozent mit Anti-MAG Antikörpern assoziiert ist (Saperstein et al., 2001).

Als eine weitere CIDP-Variante lässt sich außerdem durch das Vorhandensein sensibler Defizite die multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie (multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy, MADSAM) abgrenzen, auch Lewis-Sumner-Syndrom genannt, die ebenfalls ein asymmetrisches und multifokales Verteilungsmuster aufweist und dadurch von der typischen CIDP unterschieden werden kann (Katz & Saperstein, 2001). Ähnlich wie bei der multifokalen motorischen Neuropathie (MMN) sind initial insbesondere die Hände betroffen, allerdings schreitet die MADSAM innerhalb von Monaten schneller voran, während der Verlauf der MMN oft Jahre andauert (Oh, Claussen, & Kim, 1997). Die MADSAM spricht auf eine Therapie mit Steroiden und IVIG an (Katz & Saperstein, 2001).

Im Gegensatz zur CIDP handelt es sich bei der MMN um eine PNP mit rein motorischen Defiziten und asymmetrischem Verteilungsmuster (Katz & Saperstein, 2001). Diese bildet eine eigene Entität neben der CIDP. Typischerweise ist die Handregion stark von der motorischen Schwäche betroffen. In 40 bis 50 Prozent der Fälle können Anti-GM1 IgM-Antikörper im Serum der MMN Erkrankten nachgewiesen werden. Steroide führen bei der MMN nicht zu einer Besserung, während eine Therapie mit IVIG erfolgsversprechend ist (Kaji, Shibasaki, & Kimura, 1992).

1.1.2 Pathophysiologie

Die Pathogenese der inflammatorischen Neuropathien kann sowohl durch humorale als auch zelluläre Prozesse erklärt werden (Mathey et al., 2015). Der Demyelinisierung peripherer Nerven beim GBS liegen vermutlich durch molekulares Mimicry der pathogenen Antigene der Erstinfektion entstandene Antikörper zugrunde, die mit Myelinbestandteilen und Gangliosiden kreuzreagieren (van den Berg et al., 2014). Hierbei scheint die vorangegangene bakterielle oder virale Infektion als antigener Stimulus für die Entwicklung von autoimmunen Antikörpern zu wirken, die daraufhin durch Kreuzreaktion mit Epitopen peripherer Nerven zu Demyelinisierung und axonalem Verlust führen können (Sejvar, Baughman, et al., 2011). Die Entstehung der gangliosidähnlichen Strukturen hängt hierbei von einer Reihe von polymorphen Genen und Enzymen der verschiedenen *C. jejuni* Stämme ab (van Belkum et al., 2001). Neben den Antikörpern gegen Gangliosidstrukturen scheint in einem Mausmodell bei AMAN auch die Aktivierung des Komplementsystems zu weiterer Schädigung peripherer Nerven beizutragen (McGonigal et al., 2010). Die Komplementaktivierung führte zur Destabilisierung des paranodalen Komplexes und der Schwannzellmikrovilli der Ranvier-Schnürringe des peripheren Nerven (van den Berg et al., 2014). Beim GBS wurden Rezidivraten von bis zu fünf Prozent beschrieben. Insbesondere bei jüngeren Patienten/Patientinnen mit milden Symptomen, können auch individuelle Faktoren, wie genetische Polymorphismen, das Risiko der Kreuzreaktivität erhöhen (Grand'Maison et al., 1992; Kuitwaard et al., 2009). Zu deren Erforschung werden noch zukünftige genomweite Assoziationsstudien benötigt.

Bei der CIDP wirken Prozesse auf humoraler und zellulärer Ebene zusammen zu peripheren Nervenschädigungen (Mathey et al., 2015). Die Theorie der autoimmunen Genese wird zudem durch das Ansprechen auf Therapiemöglichkeiten wie IVIG, Plasmapherese und Kortikosteroide sowie den Nachweis einer Immunantwort in Form von Immunzellen und Mediatoren im Blut, Liquor und an peripheren Nerven begründet (Kieseier et al., 2002; Press et al., 2003). Im Falle einer Aktivierung des Immunsystems können T-Zellen die sonst abgedichtete Blut-Nerven-Schranke überqueren und durch Steigerung der Permeabilität dieser und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine zur Invasion weiterer Immunzellen beitragen (Mathey et al., 2015). Infiltrierende Makrophagen können selbst proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und IL-12 ausschütten und durch Phagozytose der Schwann-Zellen, sowie Elongation und Verschieben der Myelinlamellen, wesentlich zur Demyelinisierung peripherer Nervenfasern beitragen (Kiefer et al., 2001; Vital et al., 2000). Außerdem

scheinen Makrophagen eine duale Rolle zu spielen und nicht nur die Inflammation zu steigern, sondern auch wesentlich an der Remyelinisierung und Proliferation der Schwann Zellen beteiligt zu sein (Kiefer et al., 2001). Zudem führt die Durchlässigkeit der Blut-Nerven-Schranke zu neuronaler Inflammation und Demyelinisierung peripherer Nerven, welche durch Gadolinium-Anreicherung und Signalintensitätsschwankungen in Magnetresonanzaufnahmen dargestellt werden kann (Kuwabara et al., 1997). An Nervus Suralis Biopsien bei CIDP-Erkrankten fielen unter anderem Demyelinisierung, axonale Degenerationen sowie perivaskuläre oder endoneurale Infiltration von Makrophagen oder CD8- und CD4-positiven-T-Zellen auf (Schneider-Hohendorf et al., 2012; Sommer et al., 2005). Darüber hinaus konnten in Nervenbiopsien bereits Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren beobachtet werden, welche die Theorie der humoralen Pathogenese unterstützen (Dalakas & Engel, 1980). Ein Zielantigen der autoimmunen Attacke ist hingegen nicht umfassend bekannt, allerdings wurden in einigen Publikationen Autoantikörper gegen nodale, paranodale und juxtapanodale Strukturen beschrieben, die detailliert in Kapitel 1.2.7 aufgeführt werden (Mathey et al., 2017; Uncini, Susuki, & Yuki, 2013).

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Während die CIDP meist schubförmig, rezidivierend oder schleichend progredient verläuft, entwickelt sich das GBS in der Regel monophasisch über vier Wochen (McCombe, Pollard, & McLeod, 1987). Die Schädigung motorischer Nerven bei den Autoimmunneuropathien zeigt sich, als Zeichen eines peripheren Schadens, als schlaffe Paresen. Bei der CIDP und dem GBS zeigen sich sowohl distal als auch proximal motorische Schäden, wobei es beim GBS typischerweise innerhalb von Stunden bis Tagen zu symmetrisch aufsteigenden Paresen, beginnend an der unteren Extremität, kommt (Sudulagunta et al., 2015). Der Nadir wird beim GBS in 50 Prozent nach zwei Wochen und in 80 Prozent nach drei Wochen erreicht, wobei die Schwere von milden Paresen bis zur Plegie reichen kann (Asbury & Cornblath, 1990). Im Verlauf kann es zu Muskelatrophie und Verlust der Gehfähigkeit kommen. Die Patienten/Patientinnen mit einem GBS sind meist schwer betroffen und 25 bis 38 Prozent werden im Verlauf aufgrund respiratorischer Insuffizienz maschinell beatmet (Sudulagunta et al., 2015; van den Berg et al., 2014). Bei beiden Formen sind die motorischen Defizite in der Regel ausgeprägter als die sensiblen, die sich in Form von Kribbelparästhesien, Thermhypästhesien, Pallhypästhesien und Beeinträchtigung der Propriozeption zeigen

können (Gorson, Allam, & Ropper, 1997; McCombe et al., 1987). Neuropathische Schmerzen zeigen sich bei 20 Prozent der CIDP-Erkrankten (McCombe et al., 1987). Häufig wird zudem ein Verlust der Muskeleigenreflexe, im Sinne einer globalen Areflexie, auffällig. Eine Hirnnervenbeteiligung findet sich vor allem beim GBS mit 35 bis 50 Prozent häufig und präsentiert sich in der Hälfte der Fälle als eine bilaterale asymmetrische Fazialisparese (Asbury & Cornblath, 1990; Sudulagunta et al., 2015). Bei der CIDP ist die Beteiligung kranialer Nerven in circa 16 Prozent der Fälle zu beobachten (McCombe et al., 1987). Zudem können, insbesondere beim GBS, schwere vegetative Symptome wie kardiopulmonale Insuffizienz, Tachykardie und kardiale Arrhythmien in den Vordergrund treten (Asbury & Cornblath, 1990). Bei der CIDP ist eine autonome Dysfunktion in der Regel mild und begrenzt ausgeprägt, im Sinne einer distalen, postganglionären Neuropathie (Figuroa et al., 2012). Weitere Symptome wie neuropathische Schmerzen, Tremor und Ataxie können zudem auftreten (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019).

Die Prognose des GBS ist aufgrund der vegetativen und respiratorischen Komplikationen sehr variabel und weist eine Mortalitätsrate von drei bis zehn Prozent auf (Hahn, 1996; van Doorn et al., 2008). Zudem zeigen 20 Prozent der GBS Erkrankten nach sechs Monaten noch eine Gangunfähigkeit. Neuropathische Schmerzen sowie Dysästhesien, Fatigue und Meningismus können bei etwa 89 Prozent als Residuen der Erkrankung für Monate oder Jahre persistieren (van Doorn et al., 2008).

1.1.4 Diagnosekriterien

Die Diagnostik einer Polyneuropathie besteht aus gründlicher Anamnese und klinischer neurologischer Untersuchung, Elektrophysiologie, Liquoruntersuchung, Sonographie und gegebenenfalls Zusatzdiagnostik wie genetischer Testung. Mithilfe der elektrophysiologischen Diagnostik wird angestrebt, das Verteilungsmuster (symmetrisch/asymmetrisch) sowie die Form der Nervenschädigung zu eruieren (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019). Bei axonalen Polyneuropathieformen steht in der Elektroneurographie eine Reduktion der Amplitude der Summenaktionspotenziale im Vordergrund, während bei demyelinisierenden Polyneuropathien, wie der AIDP und CIDP, insbesondere eine Reduktion der motorischen und sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit, eine Verlängerung der distalen motorischen Latenz (dML) sowie der F-Wellen-Latenz zu beobachten ist (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019). Des Weiteren sind ein F-

Wellen Verlust und eine zeitliche Dispersion sowie partielle Leitungsblöcke charakteristisch für eine demyelinisierende Polyneuropathie (Jaspert & al., 1995). Eine Lumbalpunktion zur Liquordiagnostik stellt eine fakultative Untersuchung dar, die allerdings bei erhöhten Eiweißwerten von über 0,6 g/l und normaler Zellzahl, im Sinne einer zytalbuminären Dissoziation, Hinweise auf eine AIDP oder CIDP geben kann (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019). Eine Biopsie des Nervus suralis ist nur bei schwerer PNP mit unzureichenden Ergebnissen der nicht-invasiven Untersuchungen indiziert und, insbesondere aufgrund einer Therapiekonsequenz, bei Verdacht auf vaskulitische Genese zu überlegen (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019).

Das GBS wird anhand der unten aufgeführten Brighton Kriterien diagnostiziert und je nach diagnostischer Sicherheit in drei Level eingeteilt, wobei Level 1 die höchste diagnostische Validität besitzt (Goodfellow & Willison, 2016). Hierbei müssen alle Punkte des jeweiligen Levels zutreffen.

Brighton Diagnosekriterien GBS
<p>Level 1 der diagnostischen Sicherheit: alle zutreffend</p> <ul style="list-style-type: none"> • bilaterale und schlaffe Lähmung • verminderte oder erloschene Achillessehnenreflexe • monophasischer Verlauf, Zeitraum von Beginn bis Höhepunkt 12 Stunden bis 28 Tage mit anschließender klinischer Plateauphase • elektrophysiologische Befunde passend zum GBS: siehe unten • zytalbuminäre Dissoziation im Liquor: Zellzahl < 50/μl, Eiweiß über Normwert • Fehlen einer alternativen Diagnose für die Parese
<p>Level 2 der diagnostischen Sicherheit: Level 1 mit Ausnahme Liquorbefund</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zellzahl im Liquor <50/μl oder nicht durchgeführt
<p>Level 3 der diagnostischen Sicherheit: Level 1 und</p> <ul style="list-style-type: none"> • elektrophysiologische und liquorzytologische Befunde fehlend/negativ

Elektrophysiologische Diagnosekriterien anhand der Subtypen

1. AIDP

mindestens eines der folgenden Kriterien an zwei Nerven oder mindestens zwei Kriterien an einem Nerven, wenn die anderen Nerven nicht erregbar sind und das distale SAP > 10% LLN liegt

- NLG < 90% LLN
- distal motorische Latenz > 110% ULN
- Amplitudenverhältnis proximales SAP zu distalem SAP < 0,5 und distales SAP > 20% LLN
- F-Wellen Latenz > 120% des ULN

2. AMSAN

keine der Eigenschaften der AIDP unter 1.

- demyelinisierendes Muster, wenn distales SAP < 10% LLN
- und SNAP < 10% LLN

3. AMAN

keine der Eigenschaften der AIDP unter 1.

- demyelinisierendes Muster, wenn distales SAP < 10% LLN
- SNAP normwertig

Tabelle 1: Brighton Kriterien zur Diagnose eines Guillain-Barré-Syndroms (Sejvar & al., 2011). Abkürzungen: AIDP = akut inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie; AMAN= akut motorisch axonale Neuropathie; AMSAN= akute motorisch sensible axonale Neuropathie; LLN= lower limit of normal, unterer Grenzwert; NLG= Nervenleitgeschwindigkeit; SAP= Summenaktionspotential; SNAP= sensibles Nervenaktionspotential; ULN= upper limit of normal, oberer Grenzwert (Gesellschaft für Neuropädiatrie, awmf Leitlinie 2019).

Eine CIDP wird anhand bestimmter Kriterien der European Academy of Neurology/ Peripheral Nerve Societies EAN/PNS diagnostiziert (Van den Bergh et al., 2021). Da die Studie von Dezember 2018 bis Januar 2020 durchgeführt wurde, werden die EFNS-/PNS-Kriterien von 2010 verwendet, die im Weiteren näher erläutert werden (Van den Bergh et al., 2010).

Einschlusskriterien sind hier chronisch oder schubförmig progrediente oder remittierende, sich über acht Wochen entwickelnde symmetrische proximale und distale Paresen mit Beeinträchtigung der Sensibilität aller Extremitäten und fehlenden oder abgeschwächten Reflexen (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019).

Um eine definitive CIDP handelt es sich bei klinisch typischer oder atypischer CIDP mit einem der definitiven elektrophysiologischen Einschlusskriterien oder bei einer wahrscheinlichen CIDP (anhand elektrophysiologischer Kriterien) mit mindestens einem der unterstützenden Kriterien oder einer möglichen CIDP (anhand

elektrophysiologischer Kriterien) mit mindestens zwei unterstützenden Kriterien (EFNS & PNS, 2010). In den neuen EAN-/PNS-Kriterien aus dem Jahr 2021 wird der Begriff der atypischen CIDP durch den Begriff „CIDP Variants“ ersetzt und beschreibt gut zu differenzierende Formen der CIDP wie die distale, multifokale, fokale, motorische oder sensible CIDP. Außerdem werden bei den neuen Kriterien nur noch die definitive von der wahrscheinlichen Diagnose einer CIDP unterschieden. (Van den Bergh et al., 2021).

Elektrophysiologische und klinische EFNS-/PNS-Kriterien
Klinik: Typische CIDP Einschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • chronisch/schubförmig progredient/remittierend symmetrische proximale und distale Paresen mit Sensibilitätsdefiziten OE und UE • mindestens 8 Wochen • fehlende oder abgeschwächte Reflexe
Klinik: Atypische CIDP
<ul style="list-style-type: none"> • vorwiegend distal (DADS), asymmetrisch (MADSAM), Lewis Sumner Syndrom • fokal (Beteiligung Plexus brachialis ect), rein motorisch oder sensorisch
Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Borrelieninfektion, Diphtherie • hereditäre demyelinisierende PNP • Diagnose MMN • monoklonale Gammopathie mit Anti-MAG-Ak

Elektrophysiologische Einschlusskriterien

(1) Definitive Diagnose bei mindestens einem der folgenden

- Verlängerung der distal motorischen Latenz $\geq 50\%$ über ULN in mindestens 2 Nerven
- Reduktion motorischer NLG $\geq 30\%$ unter LLN in 2 Nerven
- Verlängerung F-Wellen Latenz $\geq 30\%$ ULN in 2 Nerven
- Fehlen F-Wellen in 2 Nerven falls distale SAP peaks $\geq 20\%$ LLN und ein anderer demyelinisierender Parameter in einem anderen Nerven
- partieller motorischer Leitungsblock: $\geq 50\%$ Reduktion der Amplitude des proximalen negativen SAP (verglichen mit distaler Stimulation), falls das distale negative SAP $\geq 20\%$ LLN in 2 Nerven oder in einem Nerven + mindestens einem anderen demyelinisierenden Parameter in mindestens einem anderen Nerven
- Abnorme zeitliche Dispersion, $> 30\%$ Zunahme zwischen proximalen und distalen negativen SAP-Peak in ≥ 2 Nerven
- Zunahme der Dauer des distalen SAP (Intervall zwischen Beginn des ersten negativen Peaks und Rückkehr zur Grundlinie des letzten negativen Peaks) in ≥ 1 Nerven

(2) Wahrscheinliche Diagnose bei

- $\geq 30\%$ Reduktion der Amplitude des proximalen negativen SAP-Peaks (verglichen mit distaler Stimulation, außer N. tibialis), falls distaler negativer SAP-Peak $\geq 20\%$ LLN in 2 Nerven oder in einem Nerven + ≥ 1 anderer demyelinisierender Parameter in \geq einem anderen Nerven

(3) Mögliche Diagnose bei

- vgl (1) nur in einem Nerven

Unterstützende Kriterien

- erhöhtes Liquoreiweiß bei einer Zellzahl im Liquor $< 10/\mu\text{l}$
- MR-tomographische KM-Anreicherung und/oder Hypertrophie der Cauda equina, lumbosakrale oder zervikale Nervenwurzeln oder Plexus brachialis/lumbosacralis
- normales SNAP N. suralis bei pathologischem SNAP N. medianus (Ausschluss Karpaltunnelsyndrom)
- sensible NLG $< 80\%$ LLN
- verzögerte somatosensorische Potenziale SSEP bei Ausschluss ZNS-Pathologie
- Histologischer Nachweis Demyelinisierung N. suralis

Tabelle 2: EFNS-/PNS-Kriterien von 2010 der CIDP Diagnose. Abkürzungen: KM= Kontrastmittel; LLN= lower limit of normal, unterer Grenzwert; MR= Magnetresonanztomogramm; NLG= Nervenleitgeschwindigkeit; OE= Obere Extremität; Peak=Maximum; SAP=Summenaktionspotential; SNAP= sensibles Nervenaktionspotential; SSEP=Sensible somatisch evozierte Potentiale; UE= Untere Extremität; ULN= upper limit of normal, oberer Grenzwert (Van den Bergh et al., 2010) (EFNS & PNS, 2010) (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019).

1.1.5 Therapiestrategien

Hauptziel der Therapiestrategien ist es, den inflammatorisch bedingten Schaden, im Besonderen den auf die Demyelinisierung folgenden axonalen Verlust, zu minimieren, sodass Reparaturprozesse der peripheren Nerven zum Tragen kommen, um Funktion und Lebensqualität der Patienten/Patientinnen zu verbessern (Muley & Parry, 2009). Immuntherapien wie intravenöse oder subkutane Immunglobuline und Glukokortikoide sowie Plasmaaustauschverfahren bei akuter Verschlechterung sind etablierte, therapeutische Möglichkeiten (Muley et al., 2020). Als Erstlinientherapie der CIDP stehen IVIG sowie Glukokortikoide als Pulstherapie oder in täglichen Gaben zur Verfügung (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S2e Leitlinie, 2018). Beim GBS wird sowohl eine Therapie mit IVIG als auch mit Plasmaphereseverfahren als gleichwertig angesehen. Zudem wird bei schweren Fällen des GBS eine intensivmedizinische Überwachung empfohlen (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S2e Leitlinie, 2018).

1.1.5.1 IVIG

IVIG steht für intravenöse Immunglobuline und besteht zu über 95 Prozent aus IgG Antikörpern, welche aus gepooltem Serum von tausenden Spendern gewonnen werden und eine der physiologischen Verteilung entsprechende Vertretung der IgG Subklassen aufweisen (Dalakas, 1997). Hierbei wird durch verschiedene Mechanismen sichergestellt, dass das Übertragungsrisiko viraler Infektionen minimiert wird (Buchacher & Iberer, 2006). Die Gabe von IVIG wurde erstmalig als Ersatztherapie bei verschiedenen primären Immundefekten eingesetzt (Chapel et al., 2000). Bei einem Kind mit Hypogammaglobulinämie und idiopathischer thrombozytopenischer Purpura führte der Einsatz von IVIG zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl (Imbach et al., 1981). Dieser Erkenntnis folgend, wurde IVIG für viele weitere Erkrankungen mit möglicher autoimmuner Genese eingesetzt und ist heute Bestandteil der Therapie des GBS, der CIDP oder einer MMN (Jacob & Rajabally, 2009). Als Hochdosistherapie wird IVIG in einer Konzentration von 1 bis 3g/kg Körpergewicht verabreicht, um einen antiinflammatorischen Effekt zu erzielen (Gelfand, 2006). Laut Leitlinie soll IVIG bei der CIDP und dem GBS in einer Gesamtdosis von 2g/kg Körpergewicht über zwei bis fünf Tage verteilt gegeben werden, gefolgt von einer Dosis von 1g/kg Körpergewicht alle drei Wochen auf ein bis drei Tage verteilt bei der CIDP (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S2e Leitlinie, 2018). In einer Metaanalyse von acht randomisierten Kontrollstudien mit insgesamt 332 Teilnehmern/Teilnehmerinnen konnte gezeigt

werden, dass IVIG im Vergleich zu Placebo den Grad der Behinderung für mindestens zwei bis sechs Wochen verbessert (Eftimov, Winer, Vermeulen, de Haan, & van Schaik, 2013). Eine der analysierten Studien mit Untersuchung des Langzeiteffekts ergab eine Verbesserung der Symptome mit Erhaltungsdosen von IVIG 1g/kg Körpergewicht alle drei Wochen über 24 bis möglicherweise 48 Wochen im Vergleich zu Placebo (R. Hughes, 2008). Die Zunahme der IgG-Konzentration wurde als unabhängiger Marker für das Therapieansprechen bei GBS-Erkrankten angenommen, wobei ein geringer IgG Anstieg zwei Wochen nach Therapiebeginn mit einer schlechteren Prognose assoziiert wurde (Kuitwaard, de Gelder, et al., 2009). Um die Pharmakokinetik von IVIG zu untersuchen, wurde der Delta-IgG Gehalt beschrieben, bei dem der prätherapeutische IgG Gehalt von dem Gesamt-IgG-Gehalt nach Therapiebeginn subtrahiert wurde. Ein Anstieg des Delta-IgG Gehalts des Serums bis zu maximalen Konzentrationen von 10,4 mg/ml (Gesamt-IgG-Gehalt 26 mg/ml) zwei Wochen nach Therapiebeginn mit IVIG wurde in einer Studie von Kuitwaard et al. beschrieben, wobei die Serumlevel in der Literatur allerdings interindividuell sehr unterschiedlich zu sein scheinen (Kuitwaard, de Gelder, et al., 2009; Vlam et al., 2014). In einer Studie von Vlam et al. konnte gezeigt werden, dass der Delta-IgG Gehalt bei Erkrankten mit gutem Ansprechen auf eine IVIG-Therapie höher ist als bei Erkrankten ohne Therapieansprechen. In dieser Studie war der Delta-IgG Gehalt fünf Tage nach IVIG Infusion am höchsten mit einem Mittelwert von 23,4 mg/ml (Vlam et al., 2014). In einer weiteren Studie wurde sogar ein Gesamt-IgG Gehalt von 50 mg/ml nach IVIG Therapie beschrieben (Sekul, Cupler, & Dalakas, 1994). Insgesamt kann von einem Serum Delta-IgG-Gehalt von 12 bis 25mg/ml unter IVIG Therapie ausgegangen werden (Kuitwaard, de Gelder, et al., 2009; Vlam et al., 2014). Der Mechanismus der antiinflammatorischen Effekte von IVIG ist noch nicht vollständig geklärt. Zwei Erklärungsmodelle führen diese Effekte auf die Fab2 oder die Fc-Fragmente von IgG zurück (Tackenberg, Nimmerjahn, & Lunemann, 2010). Für die Fc-abhängige Hypothese sprechen verschiedene Tiermodelle, bei denen die Fc-Region und nicht die Fab Fragmente an der Antikörper-vermittelten Inflammation beteiligt waren (Samuelsson, Towers, & Ravetch, 2001). Durch eine Blockierung der Fc-Rezeptoren oder eine Modulation der Expression inhibitorischer Fc-Rezeptoren kann IVIG Fc-vermittelte Effektorfunktionen, wie die Aktivierung der Komplementkaskade, sowie das Cross Linking der Fc γ -Rezeptoren und damit die Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden verhindern (Dalakas, 2002; Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Für die Fab2-abhängige Hypothese wurden zwei mögliche Effekte beschrieben: Die Fab2 können die Anaphylatoxine der Komplementkaskade neutralisieren und spezifische IgG-

Antikörper im IVIG-Gemisch können selbst Proteine oder Zelloberflächenmoleküle binden und darüber antiinflammatorisch wirken (Dalakas, 2002; Nimmerjahn & Ravetch, 2008). IVIG entfaltet zudem eine Wirkung über die Interaktion mit der Komplementkaskade. Die Hauptwirkung der Komplementinhibierung von IVIG wird vermutlich über eine Komplexbildung mit Komplementkomponenten, insbesondere C3b, und folglich Inhibierung der C3 und C5 Konvertase erreicht (Basta & Dalakas, 1994; Dalakas, Alexopoulos, & Spaeth, 2020). Darüber hinaus kann IVIG über eine Bindung an C1q die Aktivierung der Komplementkaskade, induziert durch pathologische Antikörper, verhindern (Dalakas, Alexopoulos, & Spaeth, 2020).

1.1.5.2 Glukokortikoide

Laut Leitlinie sollen Kortikosteroide in der Therapie der CIDP als Steroidpulstherapie in einer Dosis von 0,5 bis 1 g/d über drei bis fünf Tage verteilt gegeben werden, da die Pulstherapie weniger cushinoide Nebenwirkungen, sowie einen schnelleren Therapieeffekt erzielt (Press, Hiew, & Rajabally, 2016; van Schaik et al., 2010). Anschließend wird die Umstellung auf ein orales Prednisolonderivat in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht mit langsamer Reduktion, sowie die Wiederholung der Methylprednisolonpulse von 0,5 bis 1 g/d über drei Tage alle vier Wochen empfohlen (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S2e Leitlinie, 2018).

1.1.5.3 Plasmapherese

Durch Plasmapherese können schädliche Bestandteile, wie beispielsweise Antikörper, welche die Genese der inflammatorischen Polyneuropathien erklären können, aus dem Blut entfernt werden (Mehndiratta et al., 2015). Die Prozedur führt vor allem zu einer signifikanten, kurzzeitigen Verbesserung der klinischen Symptomatik der Patienten/Patientinnen, meist gefolgt von erneuter Verschlechterung der Symptome, weshalb diese Therapieform insbesondere bei akuter Verschlechterung in der Klinik Anwendung findet (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S2e Leitlinie, 2018; Mehndiratta et al., 2015).

1.1.5.4 Rituximab

Bei Rituximab handelt es sich um einen chimären monoklonalen Antikörper gegen das Antigen CD20 auf normalen und malignen B-Lymphozyten, der unter anderem in der Therapie des B-Zell Lymphoms angewandt wird (Smith, 2003). Rituximab führt über Antikörper und Komplement-vermittelte Zytotoxizität zu einer bis zu 90-prozentigen peripheren B-Zell Depletion bei Patienten/Patientinnen mit Lymphomen innerhalb von

drei Tagen (Onrust, Lamb, & Balfour, 1999). Somit werden die Antikörperproduzierenden B-Zellen reduziert, was folglich zum Abfall von Antikörpertitern führt (Renaud et al., 2003). B-Zell-depletierende Therapieverfahren mit Rituximab waren zudem auch bei zentralen Demyelinisierungserkrankungen wie Multipler Sklerose und Neuromyelitis optica, sowie bei Anti-MAG assoziierter Neuropathie effizient (Myhr, Torkildsen, Lossius, Bo, & Holmoy, 2019; Renaud et al., 2003). Im Falle von Therapierefraktarität der CIDP kann auf alternative Therapiestrategien wie Rituximab zurückgegriffen werden (Querol et al., 2015). Hierbei scheinen vor allem immunvermittelte Krankheiten mit prädominanter IgG4 Subklasse, sowie weitere autoimmune Prozesse auf eine Rituximab vermittelte B-Zell Depletion anzusprechen (Benedetti et al., 2011; T. Roux et al., 2018). Insbesondere Immunneuropathien mit Antikörpern gegen paranodale Proteine wie Neurofascin-155, Contactin-1 und Caspr-1 sollen zugänglich sein für Rituximabtherapieversuche und zeigen in einer Studie eine Klasse 4 Evidenz (Querol et al., 2015). In einer retrospektiven Studie von Muley et al. konnte gezeigt werden, dass Rituximab in einer Kohorte mit Erstlinientherapie-refraktärer idiopathischer CIDP ohne nodo-paranodale Autoantikörper zu einer signifikanten Verbesserung der motorischen Funktion sowie zu einer Reduktion von Behinderung führt. Die Effektivität von Rituximab ist hierbei vermutlich aufgrund des geringeren Grades an axonalem Verlust bei kurzer Krankheitsdauer am größten (Muley et al., 2020).

1.1.5.5 Mögliche zukünftige Therapieoptionen

Neben den oben aufgeführten etablierten Therapiestrategien gibt es weitere Therapeutika, die möglicherweise in der Zukunft eine vielversprechende Therapie der Nodo-Paranodopathien darstellen.

Neben dem CD-20-Antikörper Rituximab gibt es weitere B-Zell-depletierende Therapieoptionen, die insbesondere in der Therapie der IgG4-assoziierten Erkrankungen eine Rolle spielen könnten (Dalakas, 2022). Zahlreiche andere CD-20-Antikörper wie Ocaratuzumab, Ocrelizumab und Veltuzumab sind in der Erforschung oder werden bereits in Studien, vor allem zur Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie CLL, getestet und könnten auch bei anderen Erkrankungen Anwendung finden (Alexopoulos, Biba, & Dalakas, 2016; Robak, 2015). Ocrelizumab ist ein humanisierter monoklonaler Anti-CD-20-Antikörper, der bereits in der Behandlung der primär progredienten sowie der schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose eingesetzt wird (Cellerino et al., 2021). Außerdem werden in Phase-3-Studien bereits

die Anti-CD-19 Antikörper Inebilizumab sowie Obexelimab (XmAb5871) bei IgG-4-assoziierten Erkrankungen erforscht. Inebilizumab wurde bereits bei der Therapie der Neuromyelitis-optica-Spektrums-Erkrankungen (NMOSD) zugelassen und kann die Schubfrequenz reduzieren (Cree et al., 2019). Insbesondere bei Erkrankungen, bei denen Rituximab Therapieerfolge zeigte, könnte der Einsatz anderer B-Zell-depletierender Verfahren vielversprechend sein (Alexopoulos et al., 2016).

Nennenswert ist zudem an dieser Stelle der im Jahre 2007 als Orphan-Arzneimittel zugelassene Anti-C5-Antikörper Eculizumab (Soliris; Alexion Pharmaceuticals Inc., Cheshire, CT, USA). Eculizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper vom IgG-Typ, der mit hoher Affinität und Spezifität den Komplementfaktor C5 der terminalen Endstrecke bindet. Dadurch wird die enzymatische Spaltung von C5 in C5a und C5b sowie die Formierung des Membranangriffskomplexes und die C5a-induzierte Chemotaxis von proinflammatorischen Zellen inhibiert (Muppidi et al., 2019; Rother et al., 2007). Die Zulassung des Antikörpers erfolgte zur Therapie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie, PNH. Hierbei handelt es sich um eine hämatopoetische Erkrankung, bei der eine somatische Mutation zu einem Verlust an CD59, einem Inhibitor der terminalen Komplementkaskade, auf der Oberfläche von Erythrozyten führt. Infolgedessen kommt es zu einer komplementvermittelten intravaskulären Hämolyse (Rother et al., 2007). Das Dosierschema bei der Behandlung der PNH besteht, laut Angaben des Herstellers Alexion, aus einer Induktionsphase mit wöchentlicher intravenöser Gabe von 600mg Eculizumab für vier Wochen und folgender Erhaltungsphase mit zweiwöchentlicher intravenöser Gabe von 900mg Eculizumab (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Soliris 300mg Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, Alexion Europe SAS, Rote Liste Service GmbH, Fachinfo-Service). Inzwischen ist der Antikörper auch zur Behandlung des atypischen Hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) zugelassen, das in 40 bis 60 Prozent der Fälle auf Mutationen des alternativen Aktivierungsweges der Komplementkaskade mit folgender Instabilität der Konvertase C3 zurückzuführen ist (Bresin et al., 2013). Häufig sind unter anderem Mutationen der Negativregulatoren des Komplementsystems, wie Faktor-H (CFH) sowie Faktor-I (CFI), des Membran-Kofaktor-Proteins (MCP) oder des C3, die in fehlender Inaktivierung des Komplementfaktors C3b resultieren (Loirat, Noris, & Fremeaux-Bacchi, 2008).

Des Weiteren konnte in der PREVENT Studie (NCT01892345) gezeigt werden, dass Eculizumab bei den NMOSD mit IgG Autoantikörpern gegen Aquaporin-4 die

Schubfrequenz senken kann (Pittock et al., 2021). Experimentelle Daten unterstützen die These, dass die Komplementaktivierung nach Autoantikörperbindung an Aquaporin-4 zur Pathogenese der Erkrankung beiträgt, die im Folgenden zur Inflammation des ZNS und zu Demyelinisierung führt (Asavapanumas, Tradtrantip, & Verkman, 2021).

Außerdem scheint insbesondere die Pathogenese der generalisierten Myasthenia gravis (MG) mit der Autoantikörper-mediierten Komplementaktivierung und folglich Zerstörung der motorischen Endplatte mit Reduktion der Acetylcholin- und Natriumkanalrezeptoren assoziiert zu sein, sodass Therapieoptionen, die das Komplementsystem inhibieren, eingesetzt werden können (Conti-Fine, Milani, & Kaminski, 2006). In einer Phase-2-Studie konnte gezeigt werden, dass Eculizumab zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptome bei therapierefraktärer Acetylcholin-Antikörper positiver MG beiträgt (Howard et al., 2017; Levine, 2019). Bei der Studie handelt es sich um die sechsmonatige randomisiert-kontrollierte REGAIN Studie (NCT01997229), in der Eculizumab gegen Placebo in einer Kohorte mit Acetylcholinrezeptor-positiver MG getestet wurde. In der Testgruppe, die Eculizumab erhalten hat, zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Muskelkraft, der Funktionalität sowie der Lebensqualität bei gleichzeitig guter Verträglichkeit (Muppidi et al., 2019). Im Gegensatz zur Placebogruppe zeigte sich unter der Therapie mit Eculizumab eine geringere krankheitsspezifische Hospitalisierungsrate sowie eine reduzierte Rate an Exazerbationen der MG. Zudem gibt es überzeugende Daten zu Langzeiteffekten unter einer Eculizumabtherapie (Muppidi et al., 2019). Eine der Hauptnebenwirkungen des Antikörpers ist die Beeinträchtigung des Immunsystems mit daraus resultierender erhöhter Anfälligkeit für Infektionen mit Meningokokkenstämmen wie *Neisseria* spp., sodass die prophylaktische Impfung gegen verschiedene Meningokokken Serotypen sowie die Erwägung einer Chemoprophylaxe vor einem Therapieversuch essenziell sind (Benamu & Montoya, 2016). In den oben aufgeführten kontrollierten Studien schienen Infektionen der Eculizumabgruppe nicht signifikant erhöht zu sein, während als häufigste Nebenwirkungen Kopfschmerzen und Pharyngitis auftraten (Howard et al., 2017). Zur Therapie des atypischen HUS, der NMOSD oder der refraktären MG wird laut Hersteller Alexion eine vierwöchige Induktionsphase mit wöchentlicher intravenöser Gabe von 900mg Soliris, gefolgt von einer Erhaltungsphase mit intravenöser Gabe von 1.200mg Soliris alle zwei Wochen empfohlen (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Soliris 300mg Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, Alexion Europe SAS, Rote Liste Service GmbH, Fachinfo-Service).

Bei seltenen Fällen neurologischer Erkrankungen wurde eine Mutation von CD59 beschrieben, bei der die Patienten/Patientinnen eine akute motordominante demyelinisierende Polyneuropathie mit rezidivierenden Episoden und sekundär axonalem Schaden erleiden, die einem wiederkehrenden GBS oder einer CIDP sehr ähneln (Karbian et al., 2018). Eine Therapie mit Eculizumab wurde in diesen Fällen als wirksam beschrieben (Mevorach et al., 2016). Darüber hinaus wurde der Effekt von Eculizumab in einer multizentrischen, verblindeten Placebo-Kontroll-Studie bei GBS Erkrankten erforscht. Hier wurde eine Therapie mit IVIG und Eculizumab mit einer Therapie mit IVIG und Placebo verglichen. In der Gruppe, die Eculizumab erhielt, zeigte sich eine Verbesserung der motorischen Defizite, allerdings wurde der primäre Endpunkt der Studie nicht erreicht (Yamaguchi et al., 2016).

Bisher findet Eculizumab noch keine Anwendung in der Therapie inflammatorischer Neuropathien, kann aber möglicherweise in der Zukunft als Therapieoption dienen (siehe 4.6)

1.2 Aufbau des Ranvier'schen Schnürringes

Als Ranvier-Schnürringe bezeichnet man etwa 1µm lange Unterbrechungen des durch Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems (PNS) oder Oligodendrozyten des zentralen Nervensystems (ZNS) gebildeten Myelins an Nervenaxonen, erstmals beschrieben durch Ranvier im Jahr 1871 (Ranvier L., 1871; Uncini & Kuwabara, 2015). Die myelinisierten Internodien befinden sich mit einer Länge von 1 bis 2 mm zwischen den Schnürringen (Uncini & Kuwabara, 2015). Die nodale Region beherbergt eine hohe Dichte an Natriumkanälen ($>1.000/\mu\text{m}^2$) und ist hierbei essenziell für die saltatorische Erregungsleitung von Aktionspotentialen (Poliak & Peles, 2003). Bedeutend für die Integrität des Schnürrings sind unter anderem die Ganglioside wie GM1 oder GD1a, die als Glycosphingolipide Teile der Lipid Rafts der Zellmembran bilden (Susuki, Baba, et al., 2007). Am Ranvier-Schnürring sind unter anderem eine Vielzahl an Ionenkanälen, Proteinen und Adhäsionsmolekülen lokalisiert, deren extrazelluläre Domänen zum Teil zugänglich für Autoantikörper sind und dadurch ein mögliches Antigen für autoimmune Prozesse darstellen können (Stathopoulos, Alexopoulos, & Dalakas, 2015). Die Blut-Nerven-Schranke ist an der Nervenwurzel und den Endplatten teilweise permeabel für zirkulierende Antikörper. Zudem könnten proinflammatorische Zytokine die Durchlässigkeit der Blut-Nerven oder Blut-Hirn-Schranke erhöhen (Stathopoulos et al.,

2015). Einzelne immunhistochemische Studien insbesondere an Mäusezupfnerven haben gezeigt, dass bis zu 30 Prozent der Patienten/Patientinnen mit einer CIDP eine Bindung an nodale oder paranodale Regionen des Schnürrings zeigen (Devaux, Odaka, & Yuki, 2012). Der Ranvier-Schnürring wird in drei Regionen unterteilt (siehe Abbildung 1): die nodale Region mit einer hohen Dichte an Natriumkanälen für die Aktionspotentialgenerierung, die paranodale Region sowie die juxtapanodale Region (Stathopoulos et al., 2015; Waxman & Ritchie, 1993).

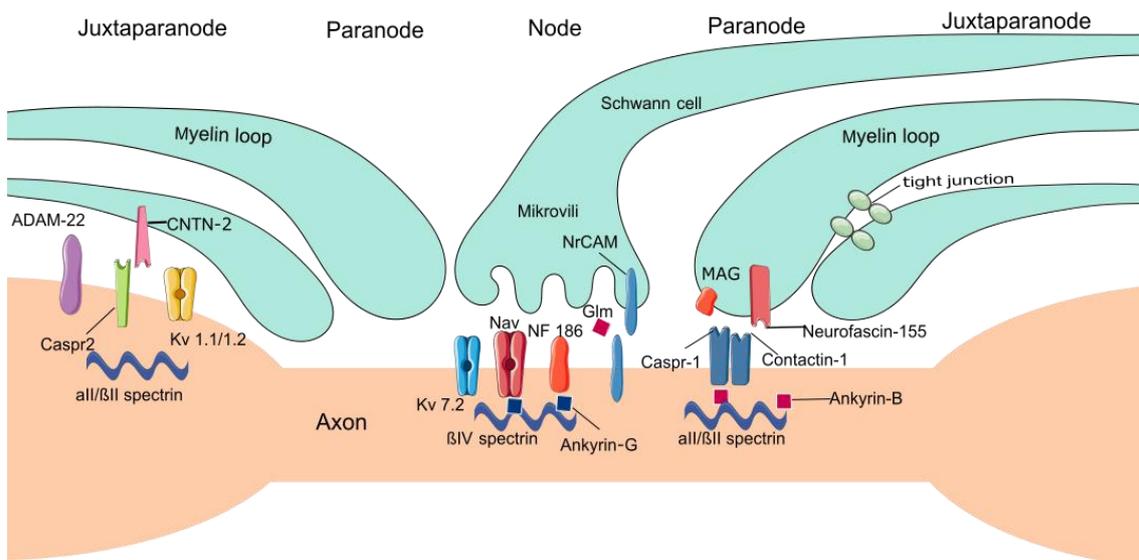


Abbildung 1: Ranvier-Schnürring des PNS: Axon mit umgebenden Myelinscheiden und Schwannzellmikrovilli. Aufteilung in Nodium, Paranodium und Juxtapanodium. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Nav) und Kaliumkanäle (Kv7.2/7.3) des Nodiums mit den Zelladhäsionsmolekülen NrCam (axonal und glial), Neurofascin-186 (NF-186) verankert an Teilen des Zytoskeletts (Ankyrin G, β IV spectrin) sowie von Schwannzellen sezerniertes Gliomedin (Glm). Darstellung des paranodalen axoglialen Komplexes mit Caspr-1, Contactin-1 und Neurofascin-155 sowie von Schwannzellen exprimiertes MAG-Protein. Zytoskeletale Proteine des Para- und Juxtapanodiums sind als all/ β / Spectrin und Ankyrin-B dargestellt. Juxtapanodal abgebildet sind Caspr-2 und Contactin-2 (CNTN-2), ADAM-22 sowie spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Kv1.1/1.2). Abkürzungen: ADAM-22 disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22; Caspr Contactin-associated-protein; CNTN Contactin; Glm Gliomedin; MAG myelin-associated glycoprotein; NF Neurofascin; NrCAM neuronal cell adhesion molecule. Abbildung nach Stathopoulos et al., 2015, Boyle et al., 2001, und Willison et al., 2014 (Boyle et al., 2001; Stathopoulos, Alexopoulos, & Dalakas, 2015; Willison & Scherer, 2014). Die Abbildung wurde mit Inkscape und Elementen von SmartServier erstellt. 1

1.2.1 Nodium

Am Nodium wird die Myelinscheide unterbrochen (siehe Abbildung 1), das Axon ist jedoch im PNS von Schwannzellmikrovilli und im ZNS von Oligodendrozyten oder

Astrozyten umgeben (Stathopoulos et al., 2015; Uncini & Kuwabara, 2015). Spannungsabhängige Natriumkanäle Nav (vor allem Nav1.6) des Nodiums sorgen für die Generierung von Aktionspotentialen, während die spannungsabhängigen Kaliumkanäle Kv (vor allem Kv7.2 und Kv7.3) hauptsächlich die neuronale Exzitabilität regulieren (Stathopoulos et al., 2015). Außerdem scheinen thermo- und mechanosensitive Kaliumkanäle der K2P-Familie (two-pore domain) eine wichtige Funktion am Ranvier-Schnürring, im Hinblick auf schnelle Regeneration des Aktionspotentials sowie die hochfrequente und schnelle Leitungsgeschwindigkeit myelinisierter Nerven, zu erfüllen. Diese Kaliumkanäle sind TREK-1 (TWIK-related potassium channel 1) und TRAAK (TWIK-related arachidonic acid stimulated potassium channel) (Kanda et al., 2019). Die Adhäsionsmoleküle des Nodiums, das axonal exprimierte Neurofascin-186 und das neuronale Zelladhäsionsmolekül Nr-CAM, das vom Axon und der Schwanzzelle exprimiert wird, sind hauptsächlich an der Akkumulation von Natriumkanälen beteiligt (Davis, Lambert, & Bennett, 1996; Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013). Beide Moleküle sind mit Proteinen des Zytoskeletts (Ankyrin-G, β IV-spectrin) verbunden und sorgen über eine Interaktion mit dem extrazellulären, von Schwanzzellmikrovilli sezernierten Gliomedin, für eine Verankerung derer an das Axon und somit für die Stabilität des Nodiums (Davis et al., 1996; Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013). Im ZNS übernehmen vermutlich mehrere extrazelluläre Matrixproteine wie Tenascin-R, Versican V2, Phosphacan und Brevican die Rolle des Gliomedins (Melendez-Vasquez et al., 2005). In Studien zeigten Nav1.6 Knockout Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte Nervenleitgeschwindigkeit des PNS (Kearney et al., 2002). Zudem wird das neuronale Protein NF-140 nodal exprimiert und scheint vor allem in der Embryogenese eine wichtige Rolle zu spielen. Ebenso wie das NF-186 ist NF-140 (siehe Abbildung 2) an dem Clustern von spannungsabhängigen nodalen Natriumkanälen beteiligt (Zhang et al., 2015).

1.2.2 Paranodium

Am Paranodium bilden die axonal exprimierten Moleküle Contactin-associated-protein-1 (Caspr-1) und das GPI-verankerte Contactin-1 (CNTN-1) mit dem glial exprimierten Neurofascin-155 (NF-155) sogenannte Septate-like-Junctions, die die Myelinscheiden am Axon verankern, Lateraldiffusion von Membranbestandteilen verhindern und eine Diffusionsbarriere des periaxonalen Raums bilden (siehe Abbildung 1) (Charles et al., 2002; Peles & Salzer, 2000). Knockout von einem der drei Proteine in Mäusen führt

elektrophysiologisch zu einer Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit (Boyle et al., 2001). Das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) befindet sich in den paranodalen Myelinscheiden, sowie Schmidt-Lantermann Einkerbungen, und dient als Antigen bei der IgM-Anti-MAG PNP, die mit einer monoklonalen Gammopathie assoziiert ist (Stathopoulos et al., 2015). Gap Junctions der paranodalen Myelinscheiden sind umgeben von Tight Junctions und Adherens Junctions. Connexine gehören hierbei zu den Gap Junction Proteinen, Claudine und ZO-1 sind Tight Junction Proteine und Cadherin-1 und Catenin- β -1 sind Adherensproteine. Ankyrin-B und α II β -spectrin bilden Teile des Zytoskeletts des Para- und Juxtaparanodiums (siehe Abbildung 1). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Spectrin-II-basierte Zytoskelett des Paranodiums an dem Clustern von Natriumkanälen der nodalen Region beteiligt ist (Amor et al., 2017).

1.2.3 Paranodale Proteine

1.2.3.1 Contactin-1

Bei Contactin-1 handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 130kDa, das von Neuronen des PNS sowie ZNS und Oligodendrozyten, jedoch nicht von Schwann-Zellen des PNS exprimiert wird (Einheber et al., 1997; Ranscht, 1988). Contactin-1 besitzt sechs Immunglobulin-like-Domänen (Ig-Domäne) und vier Fibronectin-Domänen (Fn-Domänen) (siehe Abbildung 2) (Faivre-Sarrailh & Devaux, 2013; Poliak & Peles, 2003). Laut einer Studie reagieren Autoantikörper vor allem gegen die N-glykosylierte Ig-Domäne des Contactin-1, während die mannosereiche Domäne vorrangig für die Komplexbildung mit glialem NF-155 wichtig zu sein scheint (Bonnon et al., 2007; Labasque et al., 2014). Eine weitere Studie zeigte, dass Anti-Contactin-1 Antikörper den Proteinkern von Contactin-1 erkennen und gegen die Ig-Domäne und nicht gegen die FnIII-Domäne des Contactin-1 gerichtet sind (Miura et al., 2015). Bei Neurofascin-155 und Caspr-1 handelt es sich um Transmembranproteine, während Contactin-1 über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit der Axonmembran verbunden ist (Reid et al., 1994). Caspr-1 interagiert mit der Immunglobulin-like-Domäne (Ig-Domäne) des Contactin-1 und nicht mit der Fibronectin-III-Domäne, während NF-155 mit dem Komplex der beiden axonalen Proteine interagiert (Charles et al., 2002). Caspr-1 und CNTN-1 binden bereits im endoplasmatischen Retikulum, werden im Golgi-Apparat modifiziert und dann gemeinsam am Paranodium

exprimiert, während bei Fehlen von Caspr-1 das Contactin-1 nodal exprimiert wird (Bonnon et al., 2003). In einer Studie wurde gezeigt, dass Contactin-1 großen Einfluss auf den Transport von Caspr-1 an die Axonmembran hat, da in Abwesenheit des GPI-Ankers von Contactin-1 in Zellkulturen das Caspr-1 intrazellulär exprimiert wird (Boyle et al., 2001; Faivre-Sarrailh et al., 2000). Im ZNS wurde eine Form von Contactin-1 gefunden, die nicht mit Caspr-1 interagiert (Rios et al., 2000). Zudem konnte bei Mäusen mit Mutationen des Contactin-1 eine Störung der paranodalen Architektur mit verminderter Nervenleitgeschwindigkeit, sowie eine aberrante Lokalisation der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle (Kv1.1/1.2), gezeigt werden, während das Clustern der nodalen Natriumkanäle nicht betroffen war (Boyle et al., 2001). Dementsprechend ist Contactin-1 maßgeblich an der Verankerung der Myelinscheiden am Axon sowie an der Architektur der Schnürringe beteiligt.

1.2.3.2 Neurofascin-155

Neurofascin-155 wird im ZNS von Oligodendrozyten und im PNS an den Myelinscheiden des Paranodiums der Ranvier'schen Schnürringe exprimiert, wo es das gliale Element der Septate-like-Junctions ist (siehe Abbildung 1) (Tait et al., 2000). Es existieren mehrere Isoformen des Neurofascin-Proteins, die sich anhand ihres Molekulargewichts unterscheiden (siehe Abbildung 2): nodales NF-186 (186kDa), nodales NF-140 (140kDa) und paranodal gliales NF-155 (155kDa) (Zhang et al., 2015). Diese Isoformen bestehen aus sechs Ig-Domänen und drei bis vier Fibronektin-III-Domänen (FnIII). Neurofascin-186 besitzt vier FnIII-Domänen (FnIII 1,2,4,5) und eine Mucin-Domäne, während Neurofascin-140 drei FnIII-Domänen (FnIII 1,2,4) und keine Mucin-Domäne aufweist (Zhang et al., 2015). Neurofascin-155 unterscheidet sich vom Neurofascin-140 nur durch das Vorliegen einer vierten FnIII-Domäne (FnIII3) und weist eine Ähnlichkeit zum Contactin-1 auf (Delmont et al., 2017). Neurofascin-155 ist durch alternatives Spleißen eine gliale Isoform und durch das Fehlen der Mucin-Domäne sowie einer FnIII3-, anstelle einer FnIII5-Domäne, charakterisiert (Darbelli et al., 2016). NF-155 interagiert mit dem axonalen Contactin-1 über seine Ig-Domäne, wobei vermutlich die Ig5- und Ig6-Domänen am wichtigsten zu sein scheinen (Thaxton et al., 2010). NF-155 besitzt acht Glykosilierstellen, welche bei der Komplexbildung und der Bindung von Antikörpern eine Rolle spielen (Devaux et al., 2016). NF-155 ist über eine PDZ-Bindedomäne mit dem Zytoskelett verbunden (Poliak & Peles, 2003). Es gibt einzelne Studien, die zeigen, dass bei 79 Prozent der Erkrankten mit Anti-NF-155 Autoantikörpern die N-glykosylierten Fn1-4 Domänen des NF-155 das Hauptepitop sind (Devaux et al.,

2016). Andere Studien zeigen hingegen, dass bei Patienten/Patientinnen mit Pan-Neurofascin-Antikörpern, die gegen alle drei Isoformen des Neurofascins gerichtet sind, die Ig-Domäne als Epitop fungiert, während bei Antikörpern, die nur gegen NF-155 gerichtet sind, die Fn3-4 Domänen das Zielepitop darstellen (Stengel et al., 2019). Außerdem wird NF-155 palmitoyliert und an Lipid Rafts exprimiert, welche neben anderen Mechanismen in der paranodalen Region auf axonaler und glialer Seite als Barriere gegen Lateraldiffusion von Membranproteinen agieren (Schafer, Bansal, Hedstrom, Pfeiffer, & Rasband, 2004). Neben Patienten/Patientinnen mit Immunneuropathien und Autoantikörpern gegen NF-155, wurden auch bei an Multipler Sklerose Erkrankten Abnormalitäten der NF-155 Expression auf Oligodendrozyten, einhergehend mit krankheitstypischer Demyelinisierung und Inflammation, gefunden (Howell et al., 2006).

1.2.3.3 Caspr-1

Caspr-1 (in Publikationen auch als Paranodin bezeichnet) ist ein 180kDa Transmembranprotein der Neurexin-Familie (Menegoz et al., 1997). Es existieren fünf humane Caspr-Gene (1-5), die essenziell für die Signaltransduktion und Proteininteraktion sind (Peles et al., 1997). Caspr-1 wird hauptsächlich an Paranodien des PNS und ZNS sowie auch an unmyelinisierten Axonen exprimiert, während Caspr-2 insbesondere am Juxtaparanodium in Assoziation mit Kaliumkanälen (Kv1.1/1.2) und auch ubiquitär im ZNS vorkommt (siehe Abbildung 1) (Einheber et al., 1997; Poliak et al., 1999; Spiegel et al., 2002). Die Extrazellulärdomänen von Caspr-1 beinhalten eine Discoidin- und eine Fibrinogen-ähnliche Domäne sowie EGF-Repeats (epidermal growth factor) und vier Laminin-G-Domänen (siehe Abbildung 2) (Peles et al., 1997; Poliak & Peles, 2003). Nur Caspr-1 besitzt im Gegensatz zu Caspr-2 zudem noch eine PGY-Domäne (Bonnon et al., 2007; Peles et al., 1997). Diese PGY-Domäne sorgt für eine Retention im endoplasmatischen Retikulum und die spezielle Prozessierung von Caspr-1, die nur in Anwesenheit von Contactin-1 vollendet werden kann (Bonnon et al., 2007). Caspr-1 ist über die Bindung mit dem Protein 4.1B mit dem axonalen Zytoskelett verankert (Menegoz et al., 1997). Caspr-1 ist in der Lage mit Contactin-1 einen cis-Komplex zu bilden, welcher wichtig für den Transport der beiden Proteine vom endoplasmatischen Retikulum an die Axonmembranoberfläche ist (Gollan, Salomon, Salzer, & Peles, 2003; Peles et al., 1997). Darüber hinaus kann Caspr-1 die Lateraldiffusion von spannungsgesteuerten Natriumkanälen der nodalen Region inhibieren (Einheber et al., 1997).

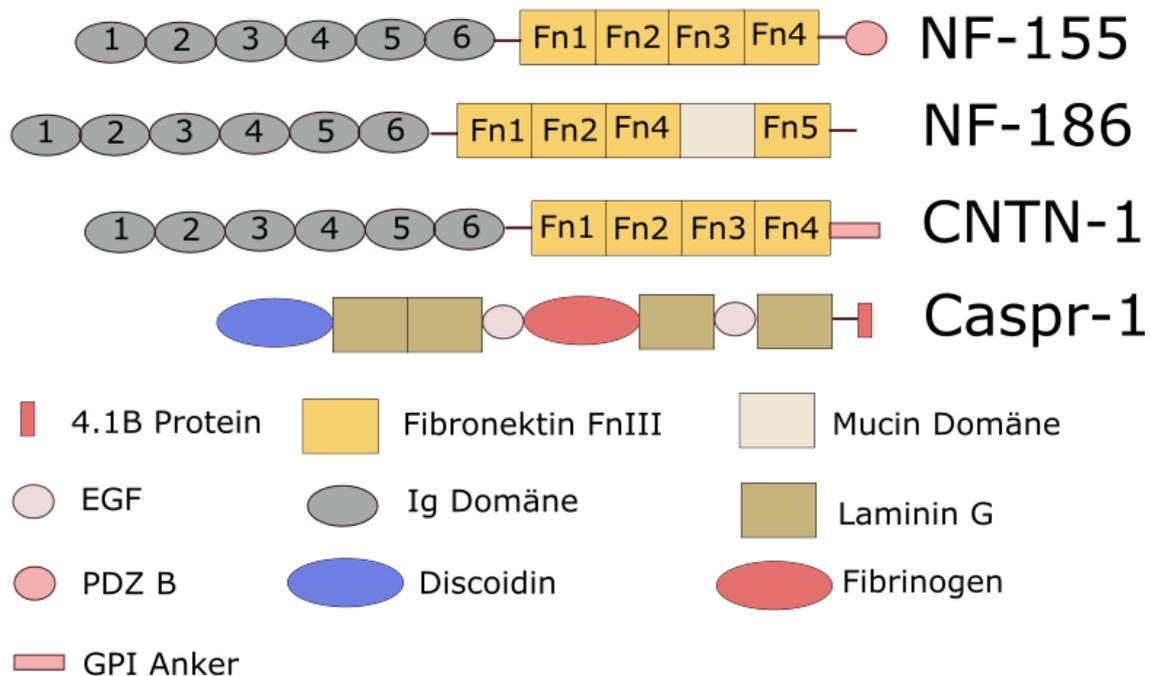


Abbildung 2: Proteine des Ranvier-Schnürringes. NF-155 besitzt 6 Ig-Domänen und 4 FnIII-Domänen (FN1-4) und ist über eine PDZ-Bindedomäne mit dem Zytoskelett verbunden. NF-186 unterscheidet sich durch eine Mucin-Domäne und eine Fn5- anstelle einer Fn3-Domäne. CNTN-1 besitzt 6 Ig und 4 Fibronektin-Domänen und ist über einen GPI-Anker mit dem Axon verbunden. Caspr-1 besitzt Discoidin-, Fibrinogen-, EGF- und Laminin-G-Domänen und ist über das 4.1 B-Protein mit dem Zytoskelett verankert. Abkürzungen: Caspr-1=Contactin-associated protein 1; CNTN-1=Contactin-1; Discoidin=Discoidin like Domäne; EGF=epidermal growth factor; Fibrinogen=Firbinogen like Domäne; Fn1-5=Fibronektin like Domäne 1-5; GPI=Glycosylphosphatidylinositol Anker; Ig-Domäne=Immunglobulin like Domäne; NF=Neurofascin; PDZ B=PDZ-Bindedomäne. Abbildung wurde nach Poliak und Peles et al und Stengel et al erstellt (Poliak & Peles, 2003; Stengel et al., 2019). Die Abbildung wurde mit Inkscape und Elementen von SmartServier erstellt. 1

1.2.4 Juxtaparanodium

Am Juxtaparanodium interagieren gliales Contactin-2 und axonales Caspr-2, ein Protein der Neurexin-Familie, mit den spannungsgesteuerten Kaliumkanälen Kv (vorrangig Kv1.1 und Kv1.2) und Teilen des Zytoskeletts (Poliak et al., 1999). Die Kaliumkanäle des Juxtaparanodiums dienen der Repolarisierung und der Wiederherstellung des internodalen Ruhepotentials (Peles & Salzer, 2000). Caspr-2 und das Zelladhäsionsmolekül TAG-1 ermöglichen durch axogliale Interaktion die Organisation von Kv Kanälen (Poliak et al., 2003). Ebenfalls juxtaparanodal axonal exprimiert wird das ADAM-22 (disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22), das an der Signaltransduktion beteiligt ist (Stathopoulos et al., 2015).

1.2.5 Pathophysiologie der Antikörper am Schnürring

Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) spielen eine essenzielle Rolle in der Bildung von Ranvier'schen Schnürringen und der raschen Leitung von Nervenaktionspotentialen entlang der Myelinscheide und können als Zielantigene bei Autoimmunneuropathien dienen (Labasque et al., 2014).

Insbesondere die CAMs des Paranodiums, CNTN-1, NF-155 und Caspr-1, scheinen Zielstrukturen von IgG-Antikörpern bei Patienten/Patientinnen mit CIDP zu sein, wobei vor allem der paranodale axogliale Komplex involviert zu sein scheint (Querol et al., 2013). An Suralisbiopsien von CIDP-Erkrankten konnte histopathologisch gezeigt werden, dass Anti-Contactin-1 Antikörper zu einer schweren Störung der nodalen und paranodalen Architektur mit partiellem Verlust der Caspr-1 und/oder NF-155 Immunoreaktivität sowie zu einer Aufweitung des nodalen Spaltes führen (Doppler et al., 2015). Diese durch Antikörper induzierten histopathologischen paranodalen Veränderungen resultieren im Folgenden in einer verminderten Nervenleitgeschwindigkeit und/oder Leitungsblöcken in der Elektroneurographie (Doppler et al., 2015). In einer weiteren Arbeit konnte mittels Passiv-Transfer-Versuchen gezeigt werden, dass durch die intraneurale Injektion von Anti-CNTN-1-IgG von Erkrankten in Rattennerven Leitungsblöcke induziert werden konnten (Doppler et al., 2019). Antikörper der IgG4 Subklasse gegen Contactin-1 scheinen pathogen zu sein, indem sie im Gegensatz zur IgG1 Subklasse die paranodale Region penetrieren können und auf diese Weise zum Verlust des paranodalen Komplexes aus CNTN-1/Caspr-1/NF-155 führen (Manso, 2016). Durch die Präsenz von Anti-NF-155 Autoantikörpern zeigten sich in Nervenbiopsien bei Tierexperimenten strukturelle Veränderungen und eine Destabilisierung der Septate-like-Junctions an allen untersuchten Paranodien. Dies führte zu einem Verlust der Verankerung der Myelinscheiden an das Axon, einer irregulären Aufweitung des periaxonalen Raumes sowie einer Infiltration zellulärer Prozesse zwischen den paranodalen Myelinscheiden und dem Axon (Vallat et al., 2017). Elektronenmikroskopisch konnte für einen Patienten mit Antikörpern gegen NF-186/NF-140 der Verlust von Schwanzzellmikrovilli sowie die Verdeckung der Ranvier'schen Schnürringe durch Verlängerung des Schwanzzellzytoplasmas gezeigt werden (Vallat et al., 2018). Die strukturellen paranodalen Veränderungen bieten ein Erklärungsmodell für die klinische Symptomatik der Patienten/Patientinnen und das demyelinisierende Muster in der Elektrophysiologie mit Herabsetzen der Nervenleitgeschwindigkeit, Leitungsblöcken und verlängerten distal motorischen Latenzen (Vallat et al., 2017). Erkrankte mit Anti-Neurofascin-155 Autoantikörpern zeigten in humanen

Zupfnervenfärbungen aus Nervenbiopsien zudem eine positive Korrelation zwischen der Häufigkeit axogliale Ablösung des Paranodiums und axonaler Degeneration (Koike et al., 2017). Eine weitere Publikation aus dem Jahr 2019 postuliert, dass NF-155 IgG4-Antikörper über einen anderen Pathomechanismus zu Veränderungen des paranodalen Komplexes führen als Anti-Contactin-1-Autoantikörper der Klasse IgG4 (Manso et al., 2019): Antikörper gegen Neurofascin-155 führten in vivo weder zu einer Störung der Komplexbildung der Septate-Like-Junctions noch zu einer Internalisierung. Diese Antikörper scheinen nicht wie Anti-CNTN-1 Antikörper die paranodale Region zu penetrieren, sondern über eine Bindung von NF-155 an der Schwannzelloberfläche zur Depletion des Zielantigens zu führen und infolgedessen die Komplexbildung mit den axonalen Partnern zu verhindern (Manso et al., 2019). Die Anti-Caspr-1 Antikörper scheinen auch den axoglialen Komplex aus CNTN-1/Caspr-1/NF-155 zu stören, wobei in einer Studie nur die IgG4 und nicht die IgG1 Subklasse eine Penetration und Interaktion des paranodalen Komplexes zeigte (Cortese et al., 2020). Allerdings gibt es bisher nur wenige Studien zur Pathogenese von Anti-Caspr-1 und diese basieren zum Großteil auf Interaktionsassays mit HEK-Zellen. In Zusammenschau scheint eine paranodale Dissektion durch Veränderung der Septate-like-Junctions in Kontrast zur klassischen, durch Makrophagen ausgelösten Demyelinisierung bei der typischen CIDP, die pathophysiologische Grundlage der Nodoparanodopathie zu sein (Koike et al., 2017).

1.2.6 Nodoparanopathien als eigene Entität

Initial wurde der Begriff der Nodoparanopathie bei den Polyneuropathien mit Anti-Gangliosid-Autoantikörpern beschrieben, um die übliche Einteilung der Neuropathien in axonal oder demyelinisierend zu erweitern (Uncini et al., 2013). Hierbei wurde als Pathomechanismus eine durch Autoantikörper gegen GM1 oder GD1a vermittelte Aktivierung der Komplementkaskade mit anschließender Bildung des Membranangriffskomplexes und Zerstörung der nodalen Struktur inklusive spannungsgesteuerter Natriumkanäle und Ankyrin G angenommen (McGonigal et al., 2010; Susuki, Rasband, et al., 2007). In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass unter Zugabe des C5-Inhibitors Eculizumab die Bildung des Membranangriffskomplexes sowie die Störung der nodalen Architektur verhindert werden kann (McGonigal et al., 2010).

Der Vorteil der Klassifikation als Nodoparaneuropathie besteht in der Hervorhebung des Ranvier'schen Schnürringes als Angriffspunkt der Autoantikörper und bedeutender Ankerpunkt der Pathophysiologie der Erkrankung (Uncini, Susuki, & Yuki, 2013). Später wurde der Begriff Nodopathie auf verschiedene Neuropathien unterschiedlicher Ätiologie, aber gemeinsamer Pathophysiologie mit Dysfunktion der nodalen Region und definierten elektrophysiologischen Gemeinsamkeiten, ausgeweitet (Uncini & Kuwabara, 2015). Seit 2011 wurden in der Literatur Autoantikörper gegen verschiedene Schnürringproteine, unter anderem gegen CNTN-1, NF-155, Gliomedin und Caspr (siehe Tabelle 3 und 4, 1.2.7), beschrieben (Devaux, Odaka, & Yuki, 2012; Doppler et al., 2016; Ng et al., 2012). NF-155 und CNTN-1 gelten als etabliertes neues Zielantigen bei IgG4-assoziierten Neuropathien (Dalakas, 2022). Diese Sonderform der Neuropathie mit Autoantikörpern gegen paranodale Proteine ist zudem bereits in den nationalen (Kommission Deutsche Gesellschaft für Neurologie S1 Leitlinie, 2019) sowie internationalen Leitlinien vertreten (EFNS & PNS, 2010).

1.2.7 Studienlage zu Autoantikörpern

Seit dem Jahr 2012 wurden Autoantikörper gegen verschiedene Zelladhäsionsmoleküle des Ranvier'schen Schnürringes bei Patienten/Patientinnen mit CIDP, GBS oder MMN beschrieben (siehe Tabelle 3 und 4). In mehreren Publikationen konnten Patienten mit Autoantikörpern gegen CNTN-1, NF-155 und Caspr-1 identifiziert werden (Cortese et al., 2020; Doppler et al., 2015; Querol et al., 2013).

Autoantikörper gegen Neurofascin wurden erstmals in einer Studie bei etwa 30 Prozent der Patienten/Patientinnen mit Multipler Sklerose entdeckt. Diese Autoantikörper erkannten sowohl die neuronale Isoform (NF-186) als auch die von Oligodendrozyten exprimierte Isoform (NF-155) und führten in vitro und in vivo über Komplementablagerung zu axonalem Schaden und Krankheitsprogression (Mathey et al., 2007). Seitdem wurden in weiteren Studien auch bei 86 Prozent der Erkrankten mit kombinierter zentraler und peripherer Demyelinisierung (CCDP) als auch bei Patienten/Patientinnen mit CIDP und GBS Autoantikörper gegen Neurofascin entdeckt (Kawamura et al., 2013; Ng et al., 2012). Außerdem zeigten diese Patienten/Patientinnen ein gutes Ansprechen auf IVIG (Kawamura et al., 2013).

Autoantikörper gegen paranodale Proteine liegen in etwa bei zehn Prozent der CIDP-Patienten/Patientinnen vor und weisen einen gemeinsamen Phänotyp auf, der

Unterschiede hinsichtlich Pathogenese, klinischem Erscheinungsbild und Therapieansprechen aufzeigt, weswegen die neue Entität der Nodo-Paranodopathie beschrieben wurde (siehe Tabelle 4) (Vural, Doppler, & Meinl, 2018).

Erkrankte mit Autoantikörpern gegen Neurofascin-155 zeigen einen subakuten, GBS-artigen Beginn, ein junges Erkrankungsalter (21 Prozent unter 20 Jahren) sowie eine männliche Prädominanz (Devaux et al., 2016; Fujita et al., 2018; Querol et al., 2014). Darüber hinaus weisen diese Patienten/Patientinnen oft ein schweres Krankheitsbild mit vorwiegend distal motorischem Befall, sensibler Ataxie und neuropathischem Schmerz auf (Cortese et al., 2020; Devaux et al., 2016; Kadoya et al., 2016). Bei manchen Erkrankten dieser Subgruppe war zudem ein posturaler oder Intentionstremor, vermutlich zerebellären Ursprungs, mit hoher Amplitude und geringer Frequenz auffallend (Bailly et al., 2018; Querol et al., 2014). In Liquorproben wurden, im Gegensatz zu seronegativer CIDP, höhere Eiweißwerte bei normaler Zellzahl, im Sinne einer zytalbuminären Dissoziation, sowie eine intrathekale Hochregulation der T2-Helfer spezifischen Zytokine entdeckt (Ogata et al., 2015; Ogata et al., 2019). Des Weiteren war in MRT Sequenzen eine Hypertrophie der zervikalen und lumbalen spinalen Wurzeln auffällig (Kira, Yamasaki, & Ogata, 2019). In den meisten Studien wurde eine Prädominanz der IgG4 Subklasse sowie ein schlechtes Therapieansprechen auf IVIG gezeigt, während die Gabe von Rituximab zu Besserung verhalf (Cortese et al., 2016; Querol et al., 2014).

In einer Subgruppe von sechs Prozent der CIDP-Patienten/-Patientinnen wurden Anti-CNTN-1 Antikörper entdeckt, die ein höheres Alter bei schwerem akuten Krankheitsbeginn und progredientem Verlauf, vorwiegend motorischem Befall und früher axonaler Degeneration zeigen (Querol et al., 2013). Im Vergleich zum jungen Erkrankungsalter von Anti-NF-155 positiven Patienten/Patientinnen, die im Median von 31 +/- 18 Jahren erkrankten, ist bei Anti-CNTN-1 ein späterer Beginn typisch mit einem Median von 56 +/- 26 Jahren (Cortese et al., 2020). Außerdem zeigten Anti-CNTN-1 positive Patienten/Patientinnen auch ein schlechtes Therapieansprechen auf IVIG, jedoch in einer Studie von Miura et al. eine Besserung unter Steroidtherapie (Doppler & al., 2015; Miura et al., 2015). Ein hochamplitudiger Aktionstremor, der möglicherweise zerebellären Ursprungs ist, wurde ebenfalls beschrieben (Doppler & al., 2015).

Erste Studien zu Anti-Caspr-1 Antikörpern offenbarten, dass vor allem neuropathischer Schmerz ein gemeinsames Erstsymptom zu sein scheint. Dies kann vermutlich durch die Bindung der Antikörper an DRG Neurone, die bei der Schmerzwahrnehmung eine

Rolle spielen, erklärt werden (Doppler et al., 2016). Außerdem zeigten die Patienten/Patientinnen, typisch für eine Paranodopathie, einen akuten Krankheitsbeginn mit hauptsächlich motorischen Symptomen und ein gutes Ansprechen auf Rituximab im Gegensatz zu IVIG. In dieser Gruppe konnte jedoch weder zerebellärer Tremor noch spinale Ataxie gezeigt werden (Doppler et al., 2016). In einer weiteren Publikation wiesen Patienten/Patientinnen keine neuropathischen Schmerzen auf (Cortese et al., 2020).

Antigen	Autor, Jahr	Antikörper	CIDP n (%)	GBS n (%)
Nodale Antigene				
NF-186	(Ng et al., 2012)	IgG1, 3	0/119; (0)	2/119 (3)
	(Devaux et al., 2012)	n.d.	6/50 (12)	(15)
	(Notturmo et al., 2014)	n.d.	1/95 (1)	(17,3)
	(Doppler et al., 2015)	IgG4	n.d.	n.d.
	(Mathey et al., 2017)	n.d.	0/44 (0)	0/44 (0)
	(Delmont et al., 2017)	IgG3, 4	5/246 (2)	0/26 (0)
	(Burnor et al., 2018)	IgG4, IgM	1/40(2,5)	1/14 (7)
	(Stengel et al., 2019)	IgG3	2/102 (2)	1/178 (0,5)
	(Zhang et al., 2019)	IgG4	1/29 (3,5)	n.d.
	(Cortese et al., 2020)	IgG4	1/342(0,3)	0/31 (0)
(Fehmi et al., 2021)	IgG1	3/649(0,5)	5/649 (0,8)	
NF-140	(Delmont et al., 2017)	IgG3, 4	5/246(2)	0/246 (0)
	(Stengel et al., 2019)	IgG3	2/102 (2)	1/178 (0,5)
	(Cortese et al., 2020)	IgG4	1/342(0,3)	0/31 (0)
	(Fehmi et al., 2021)	IgG1	3/649(0,5)	5/649 (0,8)
	(Wieske et al., 2021)	n.d.	4/188 (2)	n.d.
Gliomedin	(Devaux et al., 2012)	n.d.	(6)	(12)
	(Notturmo et al., 2014)	n.d.	1/95 (1)	(24)
	(Delmont et al., 2017)	n.d.	0/246 (0)	0/26 (0)
NrCam	(Devaux et al., 2012)	n.d.	(2)	(4)

Moesin	(Sawai et al., 2014)	n.d.	n.d.	5/40(12,5)
Juxtaparanodale Antigene				
Caspr-2	(Rosch et al., 2014)	n.d.	n.d.	n.d.
CNTN-2	(Stathopoulos et al., 2015)	n.d.	(0)	n.d.
	(Miura et al., 2015)	n.d.	0/533 (0)	0/200 (0)

Tabelle 3: Studienlage zu nodalen und juxtaparanodalen Autoantikörpern. Abkürzungen: n = Anzahl, n.d. = nicht durchgeführt. Modifiziert nach Appeltshauser (Appeltshauser L., 2018).

Antigen	Autor, Jahr	Anti-körper	CIDP n (%)	GBS n (%)	IVIG
Paranodale Antigene					
CNTN-1	(Devaux et al., 2012)	n.d.	(16)	(12)	n.d.
	(Querol et al., 2013)	IgG4	3/46 (6,5)	0/48 (0)	↓
	(Miura et al., 2015)	IgG4	13/533 (2,4)	0/200 (0)	↔
		IgG2	3/533 (0,5)	5/200 (2,5)	n.d.
	(Doppler et al., 2015)	IgG3, 4	4/53 (7,5)	0/21 (0)	↔
	(Devaux et al., 2016)	IgG4	13/533 (2,4)	0/200 (0)	↔
	(Mathey et al., 2017)	IgG4	3/44 (7)	n.d.	n.d.
	(Delmont et al., 2017)	n.d.	2/246 (1)	0/26 (0)	n.d.
	(Koike et al., 2017)	IgG4	1/131 (0,7)	n.d.	n.d.
	(Cortese et al., 2020)	IgG4>3	3/342 (1)	0/31 (0)	↓
(Pascual-Goni et al., 2021)	IgG4>3	15 (1,9-4,3)	n.d.	↓	
(Wieske et al., 2021)	n.d.	13/188 (7)	n.d.	n.d.	
Caspr-1	(Doppler et al., 2016)	IgG3 IgG4	0/35 (0) 1/35 (2,8)	1/22 (4,5) 0/22 (0)	n.d. ↓
	(Delmont et al., 2017)	n.d.	2/246 (1)	0/26 (0)	n.d.
	(Cortese et al., 2020)	IgG1, 4	6/342 (2)	0/31 (0)	↑
	(Pascual-Goni et al., 2021)	IgG4>3	15 (1,9-4,3)	n.d.	↓
	(Wieske et al., 2021)	n.d.	6/188 (3)	n.d.	n.d.

NF-155	(Ng et al., 2012)	IgG4 IgG1, 3	5/119 (4,2) 0/119 (0)	0/119 (0) 2/119 (2)	n.d. n.d.
	(Kawamura et al., 2013)	n.d.	4/16 (25)	3/20 (15)	n.d.
	(Querol et al., 2014)	IgG4	2/53 (3,8)	0/51 (0)	↓
	(Yan et al., 2014)	IgG	32/141 (23)	n.d.	n.d.
	(Ogata et al., 2015)	IgG4 IgG1	9/50 (18) 0/50 (0)	0/26 (0) 1/26 (3,8)	↔ ↔
	(Doppler et al, 2015)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	(Devaux et al., 2016)	IgG4	38/533 (7)	0/200 (0)	↓
	(Cortese et al., 2016)	IgG4	1/26 (3,8)	n.d.	↓
	(Kadoya et al., 2016)	IgG4	15/191 (7,8)	0/57 (0)	↓
	(Koike et al., 2017)	IgG4	9/131 (6,9)	n.d.	n.d.
	(Mathey et al., 2017)	IgG4	3/44 (6,8)	n.d.	n.d.
	(Delmont et al., 2017)	IgG4	9/246 (4)	0/26 (0)	n.d.
	(Garg et al., 2018)	IgG4	3/55 (5)	n.d.	↓
	(Burnor et al., 2018)	IgG4	4/40(10)	1/14 (7)	↓
	(Doppler et al., 2018)	IgM	4/77 (5)	1/34 (3)	↑
	(Stengel et al., 2019)	IgG4 IgG3	2/102 (2) 3/102 (3)	0/178 (0) 1/178 (0,5)	n.d. mild
	(Zhang et al., 2019)	IgG4	6/29 (20,7)	n.d.	↓
	(Cortese et al., 2020)	IgG4 IgG3	9/342 (2,6) 1/342 (0,3)	0/31 (0) 0/31 (0)	↓ Gut
	(Fehmi et al., 2021)	IgG4	17/649 (2,6)	0/649	↓
	(Wieske et al., 2021)	n.d.	18/188 (9,5)	n.d.	n.d.
(Shelly et al., 2021)	IgG4 IgM	20/410 (5) 7/410 (1,7)	n.d. n.d.	↓ ↑	

Tabelle 4: Studienlage zu paranodalen Autoantikörpern. Abkürzungen: ↓ = schlechtes Ansprechen; ↑ = gutes Ansprechen; ↔ = teilweise Ansprechen, n = Anzahl, n.d. = nicht durchgeführt. Modifiziert nach Appeltshauser (Appeltshauser L., 2018).

1.3 Aufbau von Immunglobulinen

Im Folgenden sollen Eigenschaften der für die Studie relevanten IgG und IgM Antikörper aufgezeigt werden.

1.3.1 IgG

Immunglobulin-G ist die Hauptantikörperklasse, die bei einer Immunantwort gegen Fremdantigene ausgeschüttet wird (Bournazos & Ravetch, 2017). IgG ist ein bifunktionaler Antikörper, der zum einen über Fab-Arme hoch spezifisch Antigene binden und zum anderen durch die Fc-Region verschiedene Effektorfunktionen des innatens und adaptiven Immunsystems auslösen kann (Bournazos & Ravetch, 2017). Immunglobulin-G besteht aus vier Polypeptidketten mit zwei schweren Ketten (H chains, 50kDa) und zwei leichten Ketten (L chains, kappa oder lambda, 25kDa), welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Hmiel, Brorson, & Boyne, 2015). Jede schwere Kette besteht zudem aus einer N-terminalen variablen Domäne und drei konstanten Domänen CH1, CH2, CH3 (Vidarsson et al., 2014). Zwischen CH1 und CH2 befindet sich die Hinge-Region. Ebenso bestehen die leichten Ketten aus einer N-terminalen variablen Domäne und einer konstanten Domäne (Hmiel et al., 2015). Die leichte Kette bildet zusammen mit der variablen Region der schweren Kette und der CH1-Region die Fab Fragmente, die für die Antigen-Antikörper Bindung essenziell sind (Kabat, Wu, & Bilofsky, 1978; Potter, 1983). Durch somatische Rekombination und Mutation kann eine hohe Diversität der Fab-Regionen erreicht werden, die für die spezifische Bindung verschiedener Antigene verantwortlich ist (Pincetic et al., 2014). Das Fc-Fragment besteht aus der CH2- und 3-Domäne. Die Fc-Region kann über Bindung der Fc γ -Rezeptoren verschiedene Effektorfunktionen wie Zytotoxizität und Phagozytose von IgG-markierten Antigenen, Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, B-Zell-Selektion, Aktivierung Antigen präsentierender Zellen und Komplementaktivierung auslösen (Bournazos & Ravetch, 2015). Die Vielzahl an immunmodulatorischen Effektorfunktionen wird durch die Heterogenität der Aminosäuresequenz und N-terminalen Glykanstruktur der Fc-Region erreicht (Anthony, Wermeling, & Ravetch, 2012). Es existieren Fc γ -Rezeptoren der Klasse I, die Teil der Ig-Superfamilie sind, die CH2-Domäne in Nähe der Hinge Region des Fc binden und eine hohe Affinität zu IgG aufweisen. Außerdem existieren Fc γ -Rezeptoren der Klasse II, die C-Typ Lektin Rezeptoren sind und eine geringe Ligandenspezifität aufweisen (Pincetic et al., 2014; Sondermann, Kaiser, & Jacob, 2001). Im Bereich der Fc-Region

befindet sich zudem der neonatale Fc-Rezeptor, der für die lange Halbwertszeit von 21 Tagen und den plazentaren Transport verantwortlich ist (Vidarsson et al., 2014). Die Hinge-Region verbindet die Fab-Fragmente mit der Fc-Region des Antikörpers.

Es werden vier IgG-Subklassen, IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, unterschieden. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die zu ungefähr 90 Prozent aus Proteinen und zu 10 Prozent aus Kohlenhydraten bestehen. Die Subklassen sind zu 90 Prozent identisch und unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer konstanten Region, insbesondere der Hinge-Region und der CH2-Domänen des Fc-Teils, die für die Bindung von IgG-Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen des innaten Immunsystems und C1q (Teil der Komplementkaskade) verantwortlich sind (Vidarsson et al., 2014). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Antikörper nach Antigenbindung über Interaktion der Fc-Fragmente Hexamere ausbilden können und somit C1q rekrutieren und die Komplementkaskade aktivieren können (Diebold et al., 2014). Somit hat jede Subklasse spezifische Eigenschaften hinsichtlich Immunkomplexbildung, Komplementaktivierung, Antigenbindung, Halbwertszeit und plazentaren Transport (Vidarsson et al., 2014).

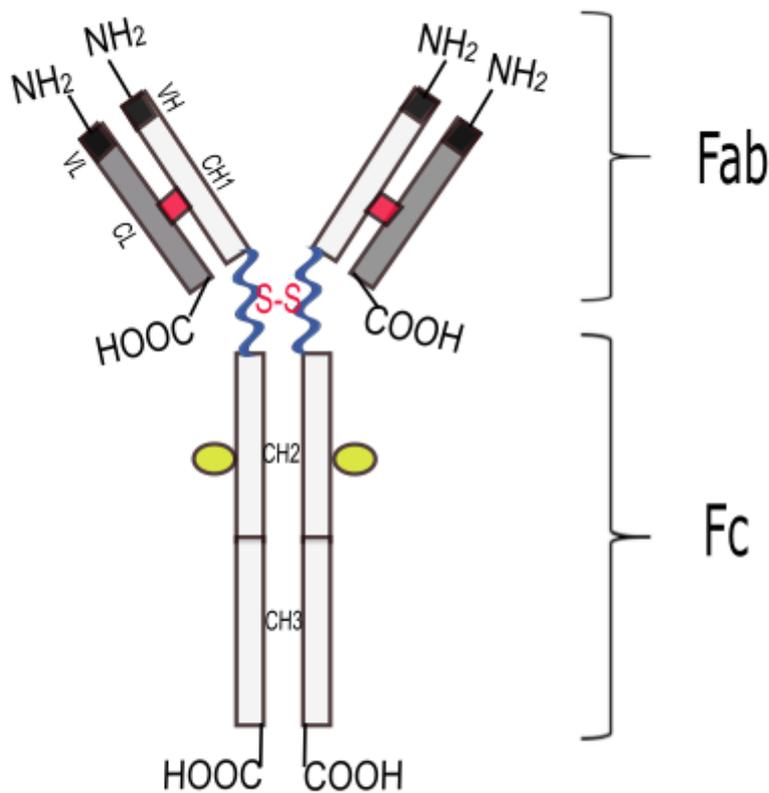


Abbildung 3: Immunglobulin-G Aufbau mit Unterteilung in Fab- und Fc-Region: schwere Kette als weiße Balken mit konstanten Regionen CH1 bis CH3 sowie variabler NH2-terminaler Region VH. Leichte Ketten als graue Balken mit COOH-terminaler konstanter Region CL und NH2-terminaler variabler Region VL. Hinge Region in blau dargestellt. Verbindungen durch rote Disulfidbrücken. In gelb sind die Bindungsstellen für C1q dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Appeltshauer (Appeltshauer L., 2018), lizenziert unter CC BY NC SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Appeltshauer. Die Abbildung wurde mit Inkscape und Elementen von SmartServier erstellt. 1

1.3.1.1 IgG1

IgG1 ist mit einem Prozentsatz von 60 Prozent am meisten vertreten und wird hauptsächlich bei Kontakt mit Proteinen, Polysacchariden und Antigenen oft als erstes ausgeschüttet (Vidarsson et al., 2014). Bei Immunantworten gegen kindliche Erythrozytenantigene, wie beispielsweise dem Rhesus D Antigen bei Schwangerschaften Rhesus negativer Mütter, wird hauptsächlich IgG1 und IgG3 plazentar übertragen (Brouwers et al., 1988). IgG1 ist in der Lage C1q zu binden und gilt als starker Aktivator des Komplementsystems (Bindon, Hale, Bruggemann, & Waldmann, 1988).

1.3.1.2 IgG2

IgG2 ist mit ungefähr 32 Prozent aller IgG Subklassen vertreten und wird vor allem bei der Präsenz von bakteriellen Kapselpolysacchariden ausgeschüttet (Siber, Schur, Aisenberg, Weitzman, & Schiffman, 1980). In Abwesenheit von IgG2 konnte eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Polysacchariden beobachtet werden (Kuijpers, Weening, & Out, 1992). IgG2 weist die kürzeste Hinge-Region auf, die aufgrund einer Polyprolin-Helix sehr rigide ist. IgG2 ist wegen der Aminosäureposition A235 allgemein ein schwacher Aktivator des Komplementsystems und tut dies nur unter bestimmten Bedingungen (Morgan et al., 1995). Bei Vorhandensein hoher Dichten an Zielantigen führt IgG2 über Hexamerbildung zu einer stärkeren Komplementaktivierung (Diebolder et al., 2014).

1.3.1.3 IgG3

IgG3 besitzt nur einen Anteil von knapp vier Prozent der IgG Subklassen. IgG3 wirkt hauptsächlich als Initiator von Effektorproteinen und als proinflammatorischer Antikörper. Oft hat IgG3 eine kürzere Halbwertszeit von nur sieben Tagen, während sie bei den anderen Subklassen 21 Tage beträgt (Vidarsson et al., 2014). IgG3 Antikörper werden vor allem in der Anfangsphase von viralen Infektionen ausgeschüttet und werden dann von IgG1 abgelöst (Ferrante et al., 1990). Aufgrund einer langen Hinge-Region wird das höhere Molekulargewicht von 170kDa im Gegensatz zu 146kDa der anderen IgG-Subklassen erklärt (Vidarsson et al., 2014). Außerdem führt dies zu erhöhter Flexibilität der Fab-Arme zur Fc-Region, welche die verstärkte Komplementbindung sowie Immunkomplexformation und Antigenbindung beeinflusst (K. H. Roux et al., 1997). IgG3 gilt als der stärkste Aktivator der Komplementkaskade (Bindon & al., 1988; Vidarsson & al., 2014).

1.3.1.4 IgG4

Die IgG4 Subklasse macht nur knapp fünf Prozent der IgG Subklassen aus (Dalakas, 2022). Allergene induzieren vor allem eine IgG1 und 4 sowie eine IgE Antwort (Aalberse, Stapel, Schuurman, & Rispens, 2009). Symptomlinderung bei Immuntherapie scheint mit der Induktion von IgG4-Antikörpern einherzugehen (Jutel & Akdis, 2011). Außerdem scheint IgG4 verstärkt bei Infektionen durch Parasiten gebildet zu werden (Ottesen & al., 1985). Des Weiteren existiert die Gruppe der Erkrankungen, die mit IgG4 Antikörpern assoziiert ist, zu der unter anderem die Anti-MuSK-MG gehört (Dalakas, 2022; Mahajan & al., 2014). Darüber hinaus wird auch die CIDP mit Autoantikörpern gegen NF-155 zu

diesen Erkrankungen gezählt (Dalakas, 2022). IgG4 Antikörper sind in der Lage die Fab-Arme auszutauschen, um bispezifische Antikörper zu bilden (van der Neut Kofschoten et al., 2007). Aufgrund der besonderen Struktur der Hinge-Region der IgG4 Antikörper werden diese, im Gegensatz zu bivalenten IgG1 Antikörpern, als monovalent bezeichnet. Dies führt zur Unfähigkeit der Quervernetzung und Internalisierung des Zielantigens (Dalakas, 2022; Koneczny, 2018). IgG4-Antikörper sind aufgrund der Aminosäure an Position 331 nicht in der Lage C1q zu binden und eine Komplementreaktion zu induzieren (Tao, Smith, & Morrison, 1993). Darüber hinaus sind IgG4 Antikörper nicht in der Lage den inhibitorischen Fcγ-Rezeptor zu binden, um zelluläre und Komplement-medierte Immunreaktionen auszulösen (Dalakas, 2022). IgG4 scheint nach langer Antigenexposition ausgeschüttet zu werden und hat eine geringe Affinität zum Fc-Rezeptor. Diese Antikörper scheinen demnach eine überschießende Immunantwort zu regulieren und wurden deshalb auch als blockierende Antikörper betitelt (Aalberse et al., 2009). Die Pathogenität der IgG4-Antikörper bei der CIDP mit Autoantikörpern gegen nodo-paranodale Zielantigene wird durch die Zerstörung der nodalen Architektur des Ranvier-Schnürringes sowie die Inhibierung der paranodalen Formation des NF-155/CNTN-1-Komplexes erreicht (Dalakas, 2022).

1.3.2 IgM

Bei einer antigenen Attacke durch Bakterien oder virale Pathogene stellt IgM das erste sekretierte Immunglobulin dar (Boes, 2000). Zudem ist IgM das einzige Immunglobulin, welches bei allen Vertebraten vorhanden ist und liegt in menschlichem Serum mit 1,47mg/ml in einer hohen Konzentration vor (Fellah et al., 1992; Gonzalez-Quintela et al., 2008). Das sekretierte IgM liegt vorwiegend als Pentamer, bestehend aus fünf Monomeren mit einer Verbindungskette J-chain, vor, die den Transport durch mukosale Epithelien erlaubt (Gong & Ruprecht, 2020). Verglichen mit IgG bestehen die IgM-Monomere auch aus zwei leichten (lambda und kappa) und zwei schweren (μ) Ketten (Czajkowsky & Shao, 2009). Jede schwere und leichte Kette besteht wiederum aus einer konstanten und einer variablen Domäne. Die konstante Region der schweren μ -Kette besteht nicht, wie bei IgG, nur aus drei, sondern aus vier C-Domänen, wobei die C μ 2-Domäne als Hinge-Region agiert und insbesondere für die Flexibilität der Fab-Regionen sorgt (Czajkowsky & Shao, 2009). Über Disulfidbrücken zwischen Cysteinen in der C μ 2- und C μ 3-Domäne der schweren Kette bilden fünf IgM-Monomere das IgM-Pentamer (Niles, Matsuuchi, & Koshland, 1995). In Studien zur Ultrastruktur konnte kürzlich gezeigt

werden, dass das pentamere IgM überwiegend asymmetrisch und nicht planar mit einer 50° Lücke zwischen den Monomeren im Bereich der J-chain aufgebaut ist und damit eher dem Aufbau eines Hexamers ähnelt (Czajkowsky & Shao, 2009; Hiramoto et al., 2018; Sharp et al., 2019). Antikörper sezernierende Zellen scheinen in der Lage zu sein sowohl pentameres als auch hexameres IgM zu produzieren (Niles et al., 1995). Aufgrund der multimeren Struktur des IgM wird eine hohe Avidität, sowie Toleranz gegenüber gesteigerten Mutationsraten viraler Antigene, erreicht (Gong & Ruprecht, 2020). Darüber hinaus besitzt IgM auch die Eigenschaft das Komplementsystem zu aktivieren, indem nach Bindung eines Oberflächenantigens eine Konformationsänderung des IgM stattfindet und hierdurch die C1q-Bindestelle von IgM freiliegt (Sharp et al., 2019). IgM gilt als starker Aktivator des Komplementsystems, während ein antigengebundenes IgM, verglichen mit tausenden IgGs, zu einer äquivalenten Komplementaktivierung führt (Gong & Ruprecht, 2020; Kurlander, Rosse, & Logue, 1978). Es wird zwischen natürlichem IgM, welches sich unabhängig von einer antigenen Stimulation in der Blutbahn befindet, und adaptivem IgM, welches erst bei akuter Infektion sekretiert wird, unterschieden (Boes, 2000). Das adaptive IgM scheint neben seiner Funktion als Erstantwort bei akuter Infektion auch in Hinblick auf das humorale Gedächtnis und den Langzeitschutz vor Pathogenen wichtig zu sein, nachdem langlebige IgM-sezernierende Plasmazellen in der Milz gefunden wurden (Bohannon et al., 2016).

1.4 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem wurde erstmals 1896 von Bordet entdeckt, stellt als proteolytische Kaskade einen Hauptbestandteil der innate Immunabwehr dar und resultiert in der Produktion von proinflammatorischen Molekülen, Opsonierung sowie Lyse von Pathogenen (Dunkelberger & Song, 2010). Das Komplementsystem besteht aus über 30 Proteinen, die ungefähr 3 g/l des Plasmas ausmachen (Walport, 2001a). Es handelt sich um eine Hierarchie an proteolytischen Reaktionen, deren Bestandteile zur proinflammatorischen Entzündungsreaktion und Immunzellstimulation über Anaphylatoxine, zur Opsonierung von Pathogenen, zu Chemotaxis und Gewebeumbauprozessen sowie über einen Membranangriffskomplex zur Zellyse führen können (Merle et al., 2015; Merle, Noe et al., 2015; Ricklin, Hajishengallis et al., 2010).

1.4.1 Aktivierung

Die Komplementkaskade kann über drei verschiedene Wege aktiviert werden (siehe Abbildung 4): den klassischen, den Lektin und den alternativen Weg (Walport, 2001b). Dem klassischen Weg liegt die Formierung eines Antigen-Antikörper Komplexes zugrunde, welcher über eine Bindung des C1-Komplexes, bestehend aus C1q, C1r und C1s, mit der Fc-Region der Antikörper IgG1, IgG2, IgG3 oder IgM (nicht IgG4) zur Aktivierung der Komplementkaskade führt (Sharp et al., 2019). Darüber hinaus kann C1q auch ohne Anwesenheit von oben genannten Antikörpern Pathogene direkt binden und mit verschiedenen Molekülen wie Amyloidfibrillen, Mukopolysacchariden oder Laminin interagieren (Almitairi et al., 2018). Die Autolyse des C1-Komplexes führt zur Spaltung von C2 und C4 in kleine Fragmente (C2a, C4a) und größere Fragmente (C2b, C4b), die im Folgenden die Bildung des C4bC2a-Komplexes, der C3-Konvertase, initiieren. Die C3-Konvertase führt zur Spaltung von C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b (Dunkelberger & Song, 2010; Ricklin et al., 2010; Walport, 2001a). Der Lektin Aktivierungsweg ist unabhängig von Antikörpern und basiert auf pattern-recognition-receptors PRR, wie beispielsweise dem MBL-Rezeptor (Mannose-binding-lectin). Diese Rezeptoren sind Angriffspunkte von PAMPS (pathogen-associated molecular patterns), die mit der Pathogenität einer Großzahl an Mikroorganismen, wie Bakterien, zusammenhängen (Gordon, 2002; Medzhitov & Janeway, 2002). Die Bindung von MBL mit pathogenen Oberflächenantigenen führt zur Aktivierung von Mannose-assoziierten-Serinproteasen MASPs 1,2, und 3 (Medzhitov & Janeway, 2000). Dies resultiert in der Spaltung von C2 und C4 und der Aktivierung der C3-Konvertase, analog zum klassischen Weg (Harmat et al., 2004). Ein C3b-Molekül kann mit dem Komplex aus C4bC2a die C5-Konvertase initiieren. Im Gegensatz dazu wird der alternative Weg durch die spontane Hydrolyse von C3 gestartet und die C3-Konvertase des alternativen Wegs in Anwesenheit von Faktor-B und D gebildet (Rodriguez, Nan, Li, Gor, & Perkins, 2015; Walport, 2001a). Dieser Komplex kann über Amplifizierung verstärkt und durch Properdin, einem positiven Regulator der Komplementkaskade, stabilisiert werden (Hourcade, 2008).

1.4.2 Endstrecke und Zelllyse

Jeder der drei Aktivierungswege resultiert in der Bildung der proteolytischen C3- und C5-Konvertase (siehe Abbildung 4) (Dunkelberger & Song, 2010). Hierbei werden durch Spaltung von C3, C4 und C5 die proinflammatorischen Anaphylatoxine C3a, C4a und

C5a gebildet, von denen C5a am potentesten zu sein scheint (Lienenklaus et al., 1998). Diese führen zu erhöhter Gefäßpermeabilität, Rekrutierung von Immunzellen wie Leukozyten, Ausschüttung von Mediatoren wie Histamin und Erhöhung der Phagozytose (Haas & van Strijp, 2007; Wetsel, 1995). Außerdem fungiert C3b und C4b als ein Opsonin, induziert über die Erkennung durch CR-Rezeptoren Phagozytose und führt ebenfalls zur Amplifizierung von der C3-Konvertase des alternativen Weges (Dunkelberger & Song, 2010). In der terminalen Endstrecke bilden die Faktoren C5b bis C9 den Membranangriffskomplex MAC, welcher über Perforation zur Zellyse führen kann (Esser, 1994). Dieser MAC Komplex wird initiiert durch die Bindung von C5b an die C5-Konvertase und die Anlagerung von C6 und C7. Der Komplex aus C5b bis C7 transloziert in die äußere Schicht der Phospholipidmembran, dies führt zur Insertion von C8 und instabilen Poren. Multiple C9-Moleküle sind schließlich in der Lage stabile Poren von 10nm in der Zelloberfläche zu verursachen (Dunkelberger & Song, 2010; Esser, 1994; Walport, 2001b). Zum Schutz vor autologer Komplement-vermittelter Zerstörung dient CD59, ein GPI-Ankerprotein, welches die Bindung von C9 an den C5b-C8-Komplex unterbindet (Dalakas et al., 2020; Hansch et al., 1984). Die aus dem MAC-Komplex resultierende Zellyse ist durch einen Calciumeinstrom sowie Verlust von Adeninnukleotiden und der mitochondrialen Aktivität verbunden (Papadimitriou, Ramm, Drachenberg, Trump, & Shin, 1991). Die lytische Zelle schüttet daraufhin verschiedene lipidische Mediatoren, wie Arachidonsäure, Leukotriene, reaktive Sauerstoffspezies sowie Prostazyklin, aus (Imagawa et al., 1987; Shiraziet al., 1987). Außerdem setzen lysierende Zellen auch das zytosolische Enzym Laktatdehydrogenase LDH frei (Bidlack & Lockshin, 1976). Darüber hinaus scheint das Komplementsystem nicht nur Teil der innaten Immunabwehr zu sein, sondern auch das adaptive Immunsystem mit der B- und T-Zell Antwort zu beeinflussen (Dunkelberger & Song, 2010).

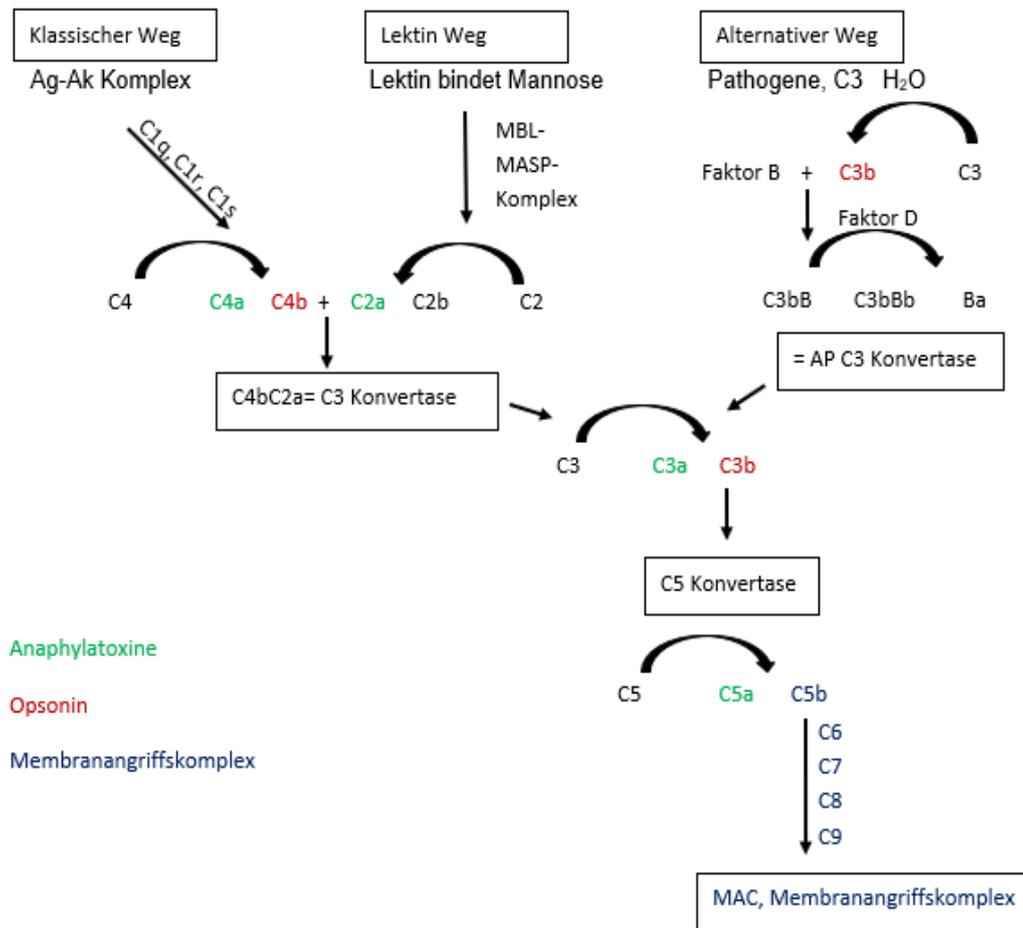


Abbildung 4: Schema der Komplementkaskade: Aktivierung über den klassischen Weg mit Antigen-Antikörper Komplex und des C1 Komplexes bestehend aus C1q, C1r, C1s. Aktivierung über den Lektin Weg durch Mannose-bindendes Lektin mit Pathogenstrukturen. Klassischer Weg sowie Lektin Weg führen zur C3-Konvertase, während über den alternativen Weg durch spontane C3-Hydrolyse und die Faktoren-B und -D die AP C3 Konvertase gebildet wird. Durch Spaltung von C3 in C3a und C3b kann die C5-Konvertase C5 in C5a und C5b spalten. C5b bildet in der Endstrecke mit den Faktoren C6 bis C9 den Membranangriffskomplex (blau), der zur Zellyse führen kann. Opsonine sind in rot, Anaphylatoxine in grün dargestellt. Abkürzungen: Ag = Antigen; Ak= Antikörper; AP C3 Konvertase= alternative pathway C3 Konvertase; MAC= Membranangriffskomplex; MASP= MBL assoziierte Serinproteasen; MBL= Mannose binding lectine. Abbildung erstellt mit Word, nach Atkinson et al (Atkinson, Liszewski, & Yu, 2021) und modifiziert nach Appeltshauer (Appeltshauer L., 2018), lizenziert unter CC BY NC SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Appeltshauer.

1.4.3 Rolle des Komplementsystems bei entzündlichen Neuropathien

Zirkulierende Autoantikörper, insbesondere der IgG1 und IgG3 Subklasse, können über eine Antigenbindung und anschließende C1q-Bindung die Komplementkaskade aktivieren und so zu Gewebeuntergang führen und einen Teil des Pathomechanismus verschiedener neurologischer Erkrankungen erklären (Dalakas, Alexopoulos, & Spaeth,

2020; Latov, 2021). Bei verschiedenen GBS Varianten, wie beispielsweise dem Miller-Fisher-Syndrom, konnte nachgewiesen werden, wie Autoantikörper gegen Ganglioside auf Myelinfasern oder Axonen zur Komplementaktivierung und Initiierung des Membranangriffskomplexes führen. Die Ablagerung von C3b auf Schwannzellen kann zudem in Schäden des Myelins und in der Infiltration von Makrophagen und Immunzellen resultieren (Hafer-Macko et al., 1996). In Passivtransferversuchen an Mausmodellen konnten Anti-Gangliosid-Autoantikörper nur bei Anwesenheit von humanem Komplement Schäden an myelinisierten Schwannzellen und einen GBS-artigen Phänotyp hervorrufen (Goodfellow et al., 2005; Willison et al., 2008). Auch bei der MMN, einer asymmetrischen motordominanten Form der Neuropathie, wurden in 50 Prozent der Fälle IgM-Autoantikörper gegen Gangliosid GM1 identifiziert, die über die Stärke der Komplementaktivierung in der Schwere der Erkrankung resultieren (Vlam et al., 2015). Bei der paraproteinämischen IgM Neuropathie mit Autoantikörpern gegen Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) konnte in Suralisbiopsien nachgewiesen werden, dass Anti-MAG Antikörper zusammen mit Komplementbestandteilen an myelinisierten Nervenfasern abgelagert werden und somit vermutlich über eine Komplementaktivierung die Demyelinisierung induziert wird (Weiss, Dalakas, & al., 1999).

Bei Patienten/Patientinnen mit CIDP lassen sich Ablagerungen von IgG und Komplement an Myelinfasern detektieren und die Serumlevel von verschiedenen Komplementbestandteilen der terminalen Endstrecke sind bei zunehmender Schwere der Erkrankung erhöht (Dalakas & Engel, 1980; Quast, Keller, Hiepe, Tackenberg, & Lunemann, 2016). Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass das Komplementsystem, insbesondere die Anaphylatoxine C3a und C5a, über Zytokinausschüttung und Makrophagenaktivierung in der Entstehung von neuropathischen Schmerzen involviert ist (Fritzinger & Benjamin, 2016).

Bei der Paranodopathie mit Autoantikörpern gegen NF-155, CNTN-1 und Caspr-1 wurde in der Literatur eine Prädominanz der IgG4-Subklasse identifiziert, die keine Komplementaktivierung induzieren kann, sondern über eine Unterbindung von Proteininteraktionen zur Störung der paranodalen Architektur führt (Dalakas, Alexopoulos, & Spaeth, 2020; Manso et al., 2019).

1.5 Ziele der Arbeit

In dieser Studie sollen Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen Neurofascin-155 und Contactin-1 anhand von Screeningmethoden, wie ELISA und immunhistochemischer Färbung muriner Zupfnerven in einer Kohorte von Patienten/Patientinnen mit CIDP, GBS und anderen Formen der Neuropathien identifiziert werden. Anhand dieser seropositiven Kohorte sollen verschiedene Fragestellungen zum klinischen Phänotyp, der Pathogenese der nodo-paranodalen Autoantikörper sowie das Therapieansprechen untersucht werden.

Die Fragestellungen dieser Studie lauten:

- Wie ist der klinische Phänotyp und der Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von der Autoantikörpersubklasse bei Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen nodo-paranodale Proteine?
- Induzieren nodo-paranodale Autoantikörper in Abhängigkeit der IgG-Subklasse eine Komplementbindung und ist diese durch IVIG zu beeinflussen?
- Kann die Bindung der nodo-paranodalen Autoantikörper an ihr Zielantigen durch IVIG reduziert werden oder kommt es zu einer Neutralisierung der Antikörper?
- Induzieren nodo-paranodale Autoantikörper eine Komplement-assoziierte Zytotoxizität und kann diese den Pathomechanismus erklären und durch IVIG beeinflusst werden?

Zur Erforschung der oben genannten Fragestellungen wurden ELISA-basierte sowie zellbasierte Verfahren und LDH-Zytotoxizitätsanalysen verwendet.

Bisher ist noch unklar welche Bedeutung die Antikörpersubklasse auf den genauen Pathomechanismus, den klinischen Phänotyp und das Ansprechen auf unterschiedliche Therapieformen hat. Durch die Erforschung der oben genannten Aspekte soll unter anderem auch die Rolle des Komplementsystems und der IgG Subklasse in Bezug auf einen therapeutischen Effekt untersucht werden, um so das Komplementsystem als mögliche Zielstruktur für neue therapeutische Ansätze identifizieren zu können.

2 Material und Methoden

Einige der hier genannten Methoden entsprechen den in bereits veröffentlichten Studien der Neurologischen Klinik beschriebenen Verfahren (Appeltshauer, 2017; Doppler et al., 2018; Stengel et al., 2019).

2.1 Materialauflistung

In den folgenden Tabellen (Tabelle 5 bis 15) sind alle Puffer, Antikörper, Medien, Lösungen, Proteine und Geräte mit Herstellernamen und Artikelnummern aufgeführt, die im Rahmen der Studie verwendet wurden.

Bezeichnung	Hersteller	Nummer
Acetone solution 2000µg/ml	Merck Millipore, Billerica, MA	48358
Aquapolymount	Polysciences Inc, Warrington, USA	18606-5
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck Millipore, Billerica, MA	A4503-50G
CoverGrip Coverslip Sealant	Biotium Inc, Fermont, USA	23005
Fetale Bovine Serum/FBS	Merck Millipore, Billerica, MA	F7524
Goat Serum	Agilent, CA, USA	X090710-8
NA ₂ CO ₃	Merck Millipore, Billerica, MA	S7795-500g
NaCl>99,8%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE	1367.1000
NaHCO ₃	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	HN01.2
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck Millipore, Billerica, MA	1.06345.1000
PAP pen for Immunostaining	Science Services, München, DE	N71310-N
PFA 95%	Merck Millipore, Billerica, MA	30525-89-4

VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI 1.5 µg/ml	Vector Laboratories, Burlingame, USA	H-1200
--	---	--------

Tabelle 5: Reagenzien und Materialien für die Immunhistochemie

Bezeichnung	Hersteller	Nummer
1 M H ₂ SO ₄ (2N)	Fluka, Honeywell International Inc, Morristown, USA	35276-1L
Nunc 96 Well Immuno Platten, 96 W	Thermo Fisher Scientific™ Inc, Waltham, USA	104342404
Complement component C1q from human serum > 95%	Merck Millipore, Billerica, MA	C1740
Milchpulver 500g	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, DE	T145.2
Pierce™ F(ab') ₂ Preparation Kit	Thermo Fisher Scientific™ Inc, USA	10269923
Privigen® IVIG 100mg/ml Infusionslösung (10%)	CSL Behring GmbH, Marburg, DE	7177/820
TMB Solution	Invitrogen, Bender, Wien, Österreich	00-4201-56
Tween 20	Merck Millipore, Billerica, MA	P1379-250ML

Tabelle 6: Materialien und Reagenzien für ELISA/KBA

Puffer	Herstellung
0,05 M Phosphatpuffer	0,1 M Phosphatpuffer 1:1 in destilliertem Wasser verdünnt
0,1 M Carbonatpuffer	4,2g NaHCO ₃ mit 1,78g Na ₂ CO ₃ , gelöst in 500ml destilliertem Wasser und auf pH von 9,4 titriert
0,1 M Phosphatpuffer	405 ml 0,2 M Stammlösung A mit 95ml Stammlösung B auf pH von 7,4 titriert und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt

0,1 M PBS	800ml Stammlösung A mit 160ml Stammlösung B auf einen pH von 7,4 titriert, 60ml 5M NaCl zugegeben und mit destilliertem Wasser auf 2 Liter aufgefüllt
5M NaCl	146,1g NaCl in 500ml destilliertem Wasser gelöst
Blockierungslösung für ELISA/KBA	200ml 0,1 M PBS mit 100µl 20 Tween und 6,66ml 10% BSA/PBS
Blockierungslösung für Zupfnerven	0,1 M PBS mit 4% Goat Serum, 4 % FBS und 0,3% Triton X-100
BSA/PBS 10%	1g BSA in 9ml 0,1M PBS gelöst
BSA/PBS 2%	BSA/PBS 10% in 1:4-Verdünnung in PBS verdünnt
BSA/PBS 1%	BSA/PBS 2% in 1:1 in PBS verdünnt
PFA 4%	4g PFA 95% wurde in 100ml 0,1 M Phosphatpuffer verdünnt
Stammlösung A	35,6g Na ₂ HPO ₄ in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst
Stammlösung B	31,2 g Na ₂ HPO ₄ in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst
Waschpuffer für ELISA/KBA	1 Liter 0,1 M PBS mit 500µl 20 Tween

Tabelle 7: Herstellung von Puffern/Lösungen.

Bezeichnung	Hersteller	Nummer
Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/ rat/ mouse	abcam, Cambridge, GB	ab1055820
Anti-Pan-Neurofascin antibody, anti-human/mouse/rat	R & D Systems, Inc., Minneapolis, USA	AF3235

Tabelle 8: Primär-Antikörper als Positivkontrolle

Bezeichnung	Hersteller	Nummer
Alexa Fluor 488-AffiniPure Donkey Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L) Anti-NF antibody	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	703-545-155
Anti-C1q antibody (FITC), Rabbit polyclonal to C1q (FITC)	abcam, Cambridge, GB	ab4223
Anti-Complement C1q Antibody (HRP), polyclonal Sheep IgG	LifeSpan BioSciences, Seattle, USA	LS-C41845
Anti-Human IgM, rabbit, HRP	Agilent, CA, USA	P021502-2
CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (H+L)	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	109-165-003
Donkey anti-Goat IgG Secondary Antibody (H+L), HRP Anti-CNTN antibody	abcam, Cambridge, GB	ab205723
Mouse anti-Human IgG1 Fc Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	A-10648
Mouse anti-Human IgG4 Fc Secondary Antibody, HRP	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	A-10654
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab') ₂ Fragment Specific	Jackson Immuno-Research, West Grove, USA	109-035-006
Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody to Human IgG2	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	05-0520
Peroxidase-Mouse Monoclonal Antibody to Human IgG3	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	05-3620
Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG (H+L)/ HRP	Agilent, CA, USA	P021402-2

Tabelle 9: Sekundär-Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Fallnummer
Humanes Neurofascin-140	Sino Biological/Biozol, Eching, DE	15694-H08H
Humanes Neurofascin-155	(Ng et al 2012) AG Prof. Dr. E. Meinl Inst. f. klin. Neuroimmun. Biomedizinisches Zentrum der LMU, München	Nicht kommerziell
Humanes Neurofascin-186	(Ng et al 2012) AG Prof. Dr. E. Meinl Inst. f. klin. Neuroimmun. Biomedizinisches Zentrum der LMU, München	Nicht kommerziell
Recombinant human Contactin-1/ CNTN-1	Sino Biological Inc., Beijing, China	10383-H08H

Tabelle 10: Proteine

Bezeichnung	Hersteller	Fallnummer
Aqua ad iniectabilia, steril	Deltamedica GmbH, Reutlingen, DE	2559.99.99
CaCl ₂	Merck Millipore, Billerica, MA	1.02391.1000
CELLSTAR® Cell Culture Flasks, 75cm ²	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich	658 170
D-(+)-Glucose powder, BioReagent für HEK-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE	HN06.3
Deckgläser, rund, 12mm	Gerhard Menzel, Braunschweig, DE	CBAD00120RA120MNZ#0

DPBS Dulbecco's PBS	Merck Millipore, Billerica, MA	D8537-500ML
Gibco™ Fetal Bovine Serum (FBS)	Merck Millipore, Billerica, MA	F7524
KCl >99,5%	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, DE	6781.1
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	25030-024
Minimal essential medium (MEM)	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	11095080
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck Millipore, Billerica, MA	1.06580.1000
NaCl > 99,8%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE	1367.1000
NaOH	Merck Millipore, Billerica, MA	1.09137.1000
Nunc™ Zellkultur-Multischalen, 24W	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	142475
Nunc™ Delta Surface Zellkultur-Multischalen, 6W	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	140675
Penicillin/ Streptomycin 10000U/ml	Life Technologies, Grand Island, US	15140-122
Poly-D-Lysine hydrobromide	Merck Millipore, Billerica, MA	P6407-5mg
TE Puffer (100X) pH 8.0	PanReac AppliChem, Illinois Tool Works Inc., Glenview, USA	A0973
Trypan Blue solution 0.4%, liquid Thermo	Merck Millipore, Billerica, MA	T8154
Trypsin-EDTA (0.05%), phenol red	Life Technologies, Grand Island, US	25300-054

Tabelle 11: Materialien und Reagenzien für HEK-Kultur

Bezeichnung	Hersteller	Fallnummer
Nunc™ Delta Surface Zellkultur- Multischalen, 96 W	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	167008
Complement Serum Standard human	Merck Millipore, Billerica, MA	C9473-1ML
Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) Version 06	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany	04 744 934 001
LDH	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany	10107085001
Triton™ X-100	Merck Millipore, Billerica, MA	T8787-50ML

Tabelle 12: Materialien für LDH-Zytotoxizitätsversuche

Bezeichnung	Herstellung
0,1 xTE- Puffer	TE 1:10.000 in H ₂ O verdünnt, steril filtriert, bei +4°C gelagert
2x HBS-Puffer	12mM D-(+)-Glucose-Pulver, 10mM KCl, 280mM NaCl und 1,5mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O mit NaOH auf pH von 6,95 titriert, steril filtriert, bei -20°C gelagert
CaCl ₂	2,5M CaCl ₂ in H ₂ O auf pH von 7,0 titriert, bei -20°C gelagert
HEK-Medium	5ml L-Glutamin, 5ml Pen/Strep und 50ml steriles, 30 Minuten bei 56°C, hitzeinaktiviertes Gibco™ FBS auf 500ml mit MEM aufgefüllt und steril filtriert, bei +4°C gelagert
PDL	Steriles Poly-D-Lysin-Hybrimid-Pulver mit 50ml destilliertem Wasser gelöst

Tabelle 13: Puffer für die HEK-Zellkultur

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
20x Objektiv Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE	Plan-Apochromat 20x/0,8 Ph2 M27
40x Objektiv Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE	Plan-Apochromat 40x/0,95 Korr Ph3 M27
CO2- Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	Heracell 150i
CoolCell FTS30 Freezing container	Merck Millipore, Billerica, MA	BCS-170
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, DE	Axio.Imager.M2
Heizplatte	Medax Nagel GmbH, Kiel, DE	SP13
Inversmikroskop	Olympus, Tokio, Japan	CKX41
Multiscan EX Elisa Reader	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	51118177
Stereomikroskop und Objektiv	Zeiss, Oberkochen, DE	Stemi2000 450043
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	Herasafe KS
Wasserbad	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, DE	WNB Basic
Zentrifuge	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE	Rotanta 460R
Zentrifuge LDH Assay	Heraeus Sepatech, Hanau, DE	Megafuge 1.0R

Tabelle 14: Verwendete Geräte

Software	Hersteller	Version
Endnote™ 20	Clarivate Analytics, USA	X9.3.1
Genesis Lite	Labsystems, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, USA	2.16
ImageJ	National Institute of Health, USA	1.49b
Inkscape	Inkscape Community	0.92.4

Microsoft ® Office™ 2016	Microsoft Corporation, Redmond WA, USA	2016
SmartServier	Les Laboratoires Servier, SAS, Frankreich	2020
SPSS Statistics	IBM Corporation, Armonk NY, USA	23.0
VisiView®	Visitron Systems, Puchheim, DE	2.1.1

Tabelle 15: Verwendete Software

2.2 Patientengruppe und Kontrollgruppe

Im Zeitraum von Dezember 2018 bis Januar 2020 wurden pro- und retrospektiv insgesamt 212 Patienten und Patientinnen mit Polyneuropathien in die Studie eingeschlossen. Alle Teilnehmer/-innen der Studie wurden vor Abnahme der Serumproben in mündlicher und schriftlicher Form über die Studienzwecke aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zum Einschluss in die Studie. Alle retrospektiv in die Studie aufgenommenen Patienten/Patientinnen sowie 60 gesunde Kontrollpersonen haben vorher zugestimmt, dass das Material für Forschungszwecke weiterverwendet werden darf (Appeltshauer L., 2018). Die Ethikkommission der Universität Würzburg befürwortete die Studie (Nr. 278/133 und 220/20).

2.2.1 Fallzahlberechnung

Autoantikörper gegen paranodale Proteine, wie Contactin-1, Neurofascin-155 und Caspr-1, können bei ungefähr zehn Prozent der Patienten/Patientinnen mit chronisch inflammatorischen Polyneuropathien identifiziert werden (Vural, Doppler, & Meinl, 2018). Die Häufigkeit von Autoantikörpern gegen NF-155 unter CIDP Erkrankten wird in der Literatur mit vier bis 18 Prozent angegeben (Devaux et al., 2016; Ng et al., 2012; Ogata et al., 2015). In einer Studie mit einer großen Kohorte von 533 Patienten/Patientinnen betrug die Prävalenz von NF-155 Autoantikörper sieben Prozent (Devaux et al., 2016). Die Prävalenz von NF-155 Autoantikörpern unter GBS Erkrankten scheint deutlich niedriger zu sein (Lleixa et al., 2021; Pruss et al., 2011). Bei sechs Prozent der CIDP Patienten/Patientinnen wurden Antikörper gegen Contactin-1 entdeckt (Querol et al., 2013). Vorrangiges Ziel dieser Studie war die Identifikation von NF-155 positiven Seren

sowie die Untersuchung der Komplementbindung und Interaktion mit IVIG, nicht der Nachweis eines signifikanten Unterschieds zwischen Patienten und Kontrollgruppe. Unter Beachtung der kleinsten Prävalenz von Anti-NF-155 Autoantikörpern von vier Prozent sollten zur Detektion von mindestens drei seropositiven CIDP Patienten/Patientinnen 65 bis 80 CIDP Erkrankte sowie zur Detektion von insgesamt acht seropositiven Patienten/Patientinnen insgesamt 190 bis 212 Erkrankte auf Anti-NF-155 Autoantikörper untersucht werden.

2.2.2 Probengewinnung

Während eines stationären oder ambulanten Aufenthaltes wurde Serum von Personen mit passender Symptomatik gewonnen und von verschiedenen Kliniken Deutschlands in unser neurologisches Labor des Universitätsklinikums Würzburg geschickt. Die extern in die Studie einbezogenen seropositiven und seronegativen Patientenserum stammten unter anderem aus den Unikliniken Jena, Gießen, Tübingen, Heidelberg, Halle und München. Hierbei wurde anhand eines Fragebogens das Augenmerk insbesondere auf nodo-paranodopathieverdächtige Symptome gelenkt. Solche sind unter anderem ein subakuter Beginn mit Verlust der Gehfähigkeit, Vorhandensein von Tremor und neuropathische Schmerzen. Die gewonnenen Proben wurden fünf Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert, aliquotiert und bei -20 °C kryokonserviert. Zudem wurde retrospektiv bereits archiviertes Serum für die weiteren Versuche verwendet (Appeltshauser L., 2018).

2.2.3 Patientenkohorte

Bei 67 der insgesamt 212 getesteten Patienten/Patientinnen wurde eine CIDP nach den Kriterien der EFNS/PNS diagnostiziert (Van den Bergh et al., 2010). Hierunter waren 42 männlich und 22 weiblich (einer anonymisiert). Darüber hinaus wurden 29 Patienten/Patientinnen mit acute-onset chronisch inflammatorisch demyelinisierender Polyneuropathie (A-CIDP) (20 männlich und neun weiblich), elf Erkrankte an GBS nach Brighton-Kriterien (Sejvar, Kohl, et al., 2011) (zehn männlich und eine weiblich), neun Patienten/Patientinnen mit vaskulitischer Polyneuropathie, fünf Patienten/Patientinnen mit multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy (MADSAM), fünf Patienten/Patientinnen mit paraproteinämischer Polyneuropathie, vier Patienten/Patientinnen mit einer Ganglionopathie, drei Patienten/Patientinnen mit

hereditärer Polyneuropathie, zwei Erkrankte an Miller-Fisher-Syndrom, zwei Erkrankte an einer multifokalen motorischen Neuropathie (MMN), ein Erkrankter an einer Anti-MAG-Polyneuropathie sowie ein Erkrankter an einer paraneoplastischen Polyneuropathie in die Studie eingeschlossen. Bei 34 der rekrutierten Personen war eine sonstige entzündliche Polyneuropathie und bei 39 Personen eine Polyneuropathie unklarer Genese zu eruieren. In der Kohorte zeigte sich insgesamt eine männliche Prädominanz mit 76 weiblichen Patientinnen und 133 männlichen Patienten (drei Patienten anonymisiert). Der Altersmedian betrug für die gesamte Kohorte 61 Jahre (8 bis 87 Jahre). Bei den Teilnehmenden mit einer CIDP betrug der Altersmedian ebenfalls 61 Jahre (8 bis 86 Jahre), bei der A-CIDP 67 Jahre (12 bis 84 Jahre) und bei den GBS Patienten/Patientinnen 59 Jahre (33 bis 71 Jahre). Im Median betrug die Krankheitsdauer 28,5 Monate bis zur Probenentnahme.

2.2.4 Kontrollen

Für die weiteren Versuche stand bereits aliquotiertes Serum von 60 gesunden Kontrollpersonen zur Verfügung (28 Frauen, 32 Männer). Der Altersmedian betrug 54 Jahre und unterscheidet sich nicht signifikant von dem Altersmedian der erkrankten Kohorte. Bei den gesunden Kontrollpersonen wurden neurologische Erkrankungen durch eine ausführliche Anamnese ausgeschlossen (Appeltshauser L., 2018).

2.2.5 Klinische Daten

Aus den vorhandenen Dokumenten wie Arztbriefen, elektrophysiologischen Messungen und Liquoruntersuchungen wurden retrospektiv die klinischen Daten der Patienten/Patientinnen in einer Excel-Tabelle zusammengetragen. Die klinischen Informationen von extern rekrutierten Personen wurden aus den bereitgestellten Arztbriefen pseudonymisiert übertragen.

2.2.6 Statistik und Graphiken

Die statistische Auswertung wurde mithilfe von Microsoft Excel und SPSS 23.0 durchgeführt. Korrelationen wurden mithilfe des Spearman Tests auf Signifikanz geprüft. Für die Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von p kleiner oder gleich 5 % gewählt. Au-

ßerdem wurden T-Tests für verbundene Stichproben auf dem 95 % Konfidenzintervall ermittelt. Graphiken wurden mit Microsoft Excel, SPSS 23.0 sowie InkScape erstellt.

2.3 Methoden

2.3.1 Mäusezupfnerven

2.3.1.1 Präparation von Mäusezupfnerven

Nach der Tötung adulter C57BL/6 Mäuse durch zervikale Dislokation, wurde der Nervus ischiadicus der Mäuse entnommen. Dieser wurde dann in 4 % PFA Lösung fixiert und in 0,1 M Phosphatpuffer gegeben. Das Epi- und Perineurium wurde anschließend in 0,05 M Phosphatpuffer mit Pinzetten von dem Nerven entfernt und Nervenfaszikel auf Objektträger gezupft, sodass einzelne Axone unter dem Mikroskop sichtbar wurden. Die Objektträger wurden dann im Kühlschrank getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt (Appeltshauer L., 2018).

2.3.1.2 Immunhistochemische Färbung

Bei der immunhistochemischen Färbung werden Antigen-Antikörper-Bindungen über einen fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper nachgewiesen. Hierbei wurde das Patientenserum als Primär-Antikörper inkubiert und als Sekundär-Antikörper ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers zur Visualisierung einer Bindung hinzugefügt.

Die bei -20 °C kryokonservierten Objektträger wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend zehn Minuten in Aceton bei -20 °C gegeben. Nach dem Abdampfen der Objektträger auf einer 38 °C heißen Heizplatte wurden die Objektträger beschriftet und mit einem PAP-Pen umrandet. Die Nerven wurden anschließend in 0,1M PBS gewaschen und pro Nerv mit 100µl Blocklösung für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente der Reduktion unspezifischer Bindungen. Während der Inkubationszeit wurde das Patientenserum, sowie eine Kontrolle 1:100 und 1:500 in Blocklösung verdünnt und nach Abkippen der Blocklösung auf die Objektträger gegeben. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich bei einem Nerv nur Blocklösung hinzugegeben. Die Nerven wurden dann über Nacht in einer feuchten Kammer bei +4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger dreimal in PBS gewaschen. Ein Cy3-konjugierter Sekundär-Antikörper wurde 1:300 verdünnt auf die Objektträger gegeben

und für eine Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten in PBS wurden die Objektträger abgetropft, mit VECTASHIELD® *Mounting Medium with DAPI 1.5 µg/ml* eingedeckelt und daraufhin mit *CoverGrip™ Coverslip Sealant* beschichtet. Die Objektträger wurden dann im Kühlschrank getrocknet und mit Hilfe des *Axiolmager.M2-Fluoreszenz-Mikroskops* ausgewertet.

2.3.2 ELISA

Beim ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) handelt es sich um ein Verfahren zum enzymbasierten Nachweis von Antikörpern gegen spezifische Zielproteine. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten/Patientinnen und Kontrollen wurden mithilfe von ELISAs als Screeningverfahren auf Antikörper gegen paranodale Proteine getestet. Die verwendeten Materialien sind in den Tabellen unter 2.1 detailliert aufgelistet.

2.3.2.1 ELISA mit Neurofascin (-155/-168/-140) und Contactin-1

Immuno 96 MicroWell™ Feste Platten, Nunc, IDL 96 Well-Platten wurden am ersten Tag des Versuchs mit dem Zielprotein NF-155, NF-186, NF-140 oder Contactin-1 beschichtet. Zwei Wells wurden als Negativkontrolle jeweils unbeschichtet belassen. Die restlichen Wells wurden entweder mit in PBS verdünntem NF-155 beziehungsweise NF-186 in einer Konzentration von 5µg/ml, in PBS verdünntem NF-140 in 1µg/ml oder in Bikarbonatpuffer verdünntem Contactin-1 in einer Konzentration von 2µg/ml mit je 100µl beschichtet und bei +4 °C über Nacht inkubiert.

Nach zweimaligem Waschen mit je 200µl PBS und vorsichtigem Ausklopfen der Platte am nächsten Tag wurde mit 200µl Blocklösung (0,1M PBS wurde mit 3,33% BSA und 0,05% TweenR 20 angesetzt) pro Well beschichtet. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Platte auf diese Weise eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Patientenseren sowie die Kontrollseren in 1:100 mit Blocklösung verdünnt. Als Positivkontrolle wurde der kommerzielle *Anti-Pan-Neurofascin antibody anti-human/mouse/rat* in 1:1000 und für Contactin-1 der *Anti-Contactin 1 antibody, monoclonal mouse anti-human/ rat/ mouse* in 1:100-Verdünnung verwendet. Nach der Inkubationszeit folgten zwei Waschschritte mit Waschpuffer (0,1M PBS wurde mit 0,05 % TweenR20 gemischt) inklusive gutem Ausklopfen, um überschüssige Substanzen zu entfernen. Das Patientenserum sowie die Normal- und Positivkontrollen wurden jeweils in Duplets nach dem Belegungsplan

aufgetragen. In die unbeschichteten Wells und in die Wells ohne Primär-Antikörper wurden jeweils 100µl Blocklösung aufgetragen und für insgesamt eine Stunde bei 37 °C unter Agitation inkubiert. Primär- und Sekundär-Antikörper wurden, wenn nicht anders angegeben, in Blocklösung verdünnt.

Nach viermaligem Waschen und Klopfen erfolgte die Zugabe des Sekundär-Antikörpers *Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG* in 1:10.000 und *Rabbit Anti-Human IgM* in 1:7.000-Verdünnung. Für die Positivkontrollen wurde *Goat anti-Chicken IgY (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate* und *Donkey anti-Goat IgG Secondary Antibody (H+L), HRP Anti-CNTN antibody* verwendet. Bei dem Sekundär-Antikörper handelt es sich um einen enzymgebundenen Antikörper, der durch Zugabe eines chromogenen Substrats die Bindung über eine Farbreaktion nachweist.

Die Inkubationszeit des Sekundär-Antikörpers betrug 30 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler. Nach vier weiteren Waschschrritten wurde chromogenes Substrat (100µl *TMB Solution* pro Well) hinzugegeben und im Dunkeln für genau 15 Minuten inkubiert. Das TMB diene als chromogenes Substrat für den enzymgekoppelten Sekundär-Antikörper und führt bei Bindung an einen Antigen-Antikörper-Komplex zu einem blauen Farbumschwung. Um die Reaktion zu stoppen, wurde je 50µl *1M H2SO4* pro Well hinzugefügt, das zur Bildung eines gelben Farbkomplexes führt (Nakane & Kawaoi, 1974). Bei 450 nm wurde die ELISA Platte dann im *Multiscan EX Elisa Reader* ausgewertet und die Optische Dichte (OD) gemessen. Als Grenzwert wurde der Mittelwert plus fünfmal die Standardabweichung von allen in die Studie einbezogenen Kontrollen gebildet.

Die Optischen Dichten wurden anschließend in einer Excel Tabelle eingetragen. Hierbei wurde der Mittelwert der Duplets gebildet und der Mittelwert der zwei Wells ohne Primär-Antikörper subtrahiert.

Bei Optischen Dichten über dem Grenzwert wurden weitere ELISAs zur Bestimmung der Antikörper-Subklasse und des Titers sowie Versuche an HEK-Zellen durchgeführt.

Da bei Patienten/Patientinnen mit Pan-Neurofascin-Antikörpern diese gegen ein gemeinsames Epitop der Neurofascin-Isoformen NF-155/-186/-140 gerichtet sind und keine unabhängigen Antikörper vorliegen (Stengel et al., 2019), werden im Folgenden für Titerbestimmungen und ELISA-basierte Komplementversuche jeweils auch bei Pan-NF Patienten/Patientinnen zur besseren Vergleichbarkeit nur Neurofascin-155 beschichtete ELISA-Platten verwendet, da bei den Pan-Neurofascin-Antikörpern für NF-

186 und NF-140-beschichtete Platten ein gleiches Bindungsverhalten zu erwarten ist wie bei NF-155.

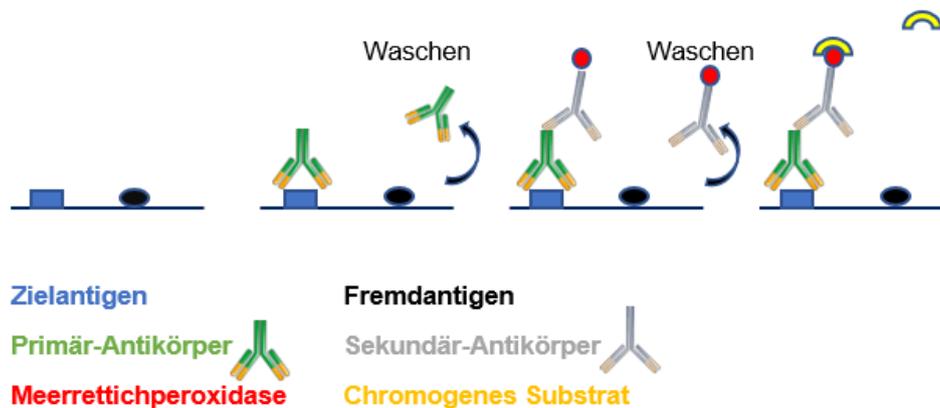


Abbildung 5: Schema eines ELISAs: Der Primär-Antikörper beziehungsweise das Patientenserum (grün) bindet an das Zielantigen (blau). Die überschüssigen ungebundenen Antikörper werden durch das Waschen entfernt. Ein enzymgekoppelter Sekundär-Antikörper (hellgrau) kann an den Antigen-Antikörper-Komplex binden und über ein chromogenes Substrat (gelb) nachgewiesen werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Appeltshauer (Appeltshauer L., 2018), lizenziert unter CC BY NC SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Appeltshauer. Erstellt mit Inkscape und SmartServier.

2.3.2.2 Subklassen-ELISA und Titerbestimmung

Zur Charakterisierung der Antikörper gegen paranodale Proteine wurden bei positiven Patienten/Patientinnen Subklassentests durchgeführt.

Bei diesem ELISA-basierten Verfahren wurden IgG-Subklassenspezifische Sekundär-Antikörper gegen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 verwendet. Bei diesen handelt es sich um HRP-konjugierte *Peroxidase-Mouse Monoclonal Anti-Human IgG1 Fc* 1:1.000, *anti-IgG2* in 1:4.000, *anti-IgG3* in 1:3.000 und *anti-IgG4 Fc* in 1:2.000-Verdünnung.

Es wurde, analog zum normalen ELISA unter 2.3.2, eine 96 Well Platte mit Neurofascin-155 oder Contactin-1 beschichtet. Dabei wurden zwei Wells unbeschichtet belassen. Nach einem Blockierschritt folgte die Zugabe des Primär-Antikörpers in 1:100 in Blocklösung verdünnt sowie die Inkubation für eine Stunde bei 37 °C.

Als Negativkontrolle wurden Wells ohne Primär-Antikörper nur mit 100µl Blocklösung in Duplets beschichtet und die Subklassenspezifischen Antikörper im nächsten Schritt zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. TMB und Schwefelsäure wurden wie beim ELISA hinzugefügt.

Bei der Auswertung wurde der Mittelwert der Duplets gebildet und jeweils der Mittelwert der Wells mit jeweiligem Sekundär-Antikörper ohne Patientenserum subtrahiert.

Um einen Antikörpertiter der Patienten/Patientinnen zu bestimmen, wurde eine Verdünnungsreihe des Serums in Blocklösung in 1:100, 1:200, 1:500, 1:1.000, 1:2.500, 1:5.000, 1:7.500, 1:10.000 und 1:20.000-Verdünnung gebildet. Diese Verdünnungen wurden jeweils in Duplets als Primär-Antikörper aufgetragen. Als Sekundär-Antikörper diente der normale, gegen humanes IgG gerichtete Antikörper. Als Negativkontrolle wurde Kontrollserum in den gleichen Verdünnungen inkubiert.

Als Titer wurde die Verdünnung festgelegt, bei der die Optische Dichte gerade noch über dem Grenzwert liegt.

2.3.2.3 Berechnung der angepassten Verdünnung an den Neurofascin-IgG Titer
Aufgrund der unterschiedlichen Titer der positiven Patienten/Patientinnen mussten neue Verdünnungen mit gleichem Gehalt an spezifisch gegen Neurofascin-155 gerichteten Antikörpern berechnet werden, um zwischen den positiven Probanden korrelieren zu können.

Dazu wurde die OD der positiven Patientenseren in einer Verdünnung von 1:500, 1:1.000, 1:1.500 und 1:2.000 getestet. Die OD's jeder Verdünnung der Patienten/Patientinnen wurden ins Verhältnis gesetzt und der Mittelwert gebildet. Die optimale Verdünnung der Seren wurde dann, wie in untenstehender Tabelle aufgeführt, rechnerisch an das Verhältnis angepasst.

OD im IgG-ELISA				
A Patienten	1:500	1:1.000	1:1.500	1:2.000
Patient 1	1,484	0,953	0,652	0,508
Patient 2	3,034	2,243	1,646	1,313
Patient 3	3,009	2,956	2,592	2,931
Patient 4	2,630	1,704	1,441	1,238
Patient 5	2,475	2,458	1,387	1,573
Patient 6	1,405	0,845	0,636	0,480

Tabelle 16: Optische Dichten der Patienten/Patientinnen in verschiedenen Verdünnungen.

OD im IgG-ELISA						
B Verhältnisse	1:500	1:1.000	1:1.500	1:2.000	Mittelwert	Kehrwert
Pat. 5 / 4	0,941	1,442	0,963	1,270	1,154	0,866
Pat. 5 / 1	1,668	2,579	2,129	3,095	2,368	0,422
Pat 5 / 6	1,762	2,911	2,181	3,276	2,532	0,395
Pat 5 / 3	0,823	0,832	0,535	0,537	0,681	1,467
Pat 5 / 2	0,816	1,096	0,843	1,198	1,007	0,993
Pat 4 / 1	1,773	1,788	2,212	2,437	2,052	0,487
Pat 4 / 6	1,872	2,018	2,266	2,579	2,184	0,458
Pat 4 / 3	0,874	0,577	0,556	0,422	0,648	1,543
Pat 4 / 2	0,867	0,760	0,876	0,943	0,905	1,105
Pat 1 / 6	1,056	1,123	1,024	1,058	1,067	0,937
Pat 1 / 3	0,493	0,322	0,251	0,173	0,333	3,001
Pat 1 / 2	0,489	0,425	0,396	0,387	0,438	2,283
Pat 6 / 3	0,467	0,286	0,243	0,164	0,315	3,171
Pat 6 / 2	0,463	0,377	0,386	0,366	0,414	2,414
Pat 3 / 2	0,992	1,318	1,575	2,232	1,612	0,620

Tabelle 17: Verhältnisse der Optischen Dichten der Patientenseren in verschiedenen Verdünnungen (Spalte 2 bis 5) mit Mittel- und Kehrwert (Spalte 6 und 7) zur Berechnung der optimalen Verdünnung und weiteren Korrelation zwischen den Patientenseren.

Basierend auf einer Verdünnung von 1:100 für Patientin 5 wurden die Verdünnungen der anderen Erkrankten anhand der Mittelwerte der Verhältnisse berechnet. Dabei wurden auf Grundlage der Verdünnung von jedem/jeder Patienten/-in die Verdünnungen der anderen berechnet, indem zum Beispiel Patient 4 durch den Mittel- oder Kehrwert von Patient/-in x in Relation zu Patient/-in 2 geteilt wurde.

Somit erhielt man für jeden/jede Patienten/-in sechs Berechnungen der Verdünnungswerte (siehe Tabelle 18).

Berechnete Verdünnung basierend auf Patientin 5						
	Pat 5/Patx	Pat 4/Patx	Pat 1/Patx	Pat 6/Patx	Pat 3/Patx	Pat 2/Patx
Patient 1	1:42	1:42	1:42	1:42	1:49	1:64
Patient 2	1:100	1:96	1:96	1:95	1:91	1:99
Patient 3	1:147	1:137	1:127	1:125	1:147	1:237
Patient 4	1:87	1:87	1:87	1:86	1:95	1:90
Patientin 5	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
Patient 6	1:39	1:40	1:40	1:40	1:46	1:41

Tabelle 18: Berechnete Verdünnung für Patienten/Patientinnen 1 bis 6 basierend auf einer 1:100-Verdünnung des Patientenserum 5.

Die Patientenseren wurden anschließend in verschiedenen Verdünnungen mittels ELISA jeweils mit zwei Sekundär-Antikörpern (einmal dem humanen IgG Sekundär-Antikörper und einem Fab spezifischen Sekundär-Antikörper, der für die ELISAs mit IVIG benutzt wird) getestet. Die Verdünnungen mit vergleichbaren Optischen Dichten wurden daraufhin als optimale Verdünnungen festgesetzt.

Für den Komplementbindungsassay (KBA) wurde die Hälfte der Verdünnungen festgelegt.

	Verdünnung ELISA	Verdünnung KBA
Patient 1	1:50	1:25
Patient 2	1:120	1:60
Patient 3	1:240	1:120
Patient 4	1:80	1:40
Patientin 5	1:100	1:50
Patient 6	1:20	1:10

Tabelle 19: Optimale Verdünnungen der Patienten/Patientinnen 1 bis 6 für den ELISA (Spalte 2) und Komplementbindungsassay (Spalte 3).

2.3.3 Komplementbindungsassay mit C1q

In dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Komplementinteraktion bei Antikörperbindung gelegt. Dazu wurde ein ELISA-basiertes Verfahren zur Prüfung der

Komplementablagerung bei den positiven Patientenseren sowie Kontrollen durchgeführt.

Am ersten Tag wurde, wie für den ELISA unter 2.3.2 beschrieben, mit dem Zielprotein Neurofascin-155 beschichtet. Dieses wurde in einer Konzentration von 5µg/ml in PBS verdünnt und mit 100µl pro Well aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde die Hälfte der 96 Well Platten unbeschichtet belassen. Die Platte wurde daraufhin bei +4 °C über Nacht inkubiert.

Am zweiten Tag wurde viermal mit Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween20) gewaschen und ausgeklopft. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungen wurde 200µl Blocklösung pro Well hinzugefügt und für zwei Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Primär-Antikörper verdünnt. Hierzu wurden die unter 2.3.2.3 berechneten Verdünnungen für den KBA für die positiven Patienten/Patientinnen verwendet. Die verdünnten Seren wurden nach vier Waschschritten in jeweils vier Wells auf beschichteter und auf unbeschichteter Seite mit 100µl pro Well beschichtet. Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit Blocklösung und als Normalkontrolle dienten die in die Studie einbezogenen Kontrollseren. Der Primär-Antikörper wurde daraufhin über Nacht bei +4 °C inkubiert.

Am dritten Tag wurde die Platte sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft, um überschüssige Substanzen zu entfernen. Daraufhin wurde der Komplementfaktor C1q in 10µg/ml mit Blocklösung hinzugegeben. Hierbei wurden immer zwei Wells pro Patientenserum ohne C1q nur mit Blocklösung und jeweils zwei Wells mit C1q beschichtet. Die Inkubationszeit betrug hierbei zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

Anschließend wurde erneut sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und geklopft und der Sekundär-Antikörper in 1:200-Verdünnung in Blocklösung verdünnt und hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um einen gegen das C1q gerichteten Sekundär-Antikörper. Dieser wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler auf der Platte belassen und es wurden daraufhin in vier Waschschritten die überschüssigen Immunglobuline entfernt. Ähnlich wie bei dem ELISA wurde als chromogenes Substrat 100µl TMB hinzugegeben und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert, woraufhin 50µl H₂SO₄ zum Stoppen der Reaktion zugefügt wurde. Im Anschluss konnte die Platte bei 450nm im ELISA Reader ausgewertet werden.

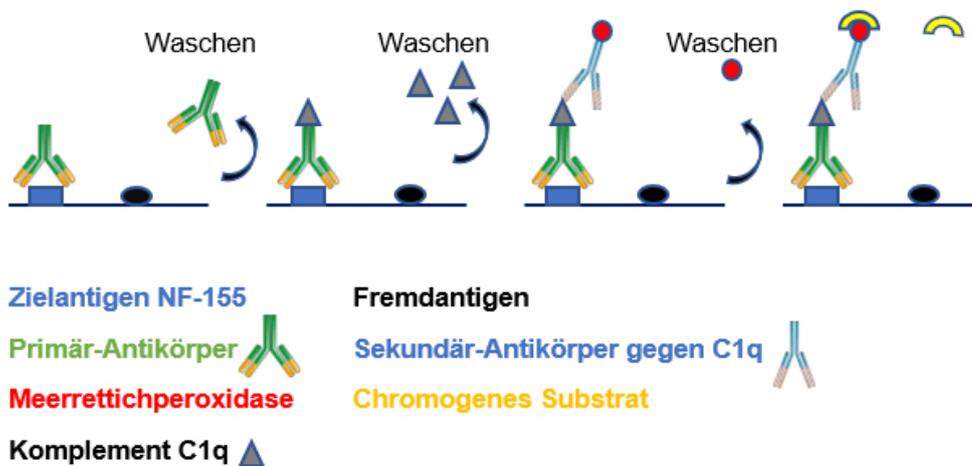


Abbildung 6: Schema eines ELISA-basierten Komplementbindungsassays: Der Primär-Antikörper (grün) bindet an das Zielantigen NF-155 (blau). Ein gebundener Antigen-Antikörperkomplex kann über das Fc-Fragment hinzugefügtes C1q (grau) binden. Überschüssige nicht gebundene Antikörper und C1q Komplement werden durch Waschschriffe entfernt. In einem weiteren Schritt kann ein Meerrettichperoxidase(rot)-markierter Sekundär-Antikörper (hellblau) gebundenes C1q binden und über eine Farbreaktion nachweisen. Die Abbildung wurde modifiziert nach Appeltshauer (Appeltshauer L., 2018), lizenziert unter CC BY NC SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Appeltshauer. Erstellt mit Inkscape und SmartServier.

Die Werte der Optischen Dichten wurden in eine Excel Tabelle eingefügt. Hier wurde der Mittelwert der Duplets mit Patientenserum und C1q gebildet und davon der Mittelwert der Duplets mit Patientenserum ohne C1q abgezogen.

Als Grenzwert wurde für jeden Patienten anhand von zehn Kontrollseren ein eigener Grenzwert gebildet. Die Kontrollseren wurden in der unter 2.3.2.3 berechneten Verdünnung des jeweiligen Patientensersums mit und ohne C1q getestet. Der Grenzwert wurde aus dem Mittelwert plus fünfmal die Standardabweichung der Kontrollen berechnet.

2.3.4 ELISA mit IVIG Zugabe

Zur Detektion eines möglichen verdrängenden Effekts durch IVIG, wurde IVIG als Zusatzschritt im ELISA hinzugefügt. Als mögliche Pathomechanismen kommt ein Besetzen des Zielproteins durch IVIG und kompetitive Hemmung der Bindung oder die Neutralisierung der Antikörper in Frage. Bei den folgenden Versuchen wurde jeweils eine Platte mit IVIG und eine Platte mit BSA als Kontrolle inkubiert. Es wurde *Privigen® IVIG*

100mg/ml Infusionslösung (10 %) verwendet. Dieses wurde 1:1 mit Blocklösung verdünnt, um P-IVIG in einer Konzentration von 50mg/ml zu erhalten. Diese Lösung wurde immer weiter in 1:1 mit Blocklösung bis zur Konzentration 0,78mg/ml verdünnt. 100mg BSA wurden als Trockenpulver in 2 ml Blocklösung verdünnt und eine identische Verdünnungsreihe von 25mg/ml bis 0,78mg/ml erstellt. Diese Konzentrationen wurden gewählt, da sie dem physiologischen Anstieg von IgG nach IVIG-Therapie entsprechen, siehe Kapitel 1.1.5.1 (Appeltshauser L., 2018).

2.3.4.1 Präinkubation von IVIG/BSA vor Primär-Antikörper

Der ELISA wurde, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, durchgeführt und es wurde als zusätzlicher Schritt nach Inkubation mit Blocklösung auf zwei verschiedenen Platten 100µl IVIG oder BSA in den Verdünnungen 25mg/ml, 12,5mg/ml, 6,25mg/ml, 3,125mg/ml, 1,563mg/ml und 0,78mg/ml jeweils als Duplets für 30 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Hierdurch sollte untersucht werden, inwiefern IVIG mögliche Antikörper-bindende Epitope besetzt und so die Bindung pathologischer Antikörper an ihr Zielprotein verhindert. Nach achtmaligem gründlichen Waschen mit Waschpuffer wurde im nächsten Schritt das Patientenserum in den unter 2.3.2.3 berechneten Verdünnungen für den ELISA hinzugefügt. Als Positivkontrolle diente der 1:1.000 verdünnte *Anti-Pan-Neurofascin antibody anti-human/mouse/rat*. Jedes Patientenserum wurde dementsprechend in den oben aufgeführten Konzentrationen für eine weitere Stunde bei 37 °C unter Agitation inkubiert. Die weiteren Schritte sind identisch mit dem unter 2.3.2 beschriebenen ELISA mit der Ausnahme, dass bei den ELISAs mit IVIG/BSA, aufgrund des geringeren Hintergrunds, der Fab spezifische *Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific* Sekundär-Antikörper in 1:150.000-Verdünnung verwendet wurde. Die Platte, die mit BSA inkubiert wurde, fungierte als Negativkontrolle.

2.3.4.2 Koinkubation von IVIG/BSA mit Primär-Antikörper

Zur Detektion einer möglichen kompetitiven Hemmung der Patientenantikörper durch die Immunglobuline wurde IVIG beziehungsweise BSA als Kontrolle mit dem Patientenserum koinkubiert. Die ersten Schritte bis zur Blockierung der ELISA Platten sind identisch mit den unter 2.3.2 beschriebenen. Während die beiden ELISA Platten bei 37 °C mit Blocklösung inkubiert wurden, wurde IVIG/ BSA in den oben genannten Konzentrationen mit dem Patientenserum in Eppendorfgefäßen für eine Stunde bei 37 °C unter Agitation inkubiert. Als Positivkontrolle diente hier ebenfalls der *Anti-Pan-Neurofascin antibody anti-human/mouse/rat* in 1:1.000-Verdünnung. IVIG

beziehungsweise BSA wurde wieder in verschiedenen Konzentrationen, beginnend mit 50mg/ml, die dann weiter bis 0,78mg/ml halbiert wurden, in Blocklösung verdünnt. Um die gleiche Menge IVIG bei jedem Patienten hinzuzufügen, wurde das Patientenserum auf 30µl mit Blocklösung in der jeweiligen Verdünnung vorverdünnt und diese Lösung in 1:10-Verdünnung mit 270µl IVIG/BSA gemischt.

Nach Inkubation und zweimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der in IVIG/BSA und Blocklösung verdünnte Primär-Antikörper in Duplets nach Belegungsplan aufgetragen und für eine weitere Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Nach diesem Schritt wurde achtmal gründlich mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft, um die überschüssigen Immunglobuline zu entfernen. Die weiteren Schritte bis zur Auswertung sind identisch mit den unter Kapitel 2.3.2 beschriebenen. Als Sekundär-Antikörper wurde auch hier der *Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific* in 1:150.000-Verdünnung verwendet.

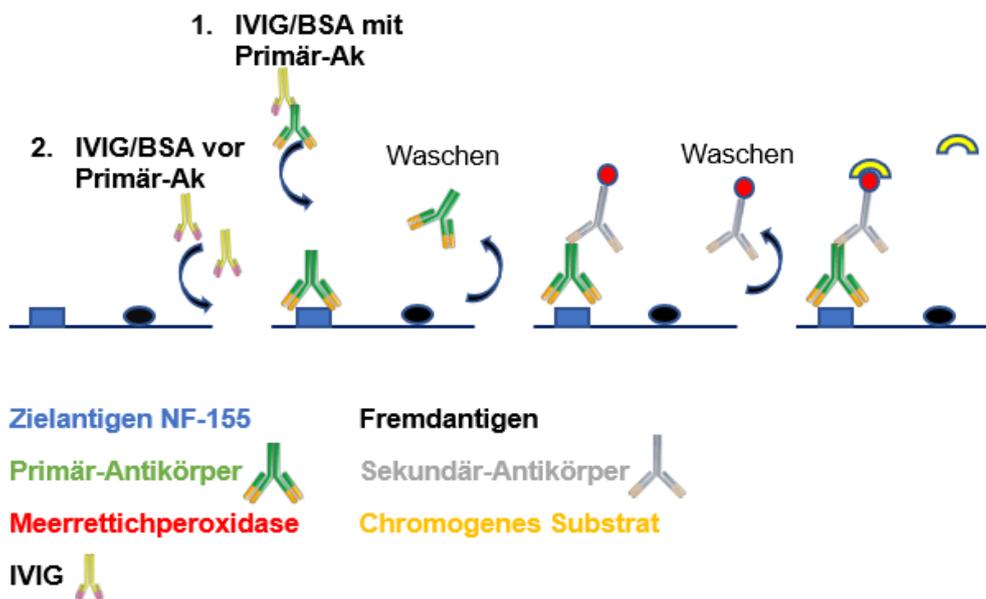


Abbildung 7: Schema des ELISAs mit Zugabe von IVIG/BSA: Es wurde zum einen IVIG/BSA (gelb/lila) vor Zugabe des Primärantikörpers (grün) und zum anderen zusammen mit dem Primär-Antikörper zum Zielantigen (blau) hinzugefügt. Die überschüssigen ungebundenen Antikörper werden durch das Waschen entfernt. Ein enzymgekoppelter (rot) Sekundär-Antikörper (hellblau) kann an den Antigen-Antikörper-Komplex binden und über ein chromogenes Substrat (gelb) nachgewiesen werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Appeltshauer (Appeltshauer L., 2018), lizenziert unter CC BY NC SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Appeltshauer. Erstellt mit Inkscape und SmartServier.

2.3.5 ELISA mit Fab Fragmenten

Um die Interaktion zwischen Autoantikörpern und IVIG genauer zu untersuchen, wurden oben beschriebene ELISAs zudem mit aufgereinigten Fab-Fragmenten eines seropositiven Patienten durchgeführt.

Die Fab-Fragmente wurden durch Dr. L. Appeltshauer aus aufgereinigtem IgG-Material (Herstellung Protokoll Sommer et al 2005) mit dem *Pierce™ F(ab')₂ Preparation Kit* der Firma Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers gewonnen, per ELISA verifiziert und danach zur Verfügung gestellt (#44988, #44985, Thermo Fisher Scientific) (Gruner et al., 2021). Nach Herstellerprotokoll beruht das Verfahren auf immobilisiertem Papain, einer unspezifischen Endopeptidase, die zur enzymatischen Spaltung humaner IgG Antikörper oberhalb der Gelenkregion führt. In Einwegzentrifugationssäulen werden F(ab')₂ Fragmente mit zwei Disulfidbrücken und mehrere Peptide der Fc Region produziert. Diese Verdauungsreaktion kann durch Entfernen des Agarosegranulatharzes

gestoppt werden. Mithilfe der im Kit enthaltenen Protein-A-Zentrifugationssäulen können reine Fab Fragmente gewonnen werden, in dem Protein A unverdaute IgG sowie Fc-Fragmente bindet. Nach den beschriebenen Angaben des Herstellerprotokolls wurden Fab Fragmente des Serums von Patient 3 gewonnen.

In einem ersten Schritt wurde das Patientenserum von Patient 3 in verschiedenen Verdünnungen mit den aufgereinigten Fab Fragmenten und dem reinen IgG in verschiedenen Verdünnungen getestet, um vergleichbare Optische Dichten zu erhalten. Die Versuchsdurchführung entspricht den unter 2.3.2 beschriebenen Schritten des ELISAs. Als Positivkontrolle diente der *Anti-Pan-Neurofascin antibody anti-human/mouse/rat* in 1:1.000-Verdünnung. Als Normalkontrolle wurde das Serum einer gesunden Kontrolle analog zum Patientenserum aufgereinigt und in der gleichen Verdünnung wie die Patientenproben als Primär-Antikörper in Duplets verwendet. Als Sekundär-Antikörper für die Fab aufgereinigten Proben diente der *Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific* in 1:100.000-Verdünnung. Folgende Tabelle zeigt die optimalen Verdünnungen mit vergleichbaren ODs.

Probe	Serum Patient 3	Fab Patient 3	IgG Patient 3
Verdünnung	1:240	1:7,5	1:50
Optische Dichte	1,167	1,069	1,161

Tabelle 20: Optische Dichten (Zeile 3) im Fab-ELISA für die Testung von Serum, aufgereinigten Fab Fragmenten und reinem IgG des Patienten 3. In Zeile 2 sind die verwendeten Verdünnungen der verschiedenen Substanzen aufgelistet.

In diesen Verdünnungen wurden, analog zu den Schritten unter 2.3.4, ELISAs mit Koinkubation des Primär-Antikörpers mit IVIG oder BSA in den Konzentrationen 25mg/ml bis 0,78mg/ml und ohne IVIG/BSA Zugabe durchgeführt.

2.3.6 KBA mit IVIG Zugabe

Zur Prüfung der Hypothese, dass IVIG die Komplementreaktion beeinflusst, wurde IVIG beziehungsweise als Kontrolle BSA oder Milchpulver in den oben genannten Konzentrationen von 25mg/ml bis 0,78mg/ml auch an verschiedenen Zeitpunkten zum Komplementbindungsassay hinzugegeben. Hierbei wurde sowohl die Präinkubation als

auch die Koinkubation von IVIG mit dem C1q untersucht, um eine mögliche Reduktion oder Neutralisierung der Komplementablagerung zu detektieren. Analog zum ELISA unter 2.3.4 wurde *Privigen®* IVIG in 100mg/ml und BSA Trockenpulver verwendet und eine Verdünnungsreihe erstellt. Da sich nach ersten Versuchen das BSA als ungeeignete Kontrollsubstanz zeigte, vermutlich da C1q an das unspezifisch gebundene BSA bindet (Onica et al., 1983), wurde als Kontrollsubstanz Milchpulver verwendet. Das Milchpulver wurde als Trockenpulver in 25mg/ml in Blocklösung verdünnt und dann eine Verdünnungsreihe bis 0,78mg/ml nach oben beschriebenen Schema erstellt.

2.3.6.1 Präinkubation gebundener Antikörper mit IVIG/Milchpulver vor C1q

Die ersten Schritte sind identisch mit dem unter 2.3.3 beschriebenen Komplementbindungsassay. Es wurden hier wieder zwei Platten mit Neurofascin-155 beschichtet.

Am dritten Tag des Versuchs wurde, nach sechsmaligem Waschen mit Waschpuffer und sorgfältigem Ausklopfen, IVIG beziehungsweise Milchpulver in Blocklösung verdünnt und eine oben beschriebene Verdünnungsreihe von 25mg/ml bis 0,78mg/ml hergestellt. 100µl pro Well wurden von der jeweiligen IVIG/Milchpulver Konzentration in Duplets zu den jeweiligen Wells mit Patientenserum oder Kontrollserum hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Jedes Patientenserum wurde auch ohne IVIG beziehungsweise Milchpulver nur mit Blocklösung beschichtet. Anschließend wurde der Komplementfaktor C1q in einer Konzentration von 10µg/ml für zwei Stunden inkubiert und der gegen C1q gerichtete Sekundär-Antikörper verwendet. Die weiteren Schritte sind identisch mit dem unter 2.3.3 beschriebenen KBA.

Der gleiche Versuch wurde auch mit einem Kontrollserum durchgeführt, das in allen Patientenverdünnungen inkubiert und auch mit IVIG oder Milchpulver in den gleichen Konzentrationen wie das Patientenserum getestet wurde.

2.3.6.2 Koinkubation von IVIG/Milchpulver mit C1q

Ähnlich wie beim ELISA mit IVIG/BSA Zugabe, wurde auch beim Komplementbindungsassay eine Koinkubation durchgeführt. Hier wurde allerdings IVIG/Milchpulver mit dem C1q koinkubiert. Am dritten Tag des Komplementbindungsassays wurde C1q in einer Konzentration von 10µg/ml mit IVIG oder Milchpulver in den oben beschriebenen Verdünnungen von 25mg/ml bis 0,78mg/ml und einmal ohne IVIG/Milchpulver nur mit Blocklösung in Eppendorfgefäßen gemischt und für eine Stunde präinkubiert. Diese Lösungen wurden, nach sechsmaligem

Waschen und Klopfen der Platte, nach Belegungsplan in Duplets bei allen Patienten sowie Kontrollen hinzugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Agitation inkubiert. Es wurde achtmal gründlich gewaschen und geklopft und der gegen C1q gerichtete Sekundär-Antikörper zugegeben. Die weiteren Schritte sind identisch mit dem unter 2.3.3 beschriebenen Protokoll des Komplementbindungsassays.

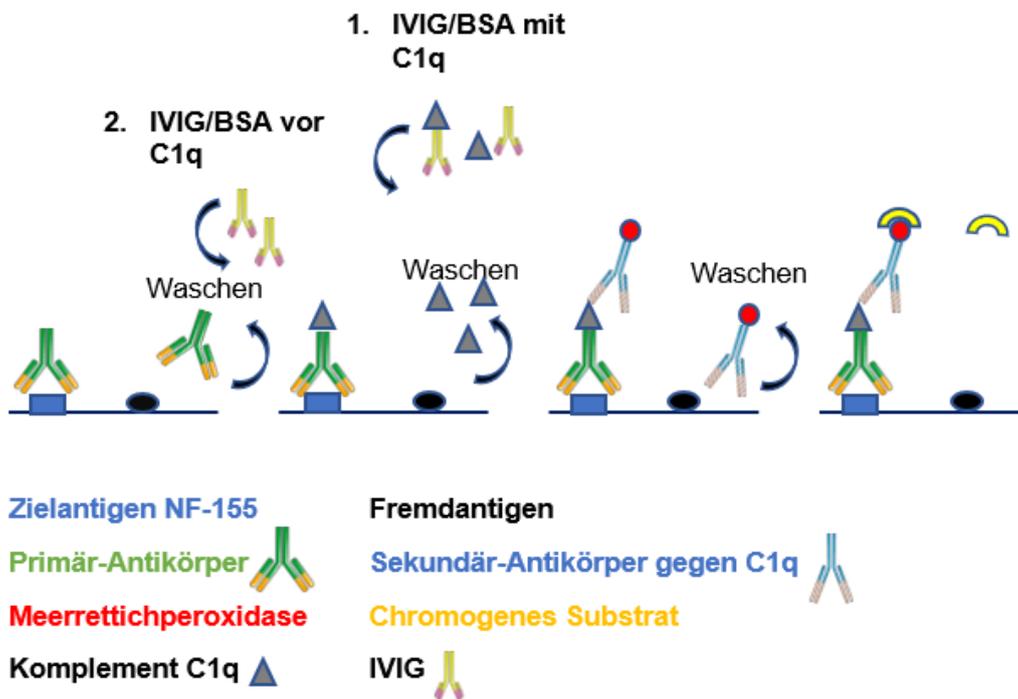


Abbildung 8: Schema des KBAs mit Zugabe von IVIG/BSA: Erst wurde wie im normalen ELISA der Primär-Antikörper (grün) zu dem Zielantigen (blau) hinzugefügt. Anschließend wurde zum einen IVIG/BSA (gelb/lila) vor Zugabe des C1q (grau) und zum anderen zusammen mit dem C1q (grau) hinzugefügt. Die überschüssigen ungebundenen Antikörper werden durch das Waschen entfernt. Ein enzymgekoppelter (rot) Sekundär-Antikörper (hellblau) kann an gebundenes C1q binden und über ein chromogenes Substrat (gelb) nachgewiesen werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Appeltshauer (Appeltshauer L., 2018), lizenziert unter CC BY NC SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Appeltshauer. Erstellt mit Inkscape und SmartServier.

2.3.7 HEK-293-Zellkultur

Zur Detektion von Antikörpern gegen paranodale Strukturen wurden immunhistochemische Färbungen an HEK-293-Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine etablierte humane embryonale Nierenepithelzelllinie, die sich nach

Transfektion mit Ziel-DNA zur immunhistochemischen Färbung eignet und so die Bindung von Antikörpern mit dem Zielprotein nachweisen kann (Appeltshauser L., 2018).

2.3.7.1 Kultivierung

Die verwendeten Materialien und Puffer sind in den Tabellen 12 und 13 aufgelistet. Die Zellen wurden in *Gibco™ Fetal Bovine Serum (FBS)* mit 10 % *DMSO* eingefroren und im Stickstoffschränk bei -80 °C kryokonserviert. Zum Auftauen wurde der Kryostock kurz im 37 °C warmen Wasserbad angetaut, um anschließend die aufgetaute Zellsuspension in ein vorbereitetes Falcon mit 5ml vorgewärmtem HEK-Medium zu pipettieren. Daraufhin wurde bei 800rpm fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2ml HEK-Medium gelöst und in eine 75cm² Zellkulturflasche mit 39ml HEK-Medium gegeben. Im *Heracell™ 150i CO2-Inkubator* konnten die Zellen bei 5 % CO₂ und 37 °C wachsen.

In der ersten Woche wurden noch keine Versuche mit den HEK-Zellen durchgeführt.

2.3.7.2 Splitten und Aussäen

Ab der zweiten Woche wurden die Zellen zweimal pro Woche neu ausgesät, bis sie nach Erreichen der 20. Passage verworfen wurden. Nach Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop wurde das Medium abgesaugt und mit 2-3ml PBS Dulbecco gewaschen. Zum Lösen der Zellen von der Kulturflasche wurde 1ml Trypsin zugegeben und für zwei Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen wurden die Zellen abgelöst, mit 10ml HEK-Medium ab gespült und in ein 50ml Falcon gegeben. Bei 800rpm wurden die Zellen fünf Minuten bei Raumtemperatur von 23 °C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das übrig gebliebene Pellet in 10ml HEK-Medium gelöst. Zur Berechnung der Konzentration von 1,5 bis 2 Millionen Zellen pro 75m²-Zellkulturflasche wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau in einem Eppendorfgefäß gemischt und 10µl der Suspension in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Die Zellen wurden anschließend mit dem *Inversmikroskop CKX41* ausgezählt, der Mittelwert gebildet, verdoppelt und mit dem Kammerfaktor von 10.000 multipliziert. Die Menge an benötigter Zellsuspension berechnete sich durch die gewünschte Zahl an Zellen durch die gezählte Anzahl. Die berechnete Menge wurde anschließend in einem Falcon mit HEK-Medium verdünnt und 1ml bis 1,5ml der Zellsuspension in eine neue Flasche mit 10ml HEK-Medium hinzugefügt und im Brutschrank inkubiert. Am Vortag der Aussaat wurde eine 24 Well-Platte mit Deckgläschen in der Größe 12mm belegt. Diese wurden anschließend mit 150µl Poly-D-Lysin beschichtet und für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen und zweimaligem Waschen mit Aqua ad

infectabilia wurde die Platte über Nacht getrocknet. Zum Aussäen wurden dann 200µl der Zellsuspension auf mit PDL überzogene 12mm-Deckgläschen in eine 24-Well-Platte pipettiert und vorsichtig im Brutschrank über Nacht inkubiert.

2.3.7.3 Transfektion mit Fremd-DNA

Um im Patientenserum Antikörper gegen paranodale Proteine nachzuweisen, werden die Zellen mit Fremd-DNA des Zielproteins transfiziert. Dazu wird die Calcium-Präzipitationsmethode verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Ausfällung von Calcium-Phosphat-Kristallen mit der Fremd-DNA, die anschließend über unspezifische Endozytose in die Zellen aufgenommen und in das Genom integriert werden kann (Appeltshauser L., 2018). Somit wird das Zielprotein an der Zelloberfläche der HEK-Zellen exprimiert und es kommt bei Zugabe von Antikörpern gegen das Protein zur Bindung, die immunhistochemisch nachgewiesen werden kann.

Nachdem die Zellen, wie unter 2.3.7.2 beschrieben, auf die Deckgläschen ausgesät wurden, wurde ein Transfektionsansatz je nach Anzahl an Wells hergestellt. Pro Transfektionsansatz wurde ein Eppendorfgefäß bereitgestellt. Für die Versuche in dieser Arbeit wurde mit DNA-Plasmiden von humanem NF-155 (Ng et al., 2012) und CNTN-1 (Peles et al., 1995) transfiziert, welche unserem Labor freundlicherweise von den Kooperationspartnern Prof. Elior Peles, PhD Sulayman D. Dib-Hajj, MD Stephen G. Waxman, PhD Dr. Judy Ng sowie Prof. Dr. E. Meinel bereitgestellt und durch Prof. Dr. Carmen Villmann vermehrt wurden. Die Herstellung und Retransformation der Plasmide wurde in bereits veröffentlichten Arbeiten beschrieben (Doppler et al., 2015; Appeltshauser L., 2018). Als Kontrolle wurde die Transfektion mit Green-Fluorescent-Protein (GFP)-Plasmiden durchgeführt (Shimomura, Johnson, & Saiga, 1962). Für den Ansatz wurden gemäß dieser Reihenfolge 0,1 TE Puffer, DNA in Zielkonzentration von 1µg/ml, 2,5M CaCl₂ und HBS tropfenweise verwendet. Die Ansätze wurden vermischt und für fünf Minuten im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, bis eine Trübung sichtbar wurde. Daraufhin wurde der Transfektionsansatz mit 50µl pro Well zu den Zellen gegeben, woraufhin das Medium durch die pH Änderung heller wurde und Präzipitate unter dem Mikroskop sichtbar wurden. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit HEK-Medium gewaschen und zuletzt mit 300µl HEK-Medium über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.3.7.4 Immunhistochemische Färbung

Zunächst wurden die Zellen fixiert, indem das Medium abgesaugt, die Zellen fünf Minuten in PBS Dulbecco gewaschen und anschließend 20 Minuten in 200µl 4 % PFA fixiert wurden. Daraufhin folgten drei weitere Waschschriffe mit PBS für jeweils fünf Minuten.

Im Anschluss folgte die Blockierung, wobei das PBS abgesaugt wurde und die Platte erst für 20 Minuten in 10 % BSA/PBS und dann für fünf Minuten in 1 % BSA/PBS inkubiert wurde.

Nach Absaugen erfolgte die Zugabe des Primär-Antikörpers. Als Positivkontrolle diente der kommerzielle *Anti-Neurofascin antibody, Rabbit polyclonal to Neurofascin*. Die Seren wurden in 2 % BSA/PBS in 1:100 und 1:500 verdünnt und jeweils 200µl pro Well am Rand des Coverslips aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Vor Zugabe des Sekundär-Antikörpers wurde noch dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend der *Cy3 goat anti human IgG Sekundär-Antikörper* in 1:300-Verdünnung und für die Positivkontrolle der *Cy3 goat anti chicken Antikörper* in 1:300 hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur in Alufolie inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zweimal für fünf Minuten mit PBS und einmal in DAPI/PBS in 1:10.000-Verdünnung gewaschen und drei Minuten inkubiert. Das DAPI wurde anschließend abgesaugt und es wurde erneut PBS hinzugegeben. Die Deckgläser wurden vorsichtig auf die Objektträger übertragen, mit Aquapolymount eingedeckelt und mit *CoverGrip Coverslip Sealant* umrandet. Nach Trocknung konnten die Objektträger unter dem *Axiolmager.M2-Mikroskop* betrachtet werden.

2.3.7.5 Einzelfärbung mit Neurofascin-155

Bei positiven Ergebnissen im ELISA und bei den Mäusezupfnerven wurde als Bestätigungstest eine Färbung an HEK-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde wie oben beschrieben mit NF-155-DNA und GFP transfiziert und jeweils 200µl pro Well des Patientenserums in 1:100 und 1:500 Konzentration hinzugegeben. Als Positivkontrolle diente der kommerzielle *Anti-Pan-Neurofascin antibody anti-human/mouse/rat* in 1:1.000-Verdünnung. Das weitere Verfahren ist ähnlich der unter 2.3.7.4 beschriebenen immunhistochemischen Färbung.

2.3.7.6 HEK-293-Zell basierte Komplementbindungsverfahren

Als Bestätigung der Ergebnisse des *in vitro* Komplementbindungsassays wurde auch eine immunhistochemische Färbung mit C1q an HEK-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde als Zusatzschritt der Komplementfaktor C1q hinzugegeben und ein gegen C1q gerichteter Sekundär-Antikörper verwendet. Da bei diesem Versuch eine Doppelfärbung erfolgte, wurde neben dem gegen C1q gerichteten FITC markierten Sekundär-Antikörper auch einer gegen humanes IgG verwendet. Somit kann eine mögliche Kolo-kalisation von Patientenantikörper- und Komplementbindung dargestellt werden.

Die Vorbehandlung der HEK-Zellen bis zur immunhistochemischen Färbung inklusive Fixierung und Blockierung erfolgte analog zum in 2.3.7.4 beschriebenen Verfahren. Das Patientenserum inklusive Normalkontrollen wurde in der fünffachen Verdünnung des KBAs, wie unter 2.3.2.3 berechnet, in Blocklösung verdünnt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschschritten mit PBS wurden 200µl pro Well des C1q in einer Konzentration von 200µg/ml in Blocklösung verdünnt, hinzugegeben und für eine Stunde wieder bei Raumtemperatur unter Agitation inkubiert. Es wurden zwei verschiedene Sekundär-Antikörper verwendet. Zum einen wurde der *Anti C1q FITC* in 1:200-Verdünnung und zum anderen der normale *Cy3-konjugierte anti human IgG* Antikörper in 1:300 in einer Doppelfärbung getestet. Die weiteren Schritte unterscheiden sich nicht von den unter 2.3.7.4 beschriebenen.

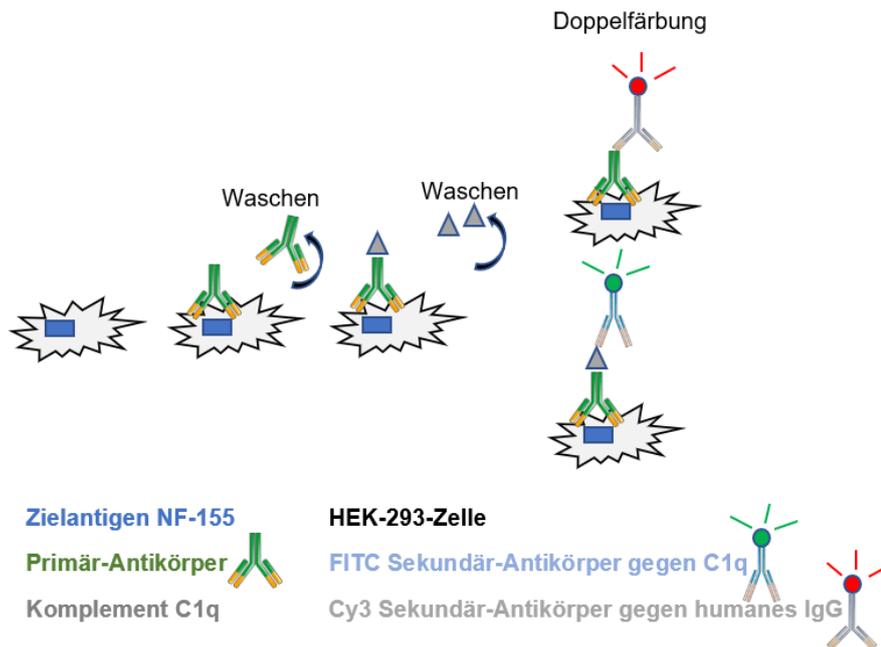


Abbildung 9: Schema des HEK-Zell KBAs: Dargestellt sind HEK-293 Zellen, die das Zielantigen NF 155 (blau) exprimieren. An dieses kann der Primär-Antikörper (grün) binden. In einem weiteren Schritt wird C1q (grau) hinzugefügt. Ein gegen C1q gerichteter Sekundär-Antikörper (hellblau) mit FITC-Fluoreszenzfarbstoff (grün) bindet gebundenes C1q, während ein zweiter Cy3-konjugierter (rot) Anti-IgG Sekundär-Antikörper (hellgrau) den Antigen-Antikörper-Komplex bindet. Über Kolokalisationsstudien kann das Komplementbindungsverhalten hierdurch nachgewiesen werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Appeltshauser (Appeltshauser L., 2018), lizenziert unter CC BY NC SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. L. Appeltshauser. Erstellt mit Inkscape und SmartServier.

2.3.7.7 Zugabe von IVIG

2.3.7.7.1 Koinkubation von IVIG/BSA mit dem Primär-Antikörper

Als Bestätigungstest für die Versuche des ELISAs mit IVIG Zugabe, diente ein vergleichbarer Test an HEK-Zellen. Die Schritte der Kultivierung und der immunhistochemischen Färbung sind identisch mit den unter 2.3.7 beschriebenen.

Als Zusatzschritte wurden jeweils 200µl IVIG beziehungsweise BSA in den Konzentrationen 25mg/ml, 12,5mg/ml, 6,25mg/ml, 3,125mg/ml, 1,563mg/ml und 0,78mg/ml nach der Blockierung und vor Zugabe des Primär-Antikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. In weiteren Versuchen wurde, analog zu den ELISA Versuchen mit IVIG unter 2.3.4.2, auch die Koinkubation der verschiedenen IVIG/BSA Konzentrationen mit den Patientenseren an HEK-Zellen

getestet. Nach ersten Versuchen stellte sich heraus, dass bei IVIG-Zugabe von 50mg/ml der Hintergrund durch die hohe Konzentration an Immunglobulinen zu hoch ist. Dementsprechend wurde in den folgenden Versuchen auf diese Konzentration verzichtet. Im nächsten Schritt wurde das Patientenserum hinzugegeben. Da bei immunhistochemischen Färbungen der HEK-Zellen Verdünnungen des Serums von 1:200 oder 1:500 üblich sind, wurde das Serum in der zehnfachen Verdünnung der berechneten ELISA-Verdünnungen (siehe 2.3.2.3) getestet.

Patient/-in	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Verdünnung	1:500	1:1200	1:2400	1:800	1:1000	1:200

Tabelle 21: Verdünnung der Patientenserum 1 bis 6 in den HEK-Zellversuchen mit IVIG/BSA-Zugabe.

In einem weiteren Test wurde IVIG/BSA mit dem Patientenserum und Kontrollserum koinkubiert. Hierbei wurde der Primär-Antikörper in Blocklösung vorverdünnt und jeweils 270µl IVIG beziehungsweise BSA in den oben aufgeführten Konzentrationen beziehungsweise nur Blocklösung als Kontrolle dazugegeben. Jeweils 200µl von der Lösung wurden pro Well hinzugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde im nächsten Schritt der Cy3-konjugierte Sekundär-Antikörper gegen humanes IgG hinzugegeben. Auf die Färbung mit DAPI folgte dann das Eindeckeln in Aquapolymont.

Um einen falsch positiven Effekt durch eine mögliche Abpufferung des Sekundär-Antikörpers durch IVIG auszuschließen, wurde außerdem die Koinkubation von IVIG/BSA in allen Konzentrationen mit dem Cy3-konjugierten Sekundär-Antikörper getestet.

2.3.7.7.2 Koinkubation von IVIG/BSA mit C1q

Neben der Zugabe von IVIG zum Patientenserum wurden IVIG, BSA und Milchpulver auch zusammen mit dem Komplementfaktor C1q an HEK-Zellen getestet, um eine mögliche Hemmung der Komplementbindung zu untersuchen. Hierbei wurden nach zweistündiger Inkubation der HEK-Zellen mit dem Patientenserum oder Kontrollserum in fünffacher KBA-Verdünnung und nach dreimaligem Waschen in PBS in einem Versuch je 200µl der IVIG/BSA-Lösung in den oben aufgeführten Konzentrationen von 25mg/ml bis 0,78mg/ml für eine Stunde inkubiert. Daraufhin wurden 200µl des Komplementfaktors

C1q in einer Konzentration von 200µg/ml in Blocklösung hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

In einem zweiten Versuch wurde C1q mit IVIG oder BSA in den gleichen sieben Konzentrationen, oder in Blocklösung als Kontrolle, verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Wie unter 2.3.7.6 beschrieben wurde auch hier eine Doppelfärbung mit zwei verschiedenen Sekundär-Antikörpern, einen gegen C1q und einen gegen humanes IgG gerichteten, durchgeführt, um eine Kolo-kalisation nachzuweisen.

2.3.8 LDH-Zytotoxizitäts-Assay

Die Aktivierung der Komplementkaskade führt über verschiedene Serinproteasen terminal zu einem Membranangriffskomplex, der die Zellwand perforieren und zu einer Lyse von Zellen führen kann (Dunkelberger & Song, 2010). Laktatdehydrogenase LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym, das in allen Zellen vorkommt und im Falle einer Zellwandschädigung rasch freigesetzt wird. Das freigesetzte LDH kann hierbei durch einen LDH-Zytotoxizitätsassay über eine Enzymreaktion nachgewiesen werden und infolgedessen Rückschluss auf die Zellyse ermöglichen (Korzeniewski & Callewaert, 1983; Lobner, 2000). Um den Einfluss der Autoantikörper-vermittelten Komplementaktivierung auf die Zellyse zu testen, wurde ein LDH Detection Kit der Firma Roche LH verwendet. Dieser Test ermöglicht, das in einer Zellkultur freigesetzte LDH zu messen, da das Stoppreagens die Zelltransparenz erhöht. Mit Hilfe eines spektrometrischen Mikroplatten Messgerätes (ELISA Reader) ist es möglich eine hohe Anzahl an Wells zu testen. Nach Zugabe und Inkubation einer Testsubstanz zur Zellkultur wird der zellfreie Überstand nach dem Zentrifugieren gewonnen und 30 Minuten mit der Reaktionslösung des Kits inkubiert. Die LDH Aktivität wird laut Herstellerprotokoll durch einen enzymatischen Test gemessen: In einem ersten Schritt wird NAD⁺ durch die LDH-katalysierte Konversion von Laktat zu Pyruvat zu NADH/H⁺ reduziert. In einem zweiten Schritt transferiert der Katalysator Diaphorase das H/H⁺ vom NADH/H⁺ zu Tetrazolium Salz INT, welches dann zu Formazan reduziert wird. Formazan ist wasserdicht und hat ein Absorptionsmaximum bei 500nm, während Tetrazolium keine signifikante Absorption bei dieser Wellenlänge aufweist (Cytotoxicity Detection Kit Plus LDH Version 06, Roche 2011).

Grundsätzlich wurden im LDH-Assay stets eine Background Kontrolle, bestehend aus Zellmedium, eine Low Kontrolle, bestehend aus ausgesäten Zellen und Medium, sowie eine High Kontrolle, bestehend aus ausgesäten Zellen und *Triton X 2 %* zur Steigerung der Zellyse, getestet. Als Positivkontrolle wurde den ausgesäten Zellen eine Lösung, welche aus Muskeln freigesetztes LDH enthält, zugegeben. Außerdem wurde in dem Versuch eine Substanzkontrolle, bestehend aus Medium und der Testsubstanz, untersucht. Alle Kontrollen und Testwerte wurden aufgrund hoher Variabilität der Zellyse in Triplets getestet und zur Auswertung der Mittelwert gebildet. Laut Protokoll des *Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH)* der Firma Roche wurden die Zellen auf einer 96 Well Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Drei Wells wurden nur mit Medium beschichtet und bilden somit die Background Kontrolle. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, um das über Nacht freigesetzte LDH zu entfernen, und 100µl frisches Medium hinzugefügt. Daraufhin wurden 100µl der Testsubstanz beziehungsweise Medium für die Low Kontrolle, TritonX 2 % für die High Kontrolle oder LDH für die Positivkontrolle, hinzugefügt und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die Platte bei 250xg für zehn Minuten zentrifugiert und der zellfreie Überstand abpipettiert, um ihn in eine neue 96 Well ELISA Platte zu pipettieren. In der Zwischenzeit wurde die im Kit beigefügte Reaktionslösung gemischt und hiervon 100µl pro Well hinzugefügt. Die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert, mit 50µl H₂SO₄ gestoppt und anschließend bei einer Wellenlänge von 490nm im ELISA Reader ausgewertet. Anschließend kann über eine Korrelation der OD mit der Menge an freigesetztem LDH die Zellyse bewertet werden.

Um mithilfe des LDH-Zytotoxizitätsassays den Einfluss der Autoantikörper-vermittelten Komplementaktivierung auf die Zellyse zu testen, mussten mehrere Zusatzschritte wie die Transfektion mit NF-155 DNA, die Inkubation mit Patientenserum, sowie die Zugabe von humanem Komplementserum, etabliert werden.

2.3.8.1 Etablierung der Transfektion mit Fremd-DNA

Zunächst wurde getestet, ob die Transfektion mit NF-155 DNA die Zellyse beeinflusst. Auf einer für die Zellkultur geeigneten *Nunclon Delta Surface 96-Well Platte* von Thermo Scientific wurden, nach dem Beschichten mit jeweils 75µl PDL und dem zweimaligen Waschen in *Aqua ad iniectabilia* am Vortag, 15.000 bis 20.000 HEK Zellen in 100µl Medium pro Well ausgesät.

Zum einen wurde der in 2.3.7.3 beschriebene normale Transfektionsansatz, bestehend aus 0,1 TE, NF-155 DNA, CaCl₂ und HBS, für neun Wells an ausgesäten Zellen

zugefügt, um anschließend Low, High und Positivkontrolle der mit NF-155 transfizierten Zellen zu testen. Zum anderen wurde ein Transfektionsansatz ohne NF-155 DNA, bestehend aus den übrigen Komponenten, sowie die Zugabe von ausschließlich Medium, jeweils an einer Reihe aus Low, High und Positivkontrolle getestet. Es wurden 25µl des jeweiligen Ansatzes den Zellen zugefügt und über Nacht inkubiert, um am nächsten Tag nach dem unter 2.3.7 beschriebenen Protokoll getestet zu werden. Hierdurch konnte die Menge an freigesetztem LDH der Zellen mit Transfektionsansatz ohne DNA mit NF-155-transfizierten Zellen und mit untransfizierten Zellen verglichen werden.

2.3.8.2 Etablierung der Inkubation mit Patientenserum

Nachdem die Transfektion der Zellen mit NF-155 DNA keinen großen Einfluss auf die Zelllyse hatte, wurden die Zellen nach dem Aussäen und der Transfektion mit NF-155 DNA am nächsten Tag zweimal mit Medium gewaschen und eine weitere Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen. Zum einen wurden Reihen an Low, High und Positivkontrollen mit und ohne 20-minütiges Blockieren in unterschiedlichen zehnpromzentigen Blocklösungen, mit anschließendem fünfminütigen Blockieren in einpromzentigen Lösungen getestet, um den Einfluss des Blockierschrittes auf die Zelllyse darzustellen. Die unblockierten Reihen wurden in der Zwischenzeit mit Medium inkubiert. Zum anderen wurde auch das Patientenserum in unterschiedlichen Lösungen verdünnt, um eine Verdünnungslösung zu finden, die nicht zur Zytotoxizität beiträgt und so das Ergebnis nicht verfälschen kann. Das Patientenserum wurde 1:100 in BSA/PBS 2 %, an anderen Reihen nur in Medium verdünnt und in Reihen mit und ohne vorherige Blockierschritte mit BSA/PBS 10 % und 1 % getestet. Außerdem wurde das Patientenserum noch in Medium/BSA 2 % in 1:100 verdünnt und an Reihen mit und ohne Blockierschritte mit Medium/BSA 10 %, beziehungsweise 1 %, getestet. Nach Zugabe des Patientenserums nach dem Belegungsplan wurde die Platte zwei Stunden im Brutschrank, unter enger Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop, inkubiert. Anschließend folgte die Testung der Zytotoxizität nach dem unter 2.3.8 beschriebenen Procedere. In weiteren Testungen wurden die Patienten- und Kontrollseren in 1:100 und 1:20-Verdünnung an den Zellen getestet.

2.3.8.3 Etablierung der Inkubation mit humanem Komplementserum

Nachdem die optimale Verdünnung des Patientenserums etabliert wurde, folgte die Einführung des Komplementserums in das Protokoll.

Das Komplementserum diente in diesem Versuch als Testsubstanz und wurde parallel mit dem Medium, *Triton X 2%* und LDH für zwei Stunden im Brutschrank, unter mehrmaliger Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop, inkubiert. Die Inkubationszeit wurde mit zwei Stunden ausreichend gewählt, um erst die Antikörperbindung an die HEK-Zellen und anschließend die Komplementreaktion, die schon nach 30 Minuten abgeschlossen ist, zu ermöglichen (Bondza et al., 2017; Inoshita et al., 2012). Das humane Komplementserum wurde 1:1 und 1:4 in Medium verdünnt, und auch unverdünnt, den Zellen mit vorheriger Inkubation mit Patientenserum und Kontrollserum zugefügt. Außerdem wurde die Substanzkontrolle 1 getestet, indem das humane Komplementserum den Wells mit ausschließlich Medium zugegeben wurde. Eine weitere Substanzkontrolle 2 mit 100µl Zellen mit humanem Komplementserum in 1:4 wurde getestet.

Zum Test der Hypothese, ob eine vorherige Inkubation mit dem Komplementfaktor C1q die Komplementbindung verstärkt, und somit auch zu einer gesteigerten Zelllyse führt, wurde ein Zusatzschritt mit C1q vor Zugabe der Testsubstanz eingefügt. Das C1q wurde hierbei in 200µg/ml in Medium verdünnt und den Testzellen, nach zweistündiger Inkubation mit dem Patienten- oder Kontrollserum, zugegeben. Als Kontrolle wurde Medium zugegeben und auch zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Darauf folgte, wie oben beschrieben, die Inkubation mit humanem Komplementserum als Testsubstanz.

2.3.8.4 Koinkubation von Komplementserum mit IVIG

In weiteren Tests wurden das humane Komplementserum 1:4 in 25mg/ml IVIG in Medium und als Kontrolle 25mg/ml Milchpulver in Medium koinkubiert und als Testsubstanz für zwei Stunden den Zellen zugefügt. Zusätzlich zu den Low, High und Positivkontrollen wurden spezifische Substanzkontrollen getestet. Substanzkontrolle 3 beinhaltet 100µl Zellen und 100µl humanes Komplementserum mit IVIG 25mg/ml. Substanzkontrolle 4 enthält 100µl Zellen und 100µl humanes Komplementserum mit Milchpulver 25mg/ml. Die weitere Testung folgte nach oben beschriebenem Protokoll.

Nach Herstellerprotokoll kann die relative Zytotoxizität in Prozent nach folgender Formel errechnet werden: $\frac{(\text{Testwert} - \text{Low Kontrolle})}{(\text{High Kontrolle} - \text{Low Kontrolle})} * 100 [\%]$. Um den unspezifischen Effekt der Testsubstanz nicht abzubilden, wurde als Modifikation anstelle der Low Kontrolle die jeweilige Substanzkontrolle nach folgender Formel abgezogen:

$$\frac{(\text{Testwert} - \text{Substanzkontrolle})}{(\text{High Kontrolle} - \text{Substanzkontrolle})} * 100 [\%].$$

3 Ergebnisse

Einige der hier aufgeführten Ergebnisse wurden während der Arbeit an der Promotion bereits in Publikationen der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Würzburg veröffentlicht (Appeltshauser et al., 2022).

3.1 Detektion paranodaler Autoantikörper

Im Folgenden werden Patienten/Patientinnen mit Nachweis paranodaler Antikörper als „seropositiv“ bezeichnet, Patienten/Patientinnen ohne paranodale Antikörper als „seronegativ“.

Im NF-155 ELISA lagen $n = 8$ Patientenseren über dem Schwellwert und wurden somit als seropositiv identifiziert. Bei den für die Studie rekrutierten sechs Patienten/Patientinnen handelt es sich um CIDP-Erkrankte nach den EFNS-/PNS-Kriterien von 2010. Somit zeigt sich unter allen getesteten Probanden der Studienpopulation eine Häufigkeit von 3,8 Prozent für Neurofascin-155 Autoantikörper ($n = 8/212$). Unter CIDP Patienten/Patientinnen beträgt die Häufigkeit 8,3 Prozent ($n = 8/96$; 67 CIDP und 29 A-CIDP Patienten/Patientinnen). Alle seropositiven NF-155 Patienten/Patientinnen wurden zum Test auf Pan-NF Antikörper ebenso im ELISA für NF-186 und NF-140 getestet. Hier ergab sich eine Häufigkeit von 0,5% in der Studienpopulation ($n = 1; 212$) und von einem Prozent unter CIDP Erkrankten für Pan-NF Antikörper ($n = 1; 96$).

Zudem konnten bei einem Patienten mit GBS und bei einem Patienten mit Diagnose einer A-CIDP Autoantikörper gegen Contactin-1 detektiert werden. Dies ergibt eine Gesamthäufigkeit für Anti-Contactin-1-Antikörper in der Studienpopulation von 0,9 % ($n = 2; 212$), sowie eine Häufigkeit von 3,4 Prozent unter A-CIDP Erkrankten ($n = 1; 29$) und 9 % unter GBS-Patienten ($n = 1; 11$).

Bei den Mäusezupfnerven zeigten alle seropositiven Patienten/Patientinnen ein paranodales Bindemuster vereinbar mit einer Bindung an Proteine des junctionalen Komplexes. Ein Patient zeigte zudem eine Bindung an das Nodium des Ranvier-Schnürringes.

3.1.1 Ergebnisse mittels Neurofascin-ELISA

Im ELISA konnten bei acht Patienten/Patientinnen Autoantikörper der IgG Klasse gegen NF-155 nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente eine Positivkontrolle mit einem

kommerziellen Antikörper gegen Neurofascin-155, gesunde Normalkontrollen, sowie die Testung ohne Serum.

Als Grenzwert für humanes IgG wurde der Mittelwert der Kontrollen mit fünfmal der Standardabweichung addiert. Als Grenzwert ergab sich dann eine OD von 0,525. Analog wurde auch der Grenzwert für gegen humanes IgM gerichtete Antikörper gebildet. Dieser Grenzwert lag bei 0,438. Bei zwei der seropositiven Patienten (Patient 9, 10) mit Diagnose einer A-CIDP waren die ODs der Anti-NF-155 Autoantikörper nur niedrigtitrig erhöht (Titer 1:100), sodass diese nicht in die weiteren Versuche der Studie mit einbezogen wurden und im Folgenden nicht weiter aufgeführt sind.

Im NF-155-IgG-ELISA zeigten sechs Patienten/Patientinnen ODs, die deutlich über dem Grenzwert liegen, sodass diese Patientenseren für weitere Versuche verwendet wurden (siehe Tabelle 22). Für IgM-Antikörper war keiner der genannten Probanden positiv. Zudem waren die ODs von Patient 6 im NF-186 und im NF-140-ELISA über dem Grenzwert und es zeigte sich ein Titer von 1:2000 für NF-186 (Stengel et al., 2019). Für NF-186 lag die OD des Patientenserums 6 bei 2,682 (Grenzwert 0,459) und für NF-140 bei 2,2435. Keiner der anderen fünf für NF-155 seropositiven Patienten/Patientinnen zeigte eine OD über dem Grenzwert für NF-186. Die ODs der seropositiven Patienten/Patientinnen sind in folgender Tabelle dargestellt.

Patient/-in	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
OD IgG 1:100	3,127	3,046	3,279	3,129	3,136	3,147
IgG Titer	1:1.500	1:5.000	1:14.000	1:6.000	1:5.000	1:1.500
OD IgM 1:100	0,115	0,039	0,061	0,038	0,125	0,047

Tabelle 22: Optische Dichten im NF-155-ELISA für alle sechs seropositiven Patienten/Patientinnen für humanes IgG (Zeile 2) und humanes IgM (Zeile 3).

3.1.2 Ergebnisse an Mäusezupfnerven

Bei der Testung der Patientenseren in 1:100 und 1:500-Verdünnung zeigte sich ein paranodales Bindungsmuster an Mäusezupfnerven. Dies spricht für das Vorliegen von Autoantikörpern im Serum gegen Proteine des Paranodiums, wie beispielsweise NF-155, Contactin-1 oder Caspr-1. In den folgenden Bildern der immunhistochemischen

Färbungen sieht man die spezifischen Bindungsmuster der Patientenseren an den einzelnen Axonen der Mäusezupfnerven.

Bei Patient 6 mit den Anti-Pan-NF Autoantikörpern sieht man zudem ein nodales Bindungsmuster, passend zu den nachgewiesenen Anti-NF-186 Autoantikörpern, die gegen NF-186 des Nodiums am Ranvier'schen Schnürring gerichtet sind.

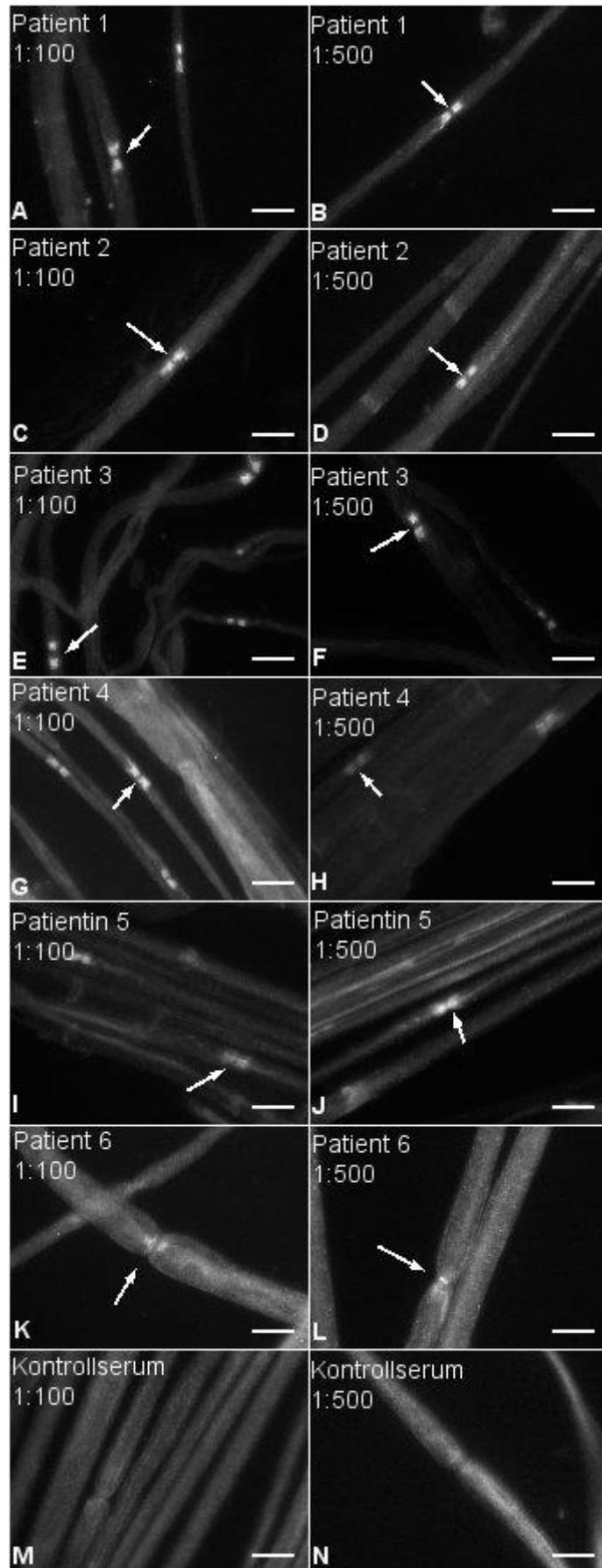


Abbildung 10: Mäusezupfnervenfärbung 1: Paranodales Bindungsmuster der Patienten/Patientinnen 1 bis 5 mit Anti-NF-155 Autoantikörpern in 1:100 (A, C, E, G, I) und 1:500-Verdünnung (B, D, F, H, J). Patient 6 zeigt zudem ein nodales Bindungsmuster (K, L). Das Kontrollserum (M, N) zeigt kein spezifisches paranodales oder nodales Bindungsmuster. Maßstab 10µm.

3.2 Bestimmung der Subklasse und Titer mittels ELISA

Zur Charakterisierung der Antikörper gegen Neurofascin-155 wurden weitere ELISA-basierte Versuche durchgeführt. Anhand einer Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:20.000 wurde der Titer der Patienten bestimmt, indem die Verdünnung als Titer festgelegt wurde, bei der die OD noch eindeutig über dem jeweiligen Grenzwert und die OD der nächsthöheren Verdünnung darunterliegt. Für humanes IgG gegen Neurofascin-155 lag der berechnete Grenzwert bei 0,5254 und für humanes IgG gegen Contactin-1 bei 0,5426. Somit ergaben sich unterschiedliche Titer der Patienten/Patientinnen. Patient 3 weist hierbei den höchsten Titer mit 1:14.000 und Patient 1 und 6 den niedrigsten mit jeweils 1:1.500 auf.

Patient/-in	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Titer	1:1.500	1:5.000	1:14.000	1:6.000	1:5.000	1:1.500
OD	0,584	0,6445	0,8995	0,616	0,6015	0,5685

Tabelle 23: Darstellung der Antikörper-Titer der Patienten/Patientinnen 1 bis 6 in Zeile 2 mit zugehörigen Optischen Dichten (in Zeile 3), die noch über dem bestimmten Grenzwert des IgG-ELISAs liegen.

Um die IgG-Subklasse der Antikörper zu bestimmen, wurde ein ELISA mit Sekundär-Antikörpern gegen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 durchgeführt. In der Auswertung wurde der Mittelwert der Inkubation ohne Patientenserum vom Mittelwert der Inkubation mit Patientenserum für die jeweilige IgG Subklasse abgezogen. Folgendes Diagramm (Abbildung 11) zeigt die Subklassenverteilung in einer 1:100-Verdünnung aller Patienten/Patientinnen. In 1:100-Verdünnung weist Patient 1 hauptsächlich IgG-Subklasse 4 auf, während bei den Patienten/Patientinnen 2, 3, 4 und 5 vorwiegend IgG 2 und 4 vorherrschend ist. Patient 6 ist der einzige Patient, der eine Prädominanz der IgG3 Subklasse bei niedrigem Gehalt der IgG4 Subklasse aufweist.

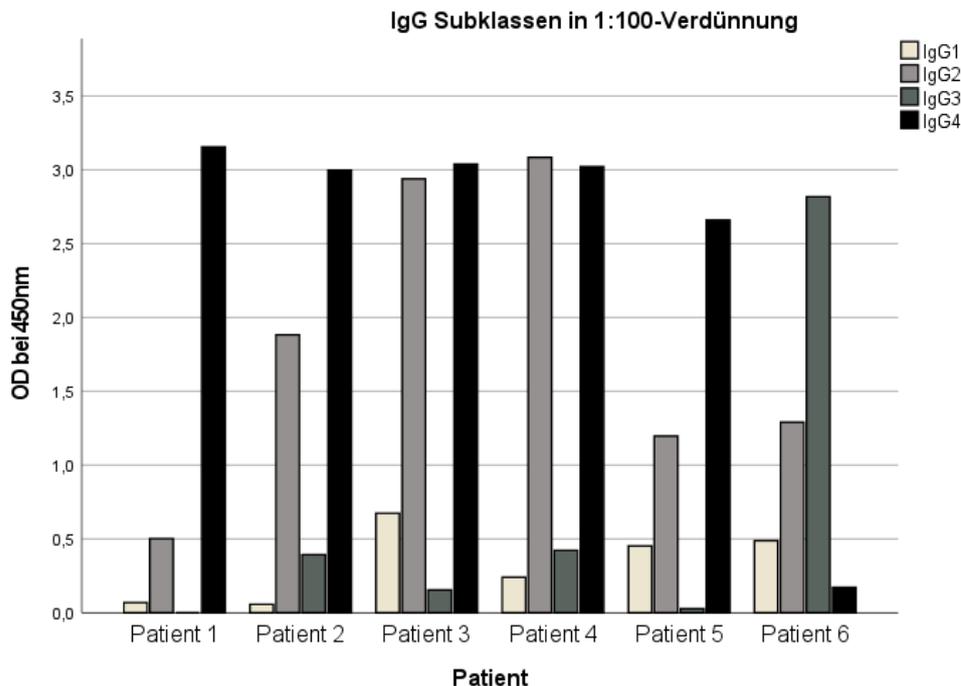


Abbildung 11: IgG-Subklassen der sechs seropositiven Patienten/Patientinnen, Verdünnung 1:100. Patient 1 zeigt eine Prädominanz der IgG4-Subklasse, während Patienten/Patientinnen 2, 3, 4 und 5 vorwiegend IgG 2 und 4 und Patient 6 eine IgG3-Prädominanz aufweisen. Die Subklassenverteilung ist auf der y-Achse anhand der Optischen Dichte des Subklassen-spezifischen ELISAs dargestellt. OD=Optische Dichte. Erstellt mit SPSS.

3.3 Anpassung der Verdünnung an den Neurofascin-IgG Titer und Subklassenbestimmung

Um einen direkten quantitativen Vergleich zwischen den Patientenantikörpern herstellen zu können, war es notwendig die Menge der spezifischen NF-155 IgG der Seren anzupassen. Unter 2.3.2.3 ist bereits beschrieben wie, anhand einer Verdünnungsreihe, die angepassten Verdünnungen jedes einzelnen Erkrankten berechnet werden konnten, um bei den folgenden Versuchen wie Subklassenbestimmung, Komplementbindungsversuche und Versuche mit IVIG eine quantitative Aussage zu erlauben. Die berechneten Verdünnungen wurden in einem separaten ELISA mit zwei verschiedenen Sekundär-Antikörpern verifiziert. Dabei zeigt sich bei allen Patienten/Patientinnen eine gleich hohe OD in der an den Titer angepassten Verdünnung, was für eine gleiche Menge an enthaltenem Neurofascin-155-spezifischen IgG spricht.

Patient/-in	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
ELISA-verifizierte, angepasste Verdünnung	1:50	1:120	1:240	1:80	1:100	1:20
OD hIlgG	2,917	3,049	3,049	3,020	3,011	2,995
OD Fab IgG	1,120	1,292	1,212	1,149	1,212	1,086

Tabelle 24: Optische Dichten der seropositiven Patienten/Patientinnen 1 bis 6 in den jeweiligen berechneten ELISA-verifizierten angepassten Verdünnungen (Zeile 2). Zeile 3 bildet die ODs des Sekundär-Antikörpers gegen humanes IgG und Zeile 4 die ODs des Fab-spezifischen Sekundär-Antikörpers ab. Es zeigen sich vergleichbare ODs unter den Patientenseren. OD=Optische Dichte.

Patient/-in	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
ELISA-verifizierte, angepasste Verdünnung	1:25	1:60	1:120	1:40	1:50	1:10
OD hIlgG	3,103	3,113	3,145	3,142	3,122	3,173
OD Fab IgG	1,034	1,109	1,104	1,146	1,147	0,956

Tabelle 25: Optische Dichten der seropositiven Patienten/Patientinnen 1 bis 6 in den jeweiligen berechneten angepassten Verdünnungen für den KBA (Zeile 2). Für den KBA wurde jeweils der Verdünnungsfaktor halbiert und die Vergleichbarkeit ebenso per ELISA validiert. Zeile 3 bildet die ODs des Sekundär-Antikörpers gegen humanes IgG (hIlgG) und Zeile 4 die ODs des Fab-spezifischen Sekundär-Antikörpers ab. Es zeigen sich vergleichbare ODs unter den Patientenseren. OD=Optische Dichte.

Zum quantitativen Vergleich der Subklassen wurden nun die Subklassentestungen erneut in der an den Titer angepassten Verdünnung durchgeführt. Hier wurde die Verdünnung des KBAs verwendet, da die Gegenüberstellung von Subklassenverteilung und Menge an Komplementablagerung für diese Studie von Interesse ist. Als Ergebnis ergab sich folgende Verteilung.

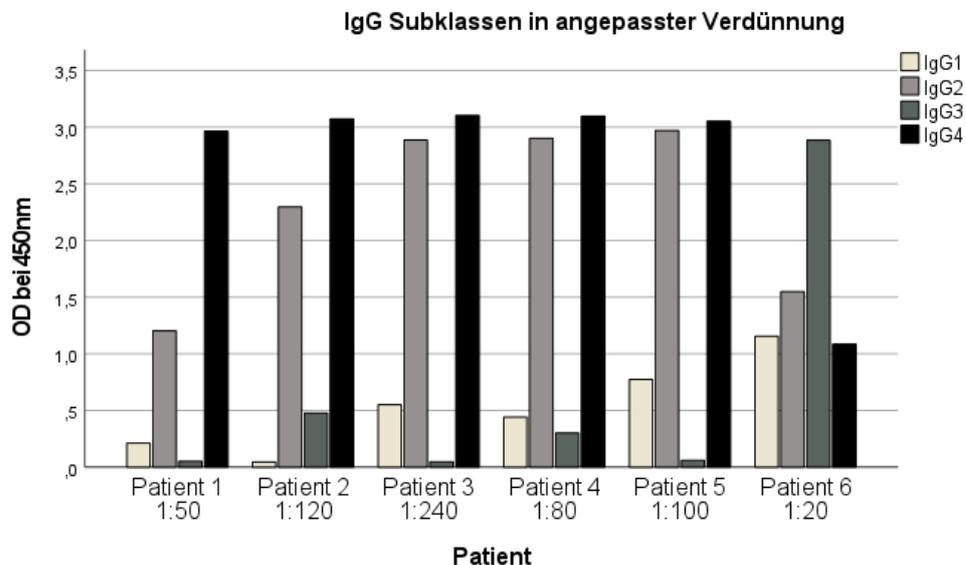


Abbildung 12: IgG-Subklassen der sechs seropositiven Patienten/Patientinnen, Verdünnung an Anti-NF-155 Titer angepasst. Patient 1 und 2 zeigen eine Prädominanz der IgG4-Subklasse, während Patient 3 und 4 IgG2, IgG3 und IgG4 Antikörper, Patientin 5 IgG1, IgG2 und IgG4 und Patient 6 eine IgG3-Prädominanz aufweist. Die Subklassenverteilung ist auf der y-Achse anhand der Optischen Dichte des Subklassen-spezifischen ELISAs dargestellt. OD=Optische Dichte. Diagramm erstellt mit SPSS.

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG
Patient 1 1:25	0,144	0,711	0,0	3,225	3,029
Patient 2 1:60	0,027	1,290	0,136	3,040	3,113
Patient 3 1:120	0,301	2,807	0,054	2,967	3,145
Patient 4 1:40	0,292	2,910	0,168	3,120	3,153
Patientin 5 1:50	0,344	2,958	0,0	3,174	3,328
Patient 6 1:10	0,694	0,588	2,231	0,508	3,196

Tabelle 26: Subklassenverteilung der sechs seropositiven Patienten/Patientinnen mit Anti-NF-155 Autoantikörpern. Spalte 2 bis 5 zeigen die Optischen Dichten der Subklassen IgG1 bis IgG4, getestet im ELISA mit Subklassen spezifischen Sekundär-Antikörpern. In Spalte 6 sind die Optischen Dichten der Patientenseren mit dem Sekundär-Antikörper gegen humanes IgG abgebildet.

Die Patienten/Patientinnen 1, 2, 3, 4 und 5 zeigen hier vorrangig die Subklassen IgG2 und IgG4, während Patient 6 die Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3 jeweils über dem Grenzwert aufweist. Patient 6 ist auch in angepasster Verdünnung der einzige Patient mit IgG3-Prädominanz bei niedrigen IgG4-Autoantikörper-Titern. Patientin 5 weist zudem erhöhte Titer der IgG1 Subklasse auf.

3.4 Detektion von Autoantikörpern gegen Contactin-1

Durch das Patientenscreening konnten auch Patienten mit Antikörpern gegen andere paranodale Proteine wie Contactin-1 identifiziert werden.

Patient 7 und 8 weisen Autoantikörper der Klasse IgG gegen paranodales Contactin-1 auf. Dies konnte im ELISA, sowie auch an Mäusezupfnerven, bestätigt werden. Im ELISA lag die OD mit 1,844 über dem Grenzwert für Contactin-1 IgG, der bei 0,5426 liegt. Antikörper der Klasse IgM konnten nicht nachgewiesen werden. Bei Testung der Patientenserum an Mäusezupfnerven fiel ein deutliches paranodales Bindungsmuster auf, welches für eine Bindung von Antikörpern im Serum des Patienten an Proteine des paranodalen Komplexes wie beispielsweise Contactin-1 spricht. Hierbei zeigt Patient 7 ein deutlich schwächeres paranodales Bindungsmuster als Patient 8.

Anhand einer Verdünnungsreihe konnte ein Titer von 1:500 für Patient 7 und ein Titer von 1:10.000 für Patient 8 nachgewiesen werden. In Subklassen-ELISAs, wie unter 2.3.2.2 beschrieben, weist Patient 7 eine IgG4 Prädominanz auf, während Patient 8 IgG2 und IgG4 Antikörper aufweist.

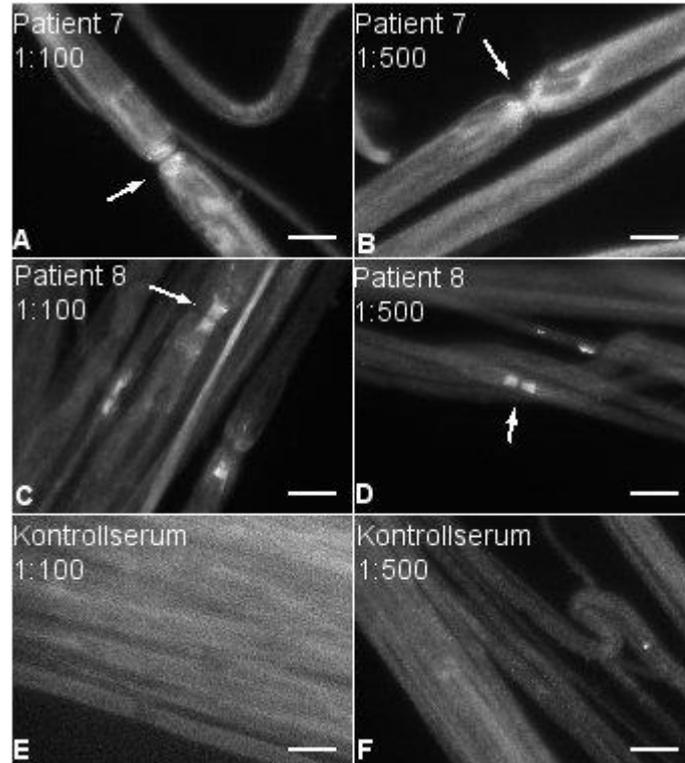


Abbildung 13: Mäusezupfnervenfärbung 2: Paranodales Bindungsmuster der Patienten 7 und 8 mit Anti-Contactin-1 Autoantikörper in 1:100 (A, C) und 1:500-Verdünnung (B, D). Das Kontrollserum zeigt kein spezifisches paranodales Bindungsmuster. Maßstab 10µm.

An HEK-293-Zellen konnten die Ergebnisse der Contactin-1 positiven Patienten noch bestätigt werden.

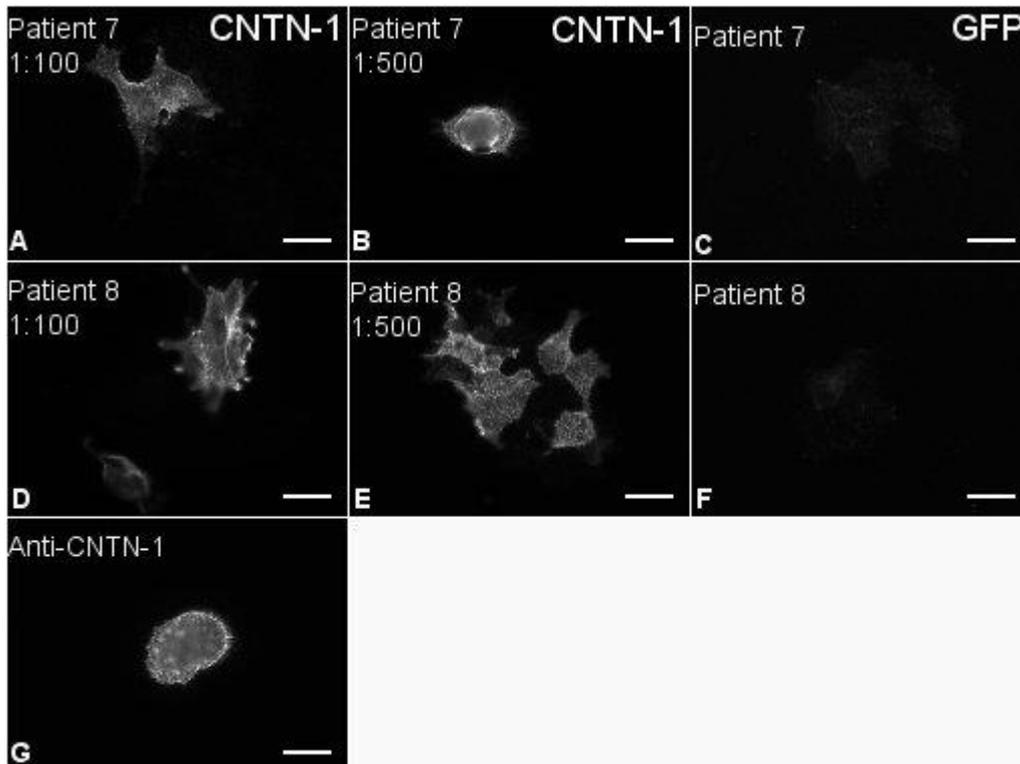


Abbildung 14: Contactin-1 DNA transfizierte HEK-293-Zellen. Spezifisches Bindungsmuster der Anti-Contactin-1 Autoantikörper der Patientenseren 7 und 8 in 1:100 (A, D) und 1:500-Verdünnung (B, E) sowie einer Anti-Contactin Positivkontrolle (G). Als Kontrolle dient die Färbung der Patientenseren an GFP-transfizierten Zellen (C, F), wobei sich keine spezifische Bindung zeigt. Maßstab 10µm.

3.5 Bestätigungstests an HEK-Zellen

Bei Patientenseren, die im ELISA über dem Grenzwert lagen und/oder ein auffälliges Bindungsmuster an Zupfnervaxonen zeigten, wurden Bestätigungstests an HEK-293-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde das Patientenserum in 1:100 und 1:500-Verdünnung an mit Neurofascin-155 oder Contactin-1 DNA transfizierten Zellen getestet. Als Kontrolle wurde das Serum in beiden Verdünnungen zusätzlich an GFP-transfizierten Zellen getestet.

Bei allen sechs als positiv identifizierten Patienten/Patientinnen konnte eine Bindung der im Serum enthaltenen Anti-NF-155-Antikörper an die NF-155 DNA transfizierten Zellen gezeigt werden. Es handelt sich hierbei um ein spezifisches Bindungsmuster an die Zelloberfläche, welches bei gesunden Kontrollen nicht zu sehen ist. Im Folgenden sind die Neurofascin-155 transfizierten Zellen mit Patientenserum zu sehen. Als Positivkontrolle fungiert ein kommerzieller Antikörper gegen NF-155, als Negativkontrolle das Patientenserum an GFP-transfizierten Zellen.

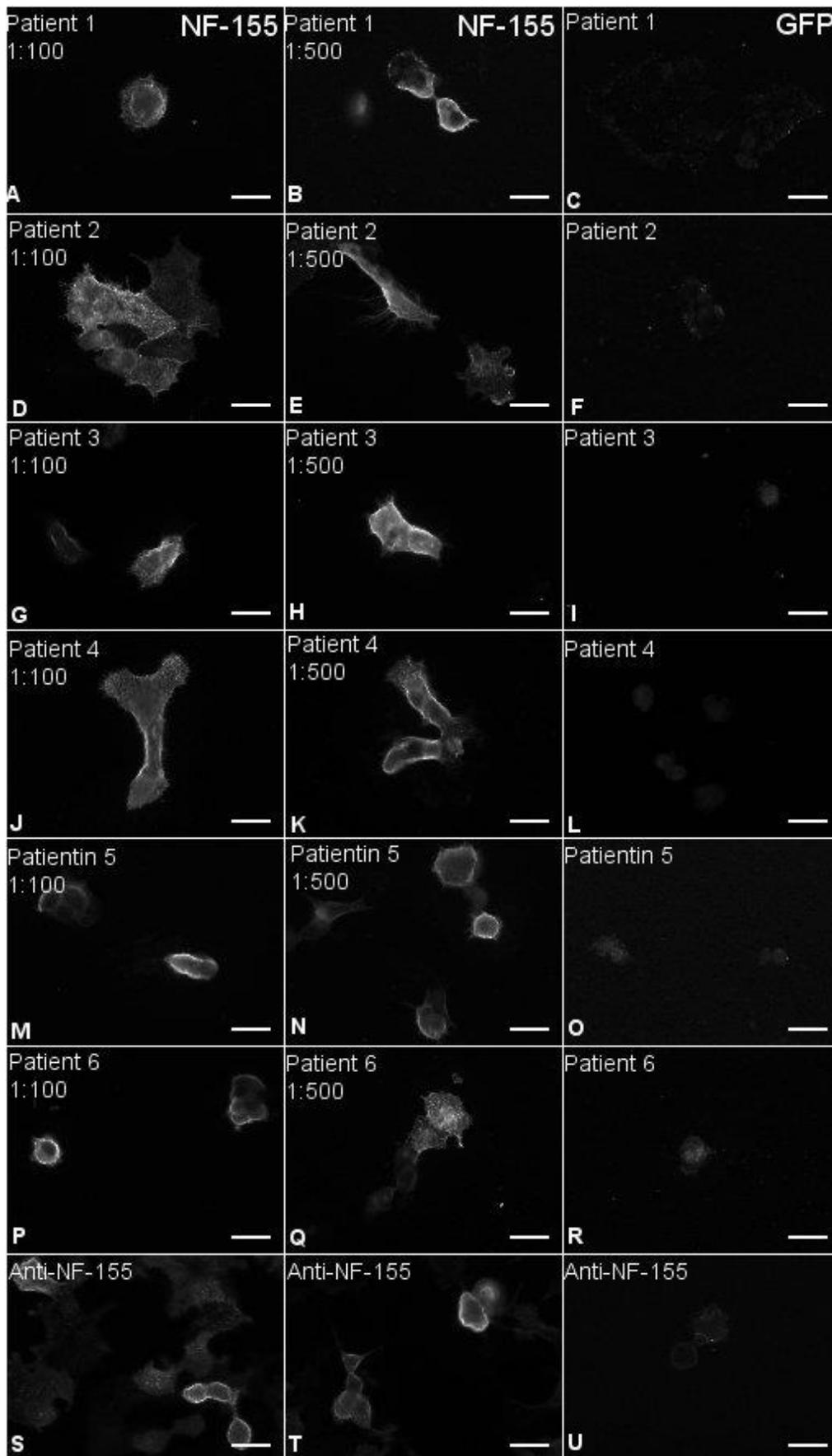


Abbildung 15: HEK Zellfärbungen: Abgebildet sind NF-155 transfizierte HEK Zellen (A, B, D, E, G, H, J, K, M, N, P, Q, S, T) sowie GFP transfizierte Zellen (C, F, I, L, O, R, U) mit Zugabe der Patientenseren 1 bis 6 in 1:100 und 1:500 (A bis R) sowie Positivkontrolle (S bis U).

3.6 Komplementbindung durch NF-155-Autoantikörper

Nach der Charakterisierung der Autoantikörper gegen NF-155 sollte als nächstes die Komplementbindung dieser untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA-basierter Komplementbindungsassay, sowie zur Bestätigung der Ergebnisse Komplementbindungsversuche an der HEK-Zellkultur durchgeführt.

3.6.1 ELISA-basiertes Verfahren

Per ELISA-basiertem Versuch wurde die Bindung des Komplementfaktors C1q durch Anti-NF-155-Autoantikörper der Patientenseren in vitro untersucht. Das Patientenserum wurde in diesem Versuch einmal auf der mit NF-155 beschichteten und als Kontrolle auf einer unbeschichteten Platte mit C1q und ohne C1q inkubiert. Bei der Auswertung wurde vom Mittelwert der inkubierten Proben mit C1q der Mittelwert der Proben ohne Zugabe von C1q subtrahiert.

Um einen direkten quantitativen Vergleich zwischen den Patientenseren zu ermöglichen, wurden wieder die unter 2.3.2.3 berechneten angepassten Verdünnungen verwendet. Im Komplementbindungsassay wurden die Seren allerdings niedriger als im ELISA verdünnt, dementsprechend wurden die ELISA-Verdünnungen halbiert.

Ein Grenzwert, anhand von zehn Normalkontrollen, wurde für jede Verdünnung einzeln bestimmt. Für Patient 1 in der 1:25 Verdünnung lag der Grenzwert bei 0,219, für Patient 2 in der 1:60 Verdünnung bei 0,173, für Patient 3 in 1:120 bei 0,077, bei Patient 4 in 1:40 bei 0,101, bei Patientin 5 in 1:50 bei 0,128 und bei Patient 6 in einer Verdünnung von 1:10 bei 0,133. Der Grenzwert liegt beim KBA somit weitaus niedriger als im normalen ELISA.

Die ODs des Komplementbindungsassays mit den zugehörigen Grenzwerten sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Patient/-in	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
ELISA-verifizierte angepasste Verdünnung	1:25	1:60	1:120	1:40	1:50	1:10
OD des KBA	0,152	0,126	0,592	0,670	1,226	2,360
Grenzwert	0,219	0,173	0,077	0,101	0,128	0,133

Tabelle 27: Optische Dichten der Anti-NF-155 seropositiven Patienten/Patientinnen im KBA. In Zeile 3 sind die Optischen Dichten der Anti-NF-155 seropositiven Patienten/Patientinnen im Komplementbindungsassay in der jeweiligen Verdünnung (Zeile 2) dargestellt. Zeile 4 bildet den für jede Patientenverdünnung eigens erstellten Grenzwert des KBAs ab. Die ODs, die über dem Grenzwert liegen sind hervorgehoben. KBA= Komplementbindungsassay, OD=Optische Dichte.

Den Ergebnissen zufolge führen die Antikörper von Patient 3, Patient 4, Patientin 5 und Patient 6 zu einer Bindung des Komplementfaktors C1q, die über eine Antikörperreaktion immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Die im Serum enthaltenen Autoantikörper von Patient 1 und 2 waren hingegen negativ im Komplementbindungsassay und liegen unter dem, anhand von Normalkontrollen, berechneten Grenzwert.

Außerdem waren die Normalkontrollen negativ im KBA und zeigten keinerlei Komplementbindung.

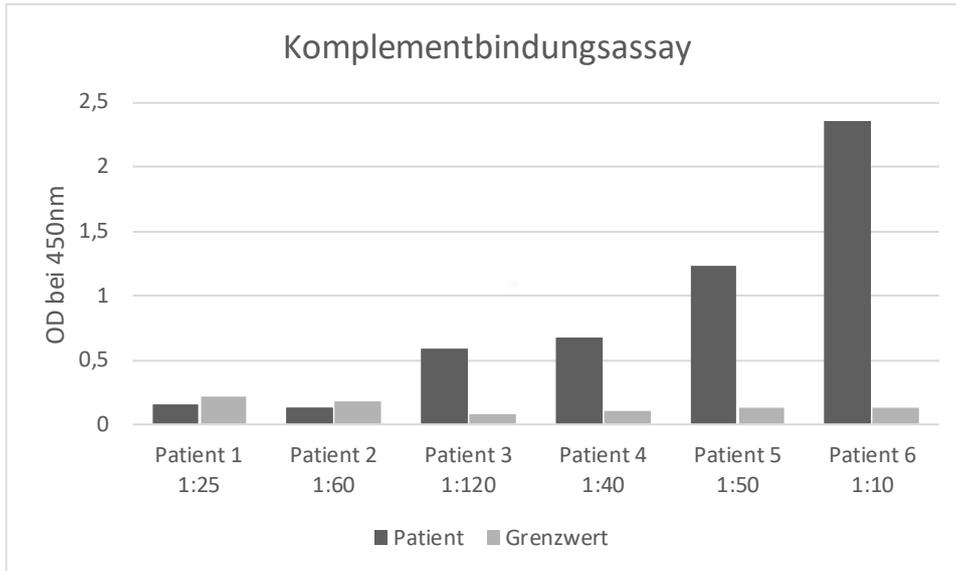


Abbildung 16: Komplementbindungsassay: Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der sechs Patienten/Patientinnen mit Anti-NF-155 Autoantikörpern im Komplementbindungsassay bei einer Wellenlänge von 450nm. Die anhand von Kontrollen berechneten Grenzwerte in den jeweiligen Verdünnungen des Patientenserums sind als hellgraue Balken dargestellt, die Ergebnisse der Patientenserum im KBA als dunkelgraue Balken. Somit liegen die ODs der Patienten 3 bis 6 über dem jeweils berechneten Grenzwert und sind somit positiv im Komplementbindungsassay. OD=Optische Dichte. Erstellt mit Excel.

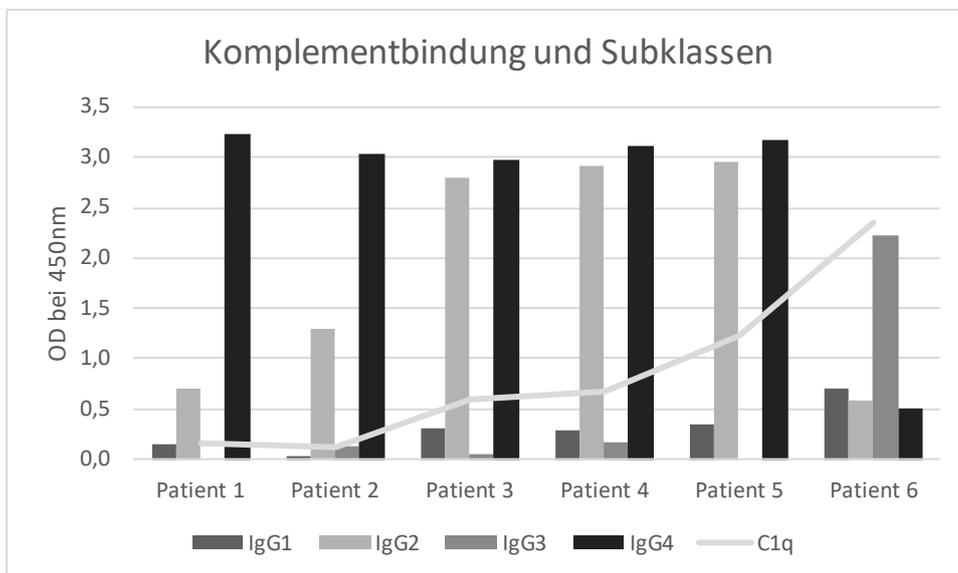


Abbildung 17: Komplementbindung und Subklassen: Das Diagramm zeigt die Subklassenverteilung IgG1 bis IgG4 der sechs seropositiven Patienten/Patientinnen als Balken. Als Liniendiagramm sind hier zudem die Ergebnisse des Komplementbindungsassays der einzelnen Patienten/Patientinnen dargestellt. OD=Optische Dichte. Erstellt mit Excel.

Aufgrund des quantitativen Vergleichs der Patientenserum durch angepasste Verdünnungen kann nun auch die Subklassenverteilung direkt in Verbindung mit der C1q Bindung betrachtet werden. Wie im Diagramm 17 dargestellt zeigt Patient 6 mit einer Prädominanz der IgG3 Subklasse die deutlichste Komplementablagerung. Bei den Patienten/Patientinnen 3, 4 und 5, die IgG1, IgG2 und IgG4 aufweisen, ist auch eine Aktivierung des Komplementsystems zu beobachten, während bei den Patienten 1 und 2 mit prädominanter IgG4-Antikörpersubklasse keine Komplementablagerung nachweisbar ist.

Über SPSS konnten mithilfe des Spearman-Rho Tests Signifikanzen und Korrelationen berechnet werden. Untenstehende Abbildungen zeigen in logarithmischer Darstellung aufgrund der Sättigungskinetik die Korrelationen der verschiedenen IgG Subklassen mit der Menge an Komplementablagerung. Zuerst wurden Einzelanalysen durchgeführt, wobei die ODs der einzelnen Subklassen der Patientenserum mit der Menge an Komplementablagerung korreliert wurden. Die ODs der Subklasse IgG3 zeigten zwar eine positive Korrelation mit der Menge an Komplementablagerung, diese ist jedoch auf dem 0,05 Niveau nicht signifikant. Die jeweiligen ODs der Subklassen IgG1 und IgG2 zeigen auch eine positive Korrelation mit der Menge an Komplement. Außerdem zeigt sich eine negative Korrelation der ODs der Subklasse IgG4 mit der Menge an Komplementablagerung, die jedoch nicht signifikant ist.

Unter der Annahme, dass die Subklassen IgG1-3 aufgrund ihrer Eigenschaften (Bindon et al., 1988) für die Komplementbindung ausschlaggebend sind, wurden die ODs der Subklassen IgG1-3 als rechnerisches Modell addiert und mit den ODs der Komplementablagerung korreliert. Es konnte in der Kohorte der seropositiven Patienten/Patientinnen eine signifikant positive Korrelation der Subklassen IgG1 bis IgG3 mit der Menge an Komplementablagerung gefunden werden (siehe Tabelle 28). Außerdem wurde in einem zweiten Modell, das die subklassenspezifische Stärke der Komplementaktivierung (IgG3>IgG1>IgG2, keine Komplementbindung bei IgG4, gemäß Vidarsson et al., 2014) mit einbezieht, die ODs der jeweiligen Subklasse gewichtet (3x IgG3, 2x IgG1, 1x IgG2, 0x IgG4) und erneut mit der Menge an Komplementablagerung korreliert. Hierbei zeigte sich eine positive Korrelation (siehe Tabelle 28). Die positive Korrelation darf ebenso nur als Modell betrachtet werden, da die OD-Werte einer Sättigungskinetik folgen und unterschiedliche Subklassen-Antikörper verwendet wurden. Außerdem wurde in einem weiteren Modell die Summe der ODs der Subklassen IgG1 bis IgG3 von den ODs der Subklasse IgG4 subtrahiert und mit der Menge an

Komplementablagerung korreliert. Hier zeigte sich eine negative Korrelation, die jedoch ebenfalls nur als Modell betrachtet werden darf (siehe Tabelle 28).

Korrelationen im Spearman-Rho Test			
Korrelation		Korrelationskoeffizient	Zweiseitiger P-Wert
OD IgG1	OD Komplement	0,943	0,005*
OD IgG2	OD Komplement	0,086	0,872
OD IgG3	OD Komplement	0,257	0,623
OD IgG4	OD Komplement	-0,314	0,544
Summe OD IgG1 + IgG2 + IgG3	OD Komplement	0,886	0,019*
Summe nach Wichtung OD IgG1*2 + IgG2*1 + IgG3*3	OD Komplement	0,771	0,072
OD IgG4 – (IgG1 + IgG2 + IgG3)	OD Komplement	-0,771	0,072

Tabelle 28: Korrelation im Spearman-Rho Test: Abgebildet sind die Korrelationen im Spearman-Rho Test der Optischen Dichten der verschiedenen Subklassen (Spalte 1) mit den Optischen Dichten der Komplementablagerung (Spalte 2). Spalte 3 zeigt die Korrelationskoeffizienten [0-1] und Spalte 4 die zweiseitigen P-Werte. Die mit Sternchen versehenen P-Werte zeigen die Signifikanz auf dem 0,05 Niveau für 2 Korrelationen (Zeile 3 und 7).

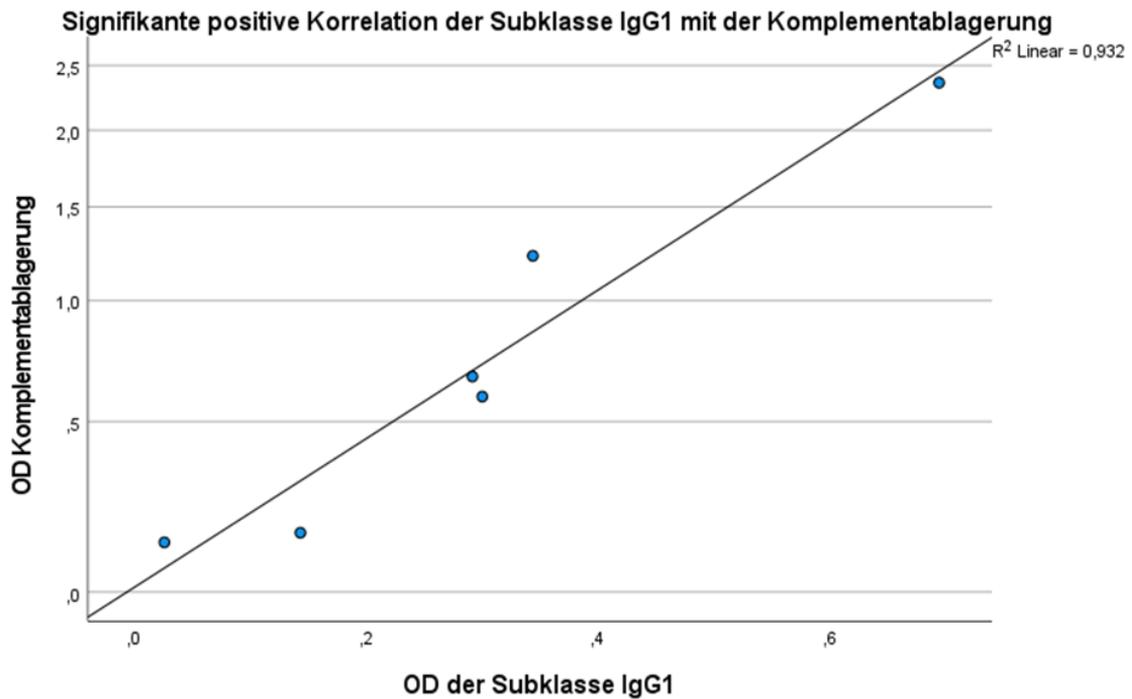


Abbildung 18: Korrelation IgG1 mit Komplementablagerung: Oben stehendes Diagramm zeigt eine signifikante positive Korrelation (Korrelationskoeffizient +0,943) der Optischen Dichten der Subklasse IgG1 der seropositiven Patienten/Patientinnen mit den Optischen Dichten des Komplementbindungsassay in logarithmischer Darstellung. OD=Optische Dichte. Berechnet mit dem Spearman-Rho Test mithilfe SPSS.

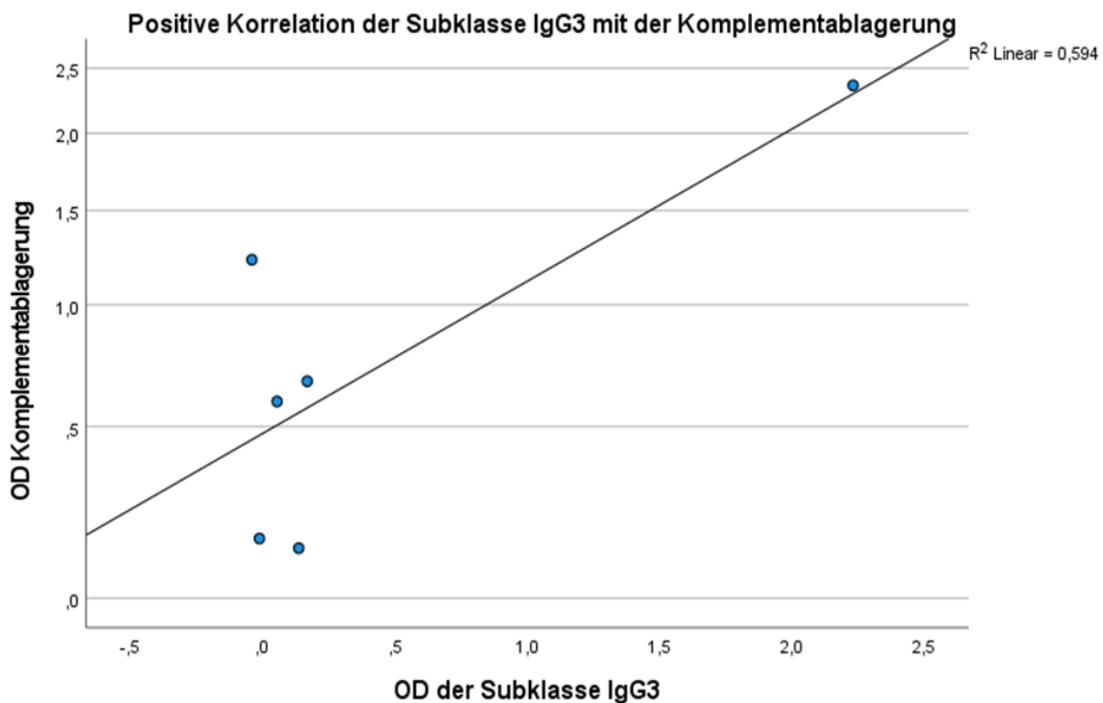


Abbildung 19: Korrelation IgG3 mit Komplementablagerung: Oben stehendes Diagramm zeigt eine positive Korrelation (Korrelationskoeffizient +0,257) der Optischen Dichten der Subklasse IgG3 der seropositiven Patienten/Patientinnen mit den Optischen Dichten des Komplementbindungsassays in logarithmischer Darstellung. OD=Optische Dichte. Berechnet mit dem Spearman-Rho Test mithilfe SPSS.

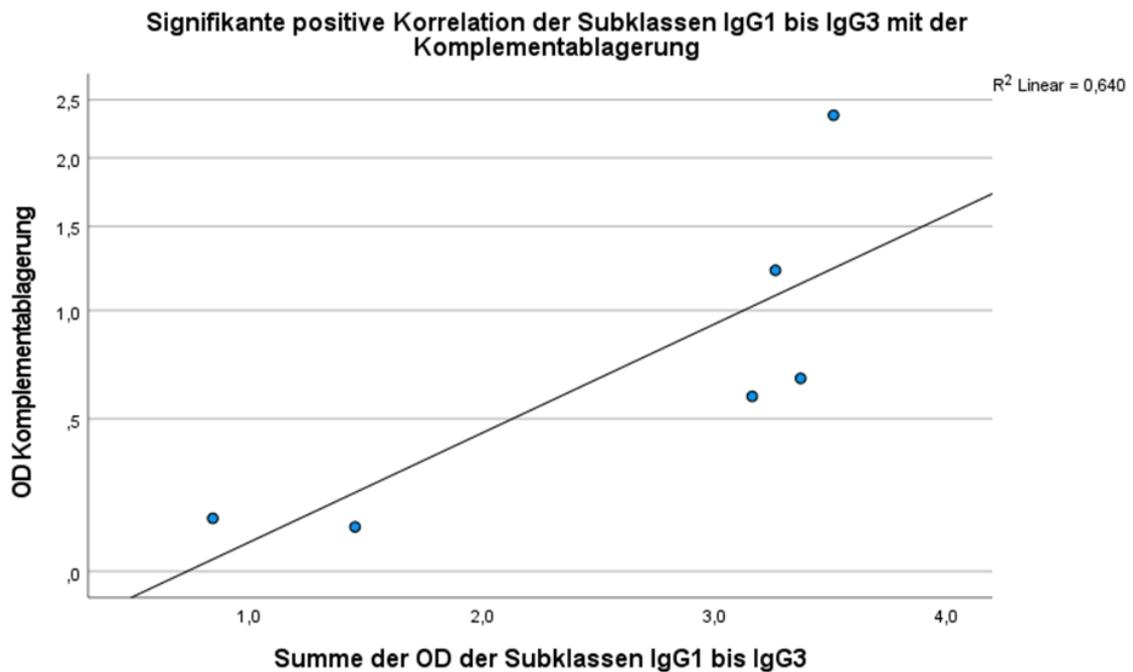


Abbildung 20: Korrelation Summe IgG1 bis 3 mit Komplementablagerung: Oben stehendes Diagramm zeigt eine auf dem 0,05 Niveau signifikante positive Korrelation (Korrelationskoeffizient +0,886) der Summe der Optischen Dichten der Subklassen IgG1 bis IgG3 der seropositiven Patienten/Patientinnen mit den Optischen Dichten des Komplementbindungsassays. Dies kann nur als Modell betrachtet werden, da die Subklassen IgG1 bis IgG3 biologisch nicht addierbar sind. OD=Optische Dichte. Berechnet mit dem Spearman-Rho Test mithilfe SPSS.

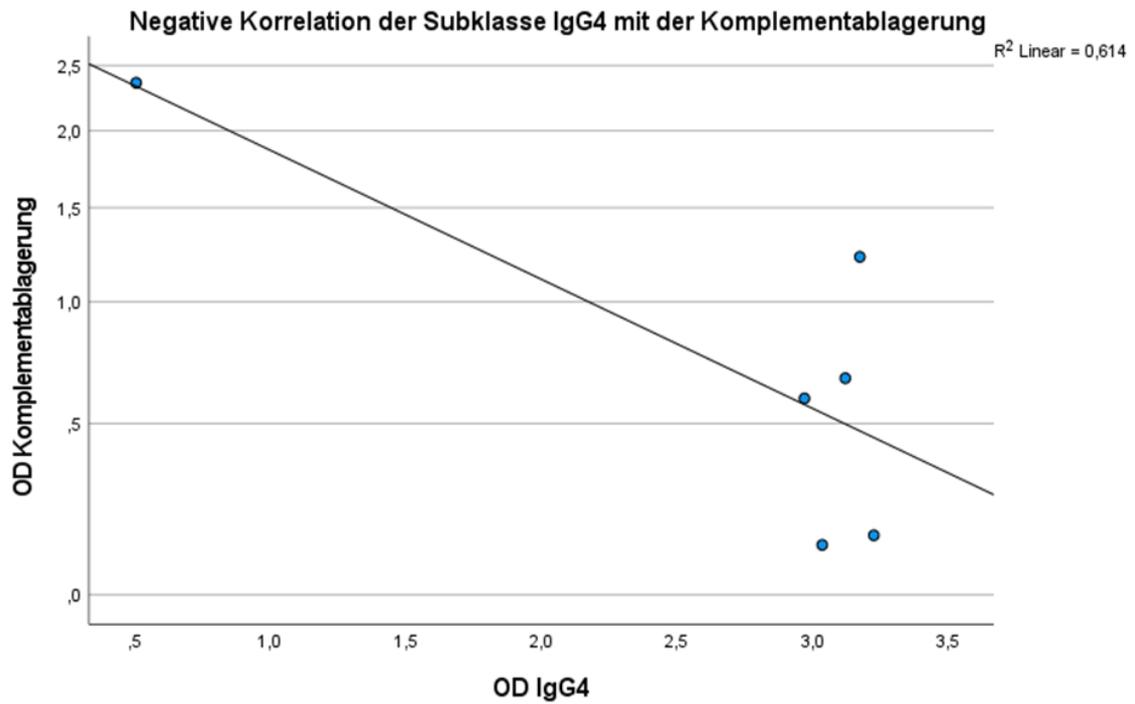


Abbildung 21: Korrelation IgG4 mit Komplementablagerung: Oben stehendes Diagramm zeigt eine negative Korrelation (Korrelationskoeffizient -0,314) der Summe der Optischen Dichten der Subklassen IgG4 der seropositiven Patienten/Patientinnen mit den Optischen Dichten des Komplementbindungsassays. OD=Optische Dichte. Berechnet mit dem Spearman-Rho Test mithilfe SPSS.

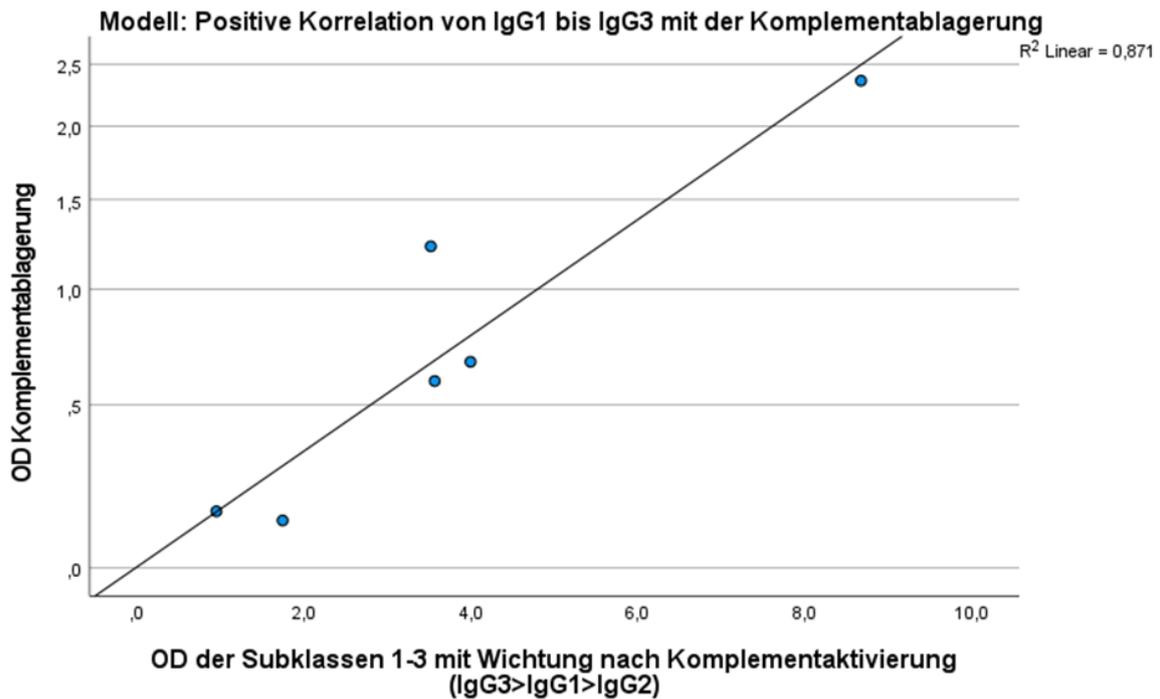


Abbildung 22: Korrelation IgG1 bis 3 gewichtet mit Komplementablagerung: Oben stehendes Diagramm zeigt eine positive Korrelation (Korrelationskoeffizient +0,771) der Summe der Optischen Dichten der Subklassen IgG1 bis IgG3 mit Wichtung nach Aktivierung der Komplementkaskade (IgG3>IgG1>IgG2) der seropositiven Patienten/Patientinnen mit den Optischen Dichten des Komplementbindungsassays. Die Optischen Dichten der Subklasse IgG3 wurden mit 3, die der Subklasse IgG2 mit 1 und die der Subklasse IgG1 mit 2 multipliziert, um die Stärke der Komplementaktivierung durch die verschiedenen Subklassen abzubilden. Die positive Korrelation darf somit nur als Modell betrachtet werden. OD=Optische Dichte. Berechnet mit dem Spearman-Rho Test mithilfe SPSS.

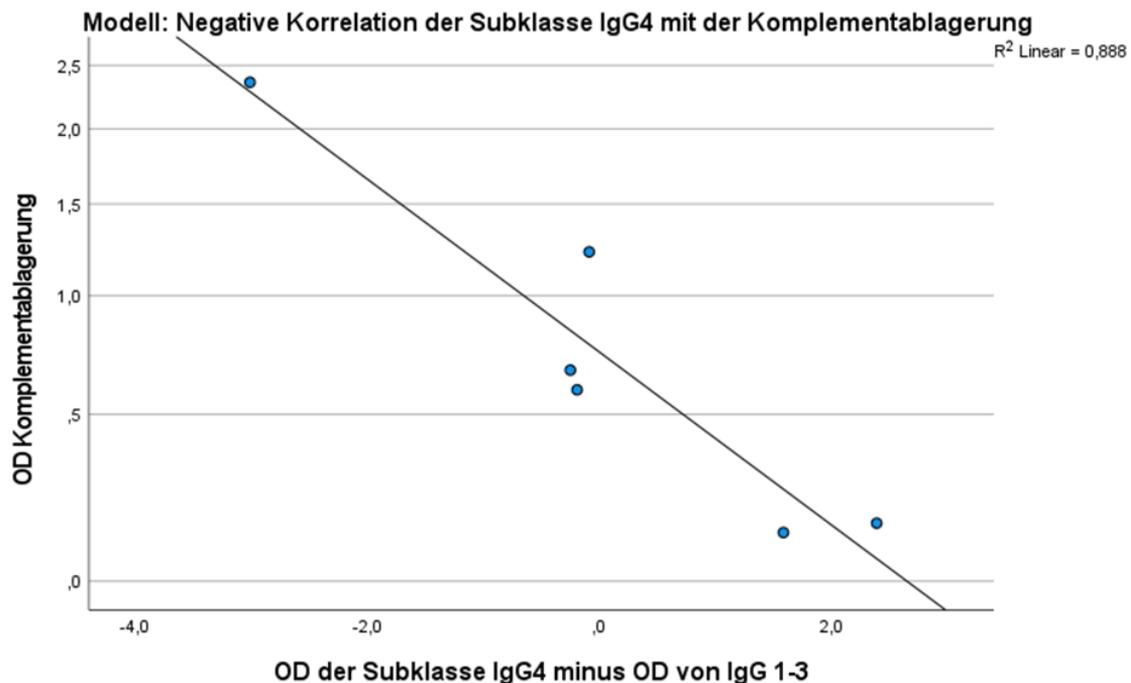


Abbildung 23: Korrelation IgG4 minus IgG1-3 mit Komplementablagerung: Oben stehendes Diagramm zeigt eine negative Korrelation (Korrelationskoeffizient $-0,771$) der Optischen Dichten der Subklasse IgG4 abzüglich der Summe der Subklassen IgG1 bis IgG3 der seropositiven Patienten/Patientinnen mit den Optischen Dichten des Komplementbindungsassays. Die negative Korrelation darf somit nur als Modell betrachtet werden. OD=Optische Dichte. Berechnet mit dem Spearman-Rho Test mithilfe SPSS.

3.6.2 HEK-Zell-basiertes Verfahren

Als Bestätigung der *in vitro* Versuche wurde das Serum aller positiven Patienten/Patientinnen auch an HEK-293-Zellen auf Komplementbindung untersucht. Hierbei wurde eine Doppelfärbung mit zwei verschiedenen Sekundär-Antikörpern durchgeführt, um zum einen die Bindung der Antikörper an das Zielprotein auf der Zelloberfläche und zum anderen die Bindung von Komplement zu zeigen. Durch Kollaborationsversuche konnte hier eine Überlagerung, und somit eine spezifische Komplementbindung der Anti-NF-155 Antikörper, nachgewiesen werden. In den HEK-Zell Komplementbindungsversuchen bestätigte sich, dass Patient 6 mit hohem IgG3-Antikörper Gehalt die stärkste Bindung von Komplement aufweist, während Patient 1 und Patient 2 kein Komplement binden.

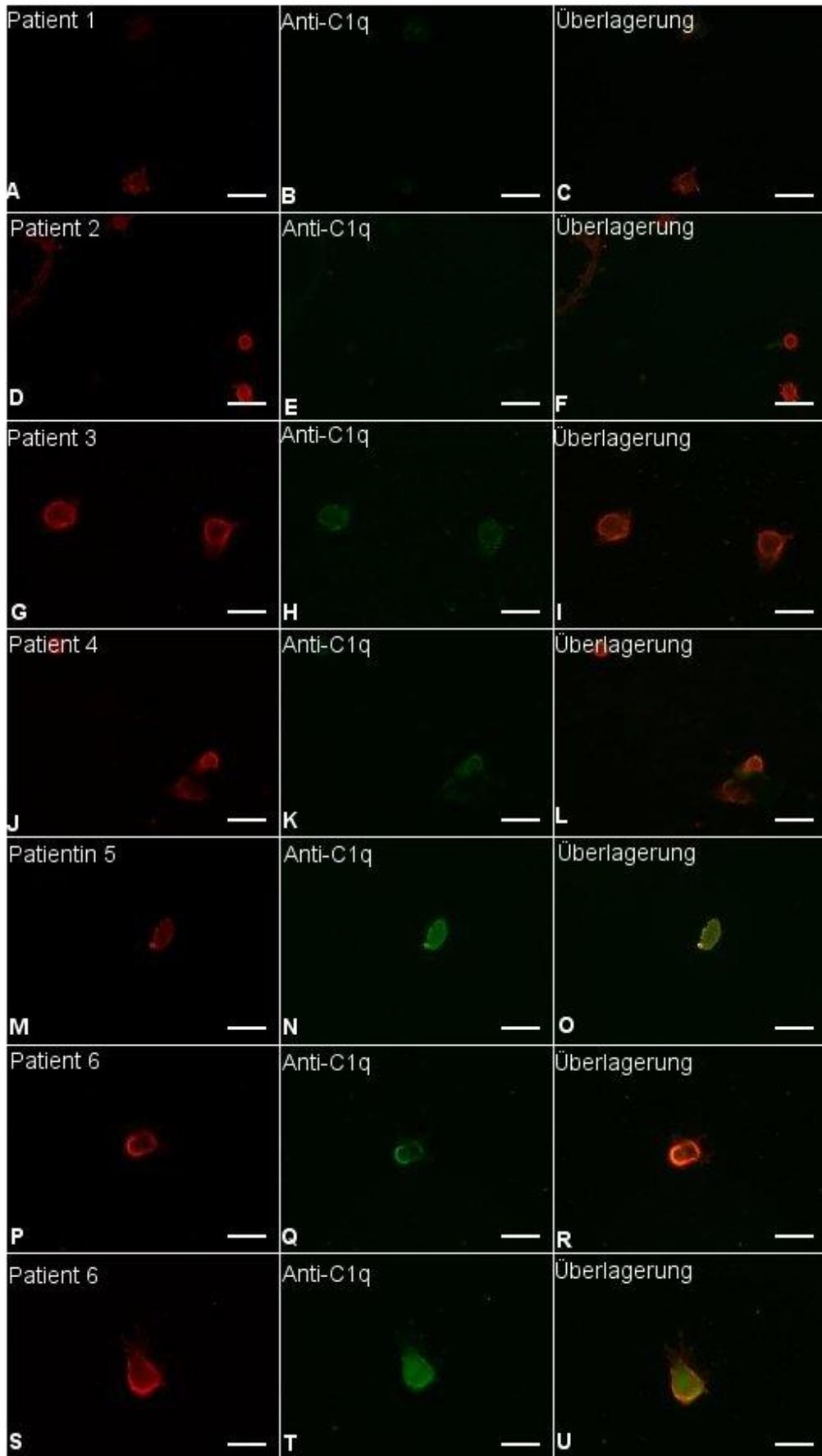


Abbildung 24: Kolokalisationsversuche an NF-155 transfizierten HEK-293 Zellen. Die 1. Spalte (A, D, G, J, M, P, S) zeigt die Bindung der Autoantikörper der Patientenserum 1 bis 6 an das von HEK-Zellen exprimierte NF-155 (rot). Spalte 2 (B, E, H, K, N, Q, T) zeigt die Bindung von C1q/Komplement (grün) und Spalte 3 (C, F, I, L, O, R, U) zeigt die Überlagerung von Antikörper- und Komplementbindung (gelb). Patient 6 (P bis U) zeigt die deutlichste Komplementbindung Kolokalisation, während Patient 1 (A bis C) und Patient 2 (D bis F) keine Komplementbindung zeigen.

3.7 Effekte von IVIG

Bei den Patienten/Patientinnen 1 bis 6 wurde das Patientenserum unter Zugabe von IVIG in verschiedenen Konzentrationen auf die Antikörperbindung, sowie bei den Patienten/Patientinnen 3 bis 6 der Effekt auf die Komplementablagerung, in ELISA-basierten und HEK-293-zellbasierten Versuchen getestet.

3.7.1 Kein Effekt von IVIG auf die Antikörperbindung

Weder bei Koinkubation von IVIG oder BSA mit dem Patientenserum noch bei Präinkubation von IVIG oder BSA vor Zugabe des Patientenserums zeigte sich eine Reduktion der ODs im ELISA.

Um eine mögliche Interaktion von IVIG mit den Autoantikörpern zu detektieren, wurden auch Versuche mit Fab Fragmenten durchgeführt. Die ELISAs mit Koinkubation von IVIG oder BSA mit den aufgereinigten Fab Fragmenten beziehungsweise reinem IgG des seropositiven Patienten 3 bestätigen oben genannte Ergebnisse. Es zeigte sich keine Reduktion der ODs bei Zugabe von IVIG oder BSA in allen getesteten Konzentrationen.

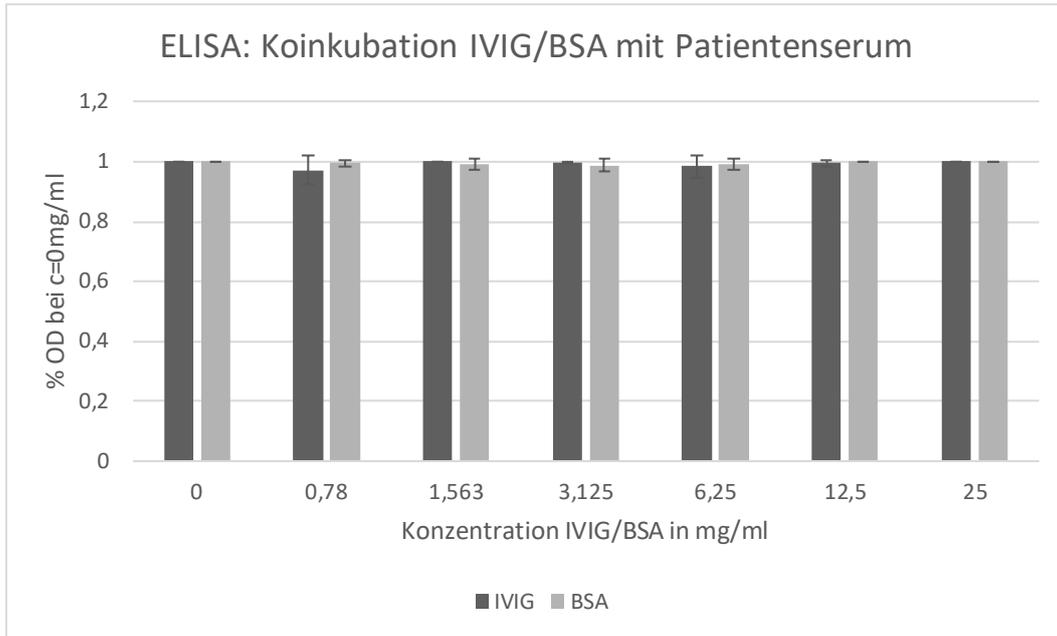


Abbildung 25: Koinkubation IVIG/BSA mit Patientenserum: Im Diagramm ist das Verhältnis der ODs der Koinkubation von Privigen®-IVIG beziehungsweise BSA vor dem Primär-Antikörper (Patientenserum) in verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) zu den ODs ohne Zugabe von IVIG oder BSA für alle sechs Patienten/Patientinnen im Mittelwert abgebildet. Die ODs ohne Zugabe von IVIG oder BSA wurden hier als 100% festgelegt, um die Veränderung durch IVIG und BSA mit Standardabweichungen darstellen zu können. OD=Optische Dichte. Erstellt mit Excel.

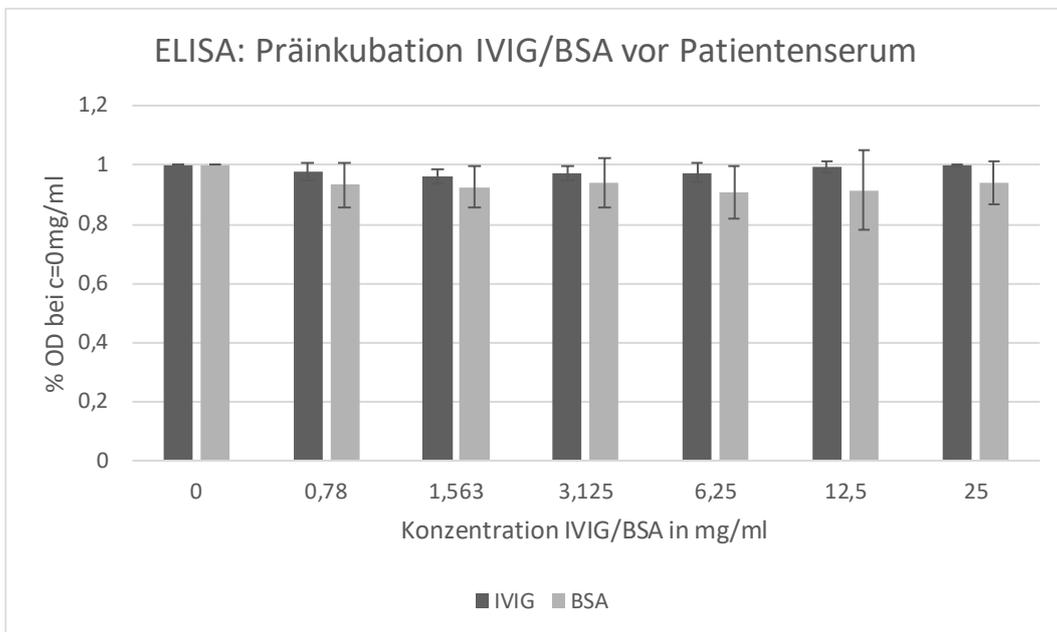


Abbildung 26: Präinkubation von IVIG/BSA vor Patientenserum: Im Diagramm ist das Verhältnis der ODs der Präinkubation von Privigen®-IVIG beziehungsweise BSA mit dem Primär-Antikörper (Patientenserum) in verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) zu den ODs ohne Zugabe von IVIG oder BSA für alle sechs Patienten/Patientinnen im Mittelwert abgebildet. Die ODs ohne Zugabe von IVIG oder BSA wurden hier als 100% festgelegt, um die Veränderung durch IVIG und BSA mit Standardabweichungen darstellen zu können. OD=Optische Dichte. Erstellt mit Excel.

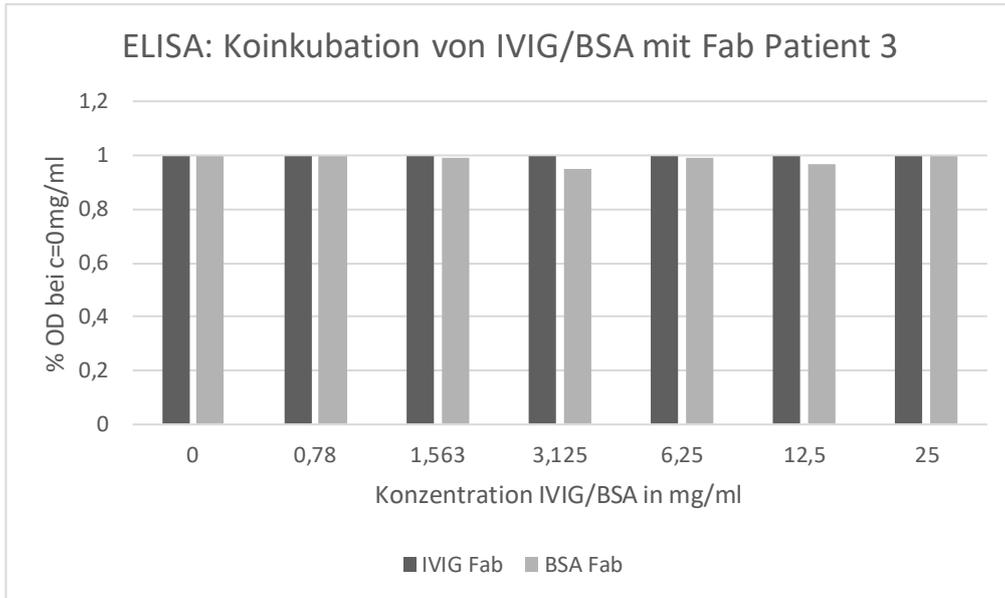


Abbildung 27: Koinkubation IVIG/BSA mit Fab: Im Diagramm ist das Verhältnis der ODs der Koinkubation von Privigen®-IVIG beziehungsweise BSA in verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) zu den ODs ohne Zugabe von IVIG oder BSA für die aufgereinigten Fab Fragmente von Patient 3 abgebildet. Die OD ohne Zugabe von IVIG oder BSA wurden hier als 100% festgelegt. OD=Optische Dichte. Erstellt mit Excel.

Zur Bestätigung der in vitro Versuche wurde der Effekt von IVIG auf die Antikörperbindung auch an HEK-293-Zellen getestet.

Hierbei zeigte sich insgesamt ein sehr starker Hintergrund durch die Zugabe von IVIG, der auch durch die Intensivierung der Waschschriffe nicht wesentlich reduziert werden konnte. Bei hohen IVIG Konzentrationen zeigte sich bei Präinkubation von IVIG vor dem Patientenserum (siehe Abbildung 29, Prä) sowie bei Koinkubation von IVIG mit dem Patientenserum (siehe Abbildung 28, Ko) optisch bei den positiven Patientenseren eine schwächere Antikörperbindung im Vergleich zu den Versuchen ohne IVIG, sowie im Vergleich zu den Versuchen mit BSA (vergleiche Abbildung 7, Schema der IVIG-Zugabe im ELISA). Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch eine Neutralisierung des Sekundär-Antikörpers durch unspezifisch gebundenes IVIG herbeigeführt wird, wurde die Koinkubation von IVIG mit dem Sekundär-Antikörper durchgeführt (siehe Abbildung 30, Post). Hierbei zeigte sich, dass es zur Bindung des Sekundär-Antikörpers an IVIG kommt. Bei Koinkubationsversuchen des Sekundär-Antikörpers mit IVIG und gemeinsamer Gabe zeigte sich auch bei geringen IVIG Konzentrationen von 0,78mg/ml keine Bindung der NF-155 positiven Patientenseren an die NF-155-DNA transfizierten HEK-Zellen mehr. Somit wurde die Limitation der zellbasierten Methode zur Untersuchung des Effektes von IVIG auf die Antikörperbindung aufgezeigt.

Untenstehende Bilder der HEK-Zellfärbungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit unter gleichen Bedingungen aufgenommen.

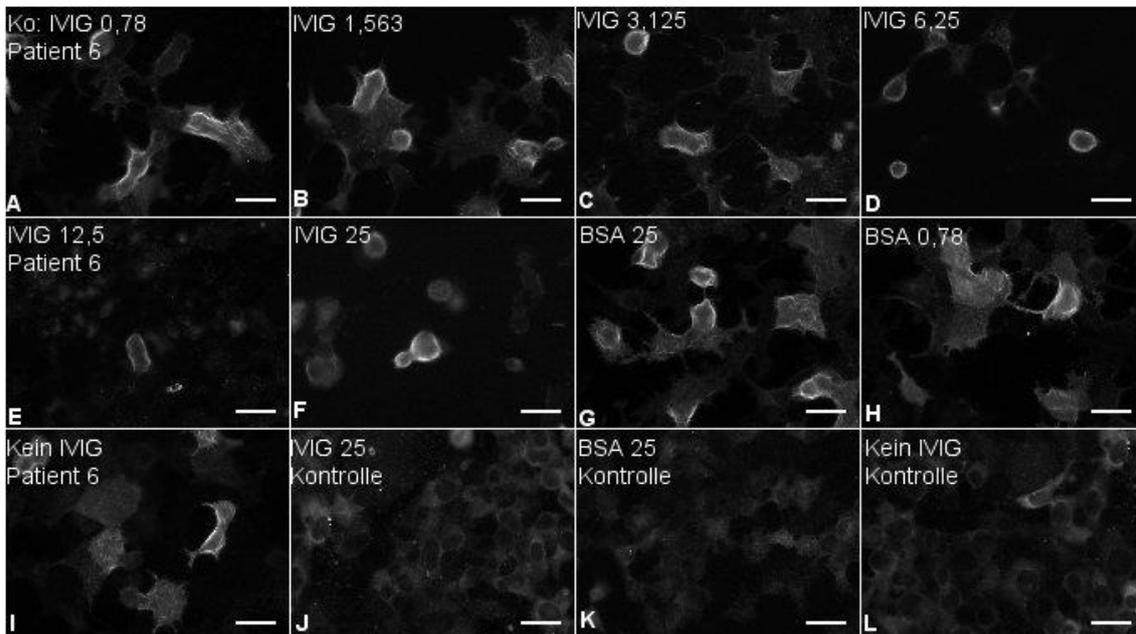


Abbildung 28: Koinkubation der NF-155 transfizierten HEK-293-Zellen von IVIG/BSA mit dem Patientenserum. Exemplarisch sind hier für Patient 6 Bilder der HEK-Zellfärbungen der Koinkubationsversuche von IVIG in verschiedenen Konzentrationen von 0,78 bis 25mg/ml (A bis F) sowie für BSA in 0,78 (H) und 25mg/ml (G) dargestellt. Zum Vergleich zeigt Bild I „Kein IVIG“ die Koinkubation mit Blocklösung anstelle von IVIG/BSA und Bild G zeigt die Koinkubation mit BSA in 25mg/ml. Die Bilder J und K stellen die Koinkubation mit IVIG oder BSA in 25mg/ml eines Kontrollserums dar. Man sieht bei IVIG Konzentrationen ab 6,25mg/ml (D) bis 25mg/ml (F) eine etwas schwächere Bindung der Patientenantikörper im Vergleich zu der äquivalenten BSA Konzentration (G) sowie im Vergleich zur Koinkubation ohne IVIG/BSA (I). Für die anderen fünf Patientenseren zeigte sich ein vergleichbarer Effekt. Einheit der IVIG/BSA Konzentrationen in mg/ml. Maßstab 10µm. Ko=Koinkubation.

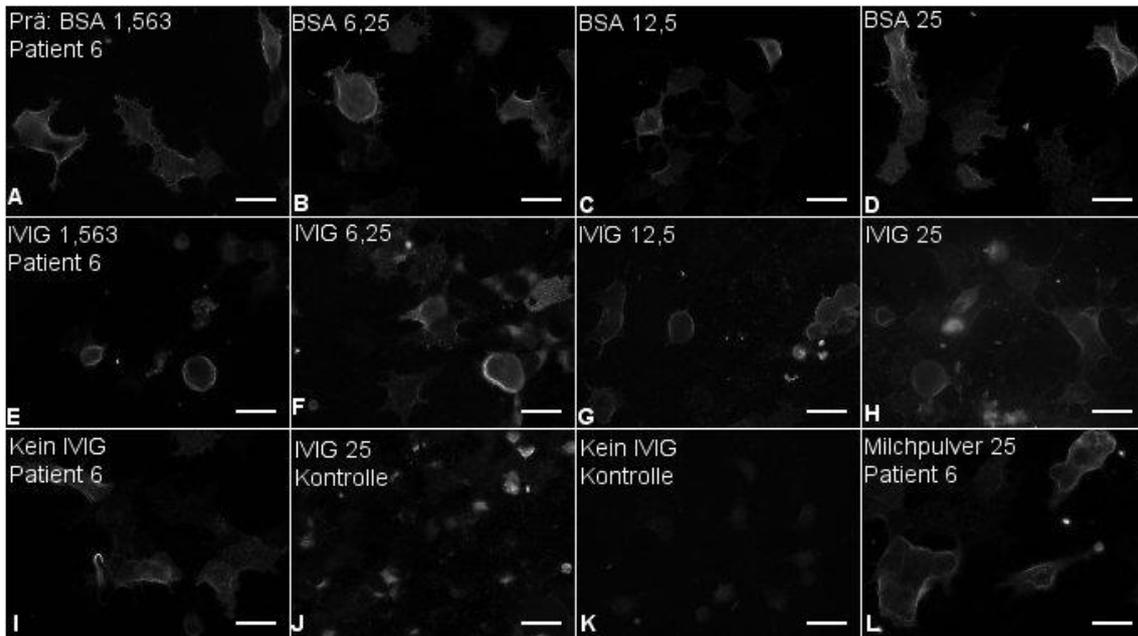


Abbildung 29: Präinkubation der NF-155 transfizierten HEK-293-Zellen mit IVIG/BSA vor Gabe des Patientenserums. Exemplarisch sind hier für Patient 6 Bilder der HEK-Zellfärbungen der Präinkubationsversuche von IVIG (E bis H) beziehungsweise BSA (A bis D) in verschiedenen Konzentrationen von 1,563 bis 25mg/ml dargestellt. Zum Vergleich zeigt Bild I „Kein IVIG“ die Präinkubation mit Blocklösung anstelle von IVIG/BSA und das Bild J zeigt die Präinkubation mit IVIG in 25mg/ml eines Kontrollserums. Man sieht bei hohen IVIG Konzentrationen von 12,5 und 25mg/ml (G, H) eine schwächere Bindung der Patientenantikörper im Vergleich zu den äquivalenten BSA Konzentrationen (C, D) sowie im Vergleich zur Präinkubation ohne IVIG/BSA (I). Für die anderen fünf Patientenserum zeigte sich ein vergleichbarer Effekt. Einheit der IVIG/BSA Konzentrationen in mg/ml. Maßstab 10µm. Prä=Präinkubation.

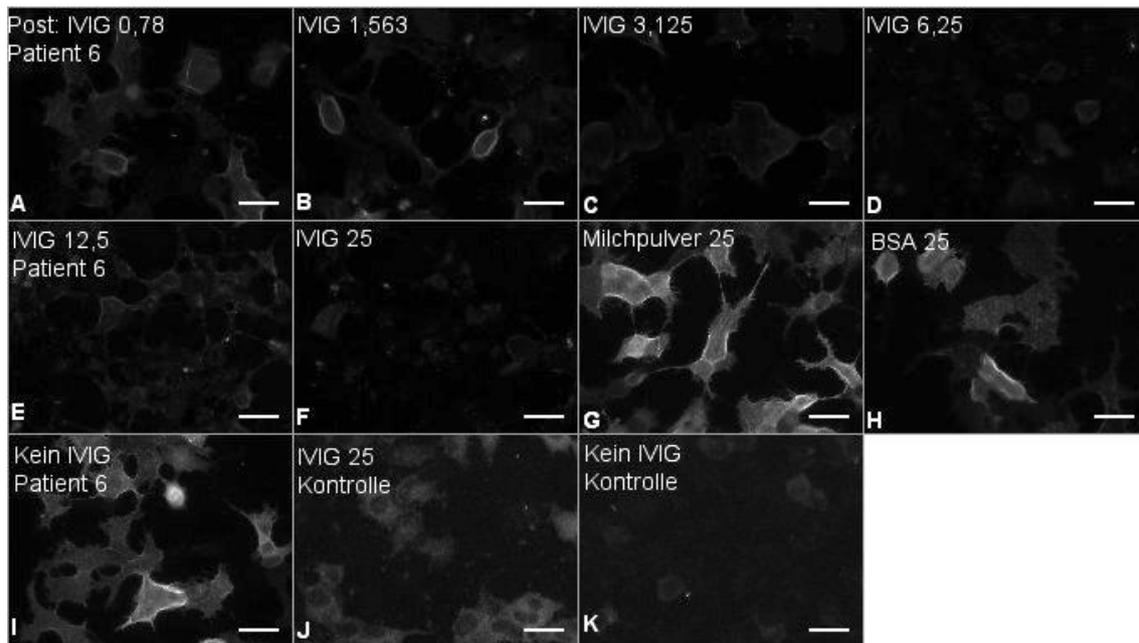


Abbildung 30: Inkubation der NF-155 transfizierten HEK-293-Zellen mit IVIG/BSA nach Gabe des Patientenserums/ Koinkubation mit dem Sekundär-Antikörper. Exemplarisch sind hier für Patient 6 Bilder der HEK-Zellfärbungen der Inkubationsversuche von IVIG (A bis F) in verschiedenen Konzentrationen von 0,78 bis 25mg/ml dargestellt. Zum Vergleich zeigt Bild I „Kein IVIG“ die Inkubation mit Blocklösung anstelle von IVIG/BSA und das Bild J zeigt die Inkubation mit IVIG in 25mg/ml eines Kontrollserums. Man sieht bereits bei niedrigen IVIG Konzentrationen von 3,125mg/ml (C) eine schwächere Bindung der Patientenantikörper. Zum Vergleich sind BSA und Milchpulverkonzentrationen von 25mg/ml (G, H) dargestellt, hier zeigt sich eine starke Bindung. Einheit der IVIG/BSA Konzentrationen in mg/ml. Maßstab 10µm. Post= Inkubation nach Patientenserum, zusammen mit Sekundär-Antikörper.

3.7.2 Reduktion der durch Anti-NF-155 Autoantikörper induzierten Komplementablagerung durch IVIG

Bei den Patienten/Patientinnen 3 bis 6, die im Komplementbindungsassay und in den zellbasierten Komplementversuchen bereits eine positive Komplementablagerung zeigten, wurde in einem ELISA-basierten und einem zellbasierten Verfahren der Einfluss von IVIG auf die Komplementablagerung untersucht.

Da sich nach ersten Versuchen das BSA als ungeeignete Kontrollsubstanz zeigte, vermutlich da C1q an das unspezifisch gebundene BSA bindet (Onica, et al., 1983), wurde als Kontrollsubstanz für die weiteren Versuche Milchpulver verwendet.

3.7.2.1 Reduktion der Komplementablagerung bei Koinkubation

Bei den Patienten/Patientinnen 3 bis 6 zeigte sich bei Koinkubation von IVIG in Konzentrationen von 0,78 bis 25mg/ml mit dem Komplementfaktor C1q eine konzentrationsabhängige, starke Reduktion der Komplementbindung bis zu 28 Prozent des Ausgangswertes bei der höchsten IVIG Konzentration (25mg/ml P-IVIG). Im Vergleich zeigte sich für die Zugabe von Milchpulver eine stabile OD unabhängig der

zugefügten Konzentration. Mithilfe des T-Testes für gepaarte Stichproben konnte auf Grundlage des 95 % Konfidenzintervalles bei SPSS untersucht werden, ob die Unterschiede der IVIG und Milchpulver Koinkubation signifikant sind. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede der Konzentrationen 3,125, 6,25, 12,5 und 25mg/ml.

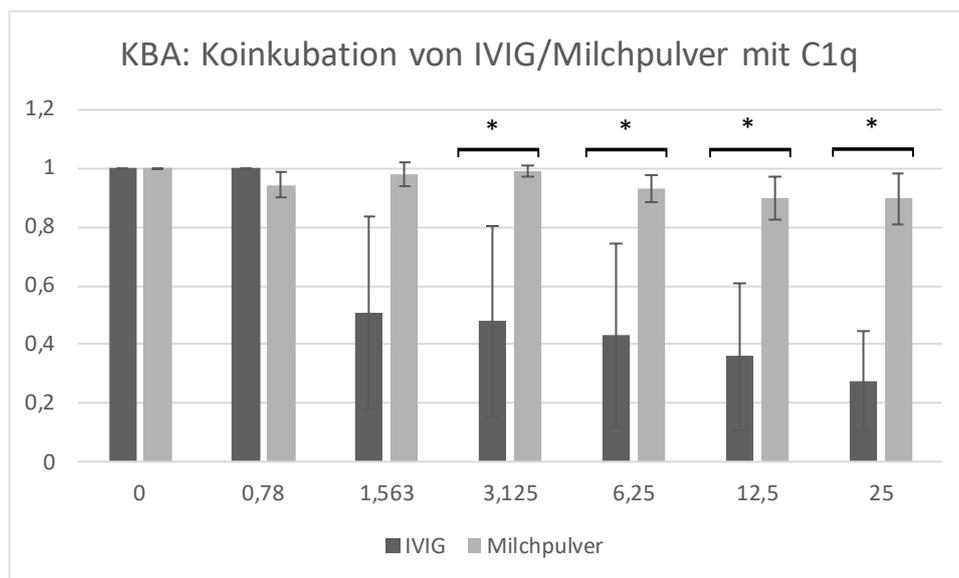


Abbildung 31: Koinkubation von IVIG/Milchpulver mit C1q: Im Diagramm ist das Verhältnis der ODs von Zugabe von IVIG beziehungsweise Milchpulver in verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) zu den ODs ohne Zugabe von IVIG oder Milchpulver für alle sechs Patienten/Patientinnen im Mittelwert abgebildet. Die ODs ohne Zugabe von IVIG oder Milchpulver wurde hier als 100% festgelegt, um die Veränderung durch IVIG und Milchpulver mit Standardabweichungen darstellen zu können. Durch geschweifte Balken mit Sternchen sind die signifikanten Reduktionen der Komplementbindung bei IVIG Zugabe für die Konzentrationen 3,125, 6,25, 12,5 und 25mg/ml dargestellt. OD=Optische Dichte. Erstellt mit Excel.

Test bei gepaarten Stichproben				
Paar: KBA Koinkubation [mg/ml]		Mittelwert IVIG [%]	Mittelwert Milchpulver [%]	Zweiseitiger P-Wert
IVIG 0,78	MP 0,78	100,0	94,3	0,078
IVIG 1,563	MP 1,563	50,9	97,9	0,058
IVIG 3,125	MP 3,125	48,0	99,1	0,049*
IVIG 6,25	MP 6,25	43,1	93,1	0,033*
IVIG 12,5	MP 12,5	35,9	90,0	0,012*
IVIG 25	MP 25	27,8	90,0	0,002*

Tabelle 29: T-Test bei gepaarten/verbundenen Stichproben. Verglichen wurden die Mittelwerte in Prozent der sechs Patienten/Patientinnen im KBA mit Koinkubation von IVIG und Milchpulver in den Konzentrationen 0,78, 1,563, 3,125, 6,25, 12,5 und 25mg/ml. In Spalte 1 und 2 sind die zu vergleichenden Konzentrationen von IVIG oder Milchpulver im mg/ml angezeigt. Spalte 3 und 4 bilden den Mittelwert in Prozent bei Koinkubation von IVIG oder Milchpulver und Spalte 4 den zweiseitigen P-Wert ab. Auf dem 0,05 Niveau sind oben abgebildete Unterschiede zwischen IVIG und Milchpulver Koinkubation signifikant für die vier höchsten Konzentrationen, dies ist durch ein Sternchen markiert. KBA=Komplementbindungsassay, MP=Milchpulver. Berechnet mit SPSS.

In zellbasierten Komplementbindungsassays wurde zudem die Koinkubation von C1q mit IVIG oder BSA untersucht. Hier zeigt sich, analog zu den Ergebnissen des in vitro KBAs, eine Reduktion der Komplementablagerung bei hohen IVIG Konzentrationen, insbesondere bei 12,5 und 25mg/ml. In den HEK-Zell Versuchen zeigte sich außerdem eine Abnahme der Bindung der Patientenantikörper bei hohen IVIG Konzentrationen, da das IVIG den gegen humanes IgG gerichteten Sekundär-Antikörper bindet und somit keine Patientenantikörperbindung mehr nachgewiesen werden kann. Eine Kolokalisation und genaue Analyse der Komplementbindung bei hohen IVIG Konzentrationen ist somit in den zellbasierten Versuchen nicht möglich.

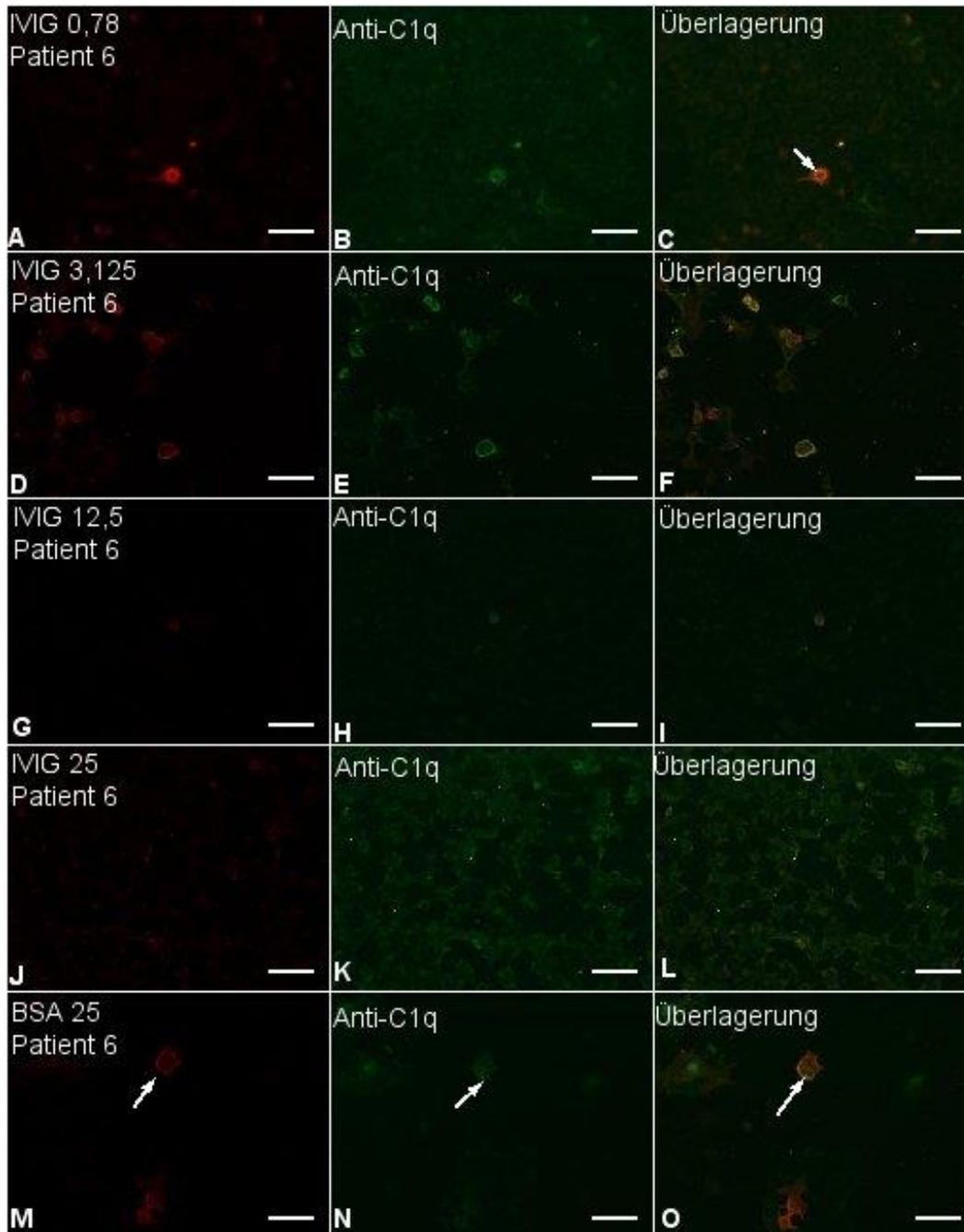


Abbildung 32: Komplementbindungsassay an NF-155 transfizierten HEK-293-Zellen mit Koinkubation von IVIG/BSA mit dem Komplementfaktor C1q. Für das Patientenserum 6 ist die Koinkubation von IVIG 0,78mg/ml (A bis C), 3,125mg/ml (D bis F), 12,5mg/ml (G bis I), 25mg/ml (J bis L) und BSA 25mg/ml (M bis O) mit C1q abgebildet. In rot (A, D, G, J, M) ist die Bindung der Patientenantikörper an NF-155 transfizierte HEK-Zellen mithilfe des Sekundär-Antikörpers gegen humanes IgG abgebildet. In grün (B, E, H, K, N) ist die spezifische Komplementbindung durch einen gegen C1q gerichteten Sekundär-Antikörper dargestellt. Die Bilder C, F, I, L, O zeigen die Kolokalisation der beiden Sekundär-Antikörper, um eine spezifische Komplementbindung nachzuweisen. Bei hohen IVIG Konzentrationen kommt es zu einer Abnahme der Antikörperbindung (durch Bindung des Sekundär-Antikörpers an IVIG) und der Komplementablagerung. Eine deutliche Komplementablagerung und Kolokalisation ist bei IVIG 0,78mg/ml und BSA 25mg/ml zu sehen (Pfeile). Maßstab 10µm.

3.7.2.2 Reduktion der Komplementablagerung bei Präinkubation

Zur Untersuchung eines möglichen neutralisierenden Effekts von IVIG auf die Komplementbindung, wurde die Präinkubation gebundener Patienten-Antikörper mit IVIG beziehungsweise Milchpulver vor C1q Zugabe getestet. Hier kam es bei Präinkubation von IVIG vor dem C1q zu einer starken, dosisabhängigen Reduktion der Komplementbindung bis auf 58 Prozent des Ausgangswertes (25mg/ml P-IVIG). Man sieht hier bereits bei niedrigdosiertem IVIG eine Abnahme, während die ODs unter Milchpulvergabe konstant über 95 Prozent des Ausgangswertes bleiben. Mithilfe des T-Testes für gepaarte Stichproben konnte, analog zur Koinkubation, auf Grundlage des 95% Konfidenzintervalles bei SPSS untersucht werden, ob die Unterschiede der IVIG und Milchpulver Präinkubation signifikant sind. Hier zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen IVIG und Milchpulver der Konzentrationen 1,563, 3,125, 6,25, 12,5 und 25mg/ml, sodass von einer signifikanten Reduktion der Komplementbindung durch IVIG auszugehen ist.

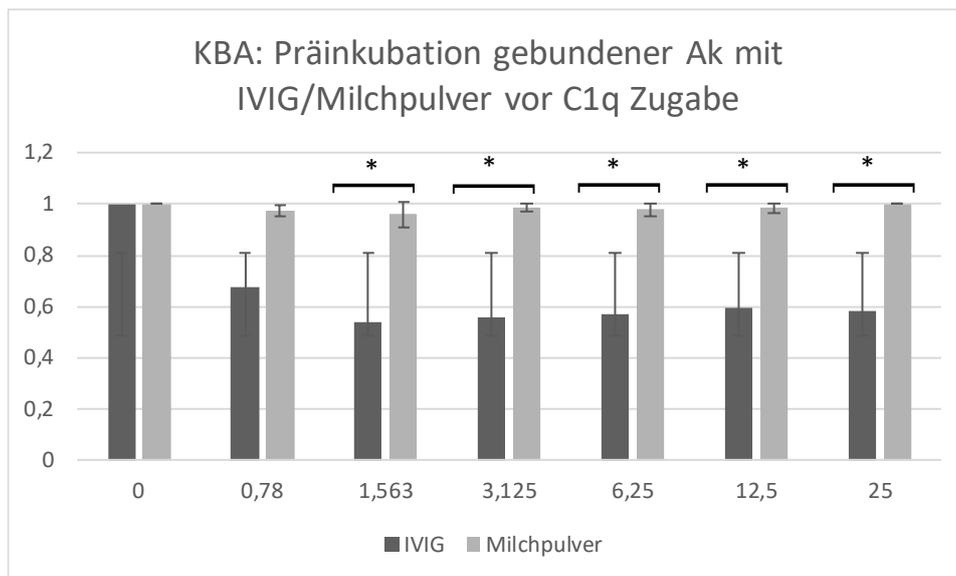


Abbildung 33: Präinkubation gebundener Antikörper mit IVIG/Milchpulver vor C1q Zugabe: Im Diagramm ist das Verhältnis der ODs von Zugabe von IVIG beziehungsweise Milchpulver in verschiedenen Konzentrationen (x-Achse) zu den ODs ohne Zugabe von IVIG oder Milchpulver für alle sechs Patienten/Patientinnen im Mittelwert abgebildet. Die ODs ohne Zugabe von IVIG oder Milchpulver wurde hier als 100% festgelegt, um die Veränderung durch IVIG und Milchpulver mit Standardabweichungen darstellen zu können. Durch geschweifte Balken mit Sternchen sind die signifikanten Reduktionen der Komplementbindung bei IVIG Zugabe für die Konzentrationen 1,563, 3,125, 6,25, 12,5 und 25mg/ml dargestellt. OD=Optische Dichte. Erstellt mit Excel.

Test bei gepaarten Stichproben				
Paar: KBA Präinkubation [mg/ml]		Mittelwert IVIG [%]	Mittelwert Milchpulver [%]	Zweiseitiger P-Wert
IVIG 0,78	MP 0,78	67,6	97,3	0,054
IVIG 1,563	MP 1,563	54,2	96,0	0,021*
IVIG 3,125	MP 3,125	55,6	98,9	0,039*
IVIG 6,25	MP 6,25	57,2	97,8	0,043*
IVIG 12,5	MP 12,5	59,3	98,7	0,037*
IVIG 25	MP 25	58,3	100,0	0,022*

Tabelle 30: T-Test bei gepaarten/verbundenen Stichproben (2). Verglichen wurden die Mittelwerte in Prozent der sechs Patienten/Patientinnen im KBA mit Präinkubation von IVIG beziehungsweise Milchpulver vor dem C1q in den Konzentrationen 0,78, 1,563, 3,125, 6,25, 12,5 und 25mg/ml. In Spalte 1 und 2 sind die zu vergleichenden Konzentrationen von IVIG oder Milchpulver in mg/ml angezeigt. Spalte 3 und 4 bilden den Mittelwert in Prozent von IVIG beziehungsweise Milchpulver Zugabe und Spalte 4 den zweiseitigen P-Wert ab. Auf dem 0,05 Niveau sind oben abgebildete Unterschiede zwischen IVIG und Milchpulver Präinkubation signifikant für fünf Konzentrationen, diese sind mit Sternchen markiert. KBA=Komplementbindungssassay, MP=Milchpulver. Berechnet mit SPSS.

3.8 Untersuchungen der Zytotoxizität an HEK-Zellen

3.8.1 Effekte von Transfektion und Inkubation mit Serum

Zytotoxizität und Zelllyse wurden durch LDH-Messungen an HEK-293-Zellen abgebildet. Die Transfektion mit NF-155 DNA, sowie die Inkubation mit Patienten- und Kontrollseren in Medium/BSA 2 % mit vorherigem Blockieren in Medium/BSA 10 % zeigten hier keine Erhöhung der Zelllyse und wurden so in das Protokoll eingefügt. Die Verdünnung der Seren in BSA/PBS 2 %, analog zu den HEK-Zellfärbungen unter 2.3.7.4, führte zu einer Erhöhung der LDH-Werte. Die Verdünnung der Seren in Medium führte zu einer vergleichbaren Zelllyse wie die Verdünnung in Medium/BSA 2 %, welche aufgrund des Blockierens unspezifischer Bindungen als Verdünnungslösung bevorzugt wurde.

3.8.2 Komplement-abhängige Zelllyse

Nachdem die Inkubation mit C1q vor dem humanen Komplementserum zu keiner erhöhten Zytotoxizität beitrug, wurde dieser Schritt bei den folgenden Versuchen weggelassen. Humanes Komplementserum in 1:2-Verdünnung, sowie die unverdünnte Gabe, führten zu einer unspezifischen Bindung des Komplements und hierdurch zu

hohen LDH-Werten, die sich auch in der Berechnung der relativen Zytotoxizität widerspiegeln.

	Verdünnung Komplementserum	Relative Zytotoxizität = $\frac{(\text{Testwert} - \text{Low Kontrolle})}{(\text{High Kontrolle} - \text{Low Kontrolle})} * 100 [\%]$
Patient 6	1:2	109,68 %
Kontrolle	1:2	84,67 %
Patient 6	unverdünnt	297,68 %
Kontrolle	unverdünnt	124,27 %

Tabelle 31: Relative Zytotoxizität mit humanem Komplementserum: Spalte 2 zeigt die Verdünnung des humanen Komplementserums. In Spalte 3 sind die relativen Zytotoxizitäten für Patient 6 sowie ein Kontrollserum in der jeweiligen Verdünnung des Komplementserums abgebildet. Es zeigen sich, auch für das Kontrollserum, deutlich erhöhte Zytotoxizitäten durch unspezifische Bindung des niedrig verdünnten Komplementserums.

Das 1:4 verdünnte Komplementserum zeigte, im Vergleich zu oben genannten Konzentrationen, keine erhöhte Zytotoxizität durch unspezifische Bindung. Patient 6 mit Prädominanz der IgG3-Subklasse zeigte in der 1:100 Verdünnung erhöhte absolute LDH-Werte im Vergleich zum Kontrollserum und zur Substanzkontrolle. Die errechnete relative Zytotoxizität, anhand Abzugs der Low Kontrolle, zeigt hier eine 26 Prozent erhöhte Zytotoxizität des Patientenserums, während die Kontrolle eine relative Zytotoxizität von 0 Prozent zeigt. In einer 1:20 Verdünnung ergaben sich erhöhte absolute ODs des Patientenserums 6, die im Vergleich zum Kontrollserum und zur Substanzkontrolle deutlicher sind als in der 1:100 Verdünnung. Dieser Effekt ist dadurch erklärbar, dass in der 1:20 Verdünnung mehr Autoantikörper des Patienten zu einer erhöhten Komplement-induzierten Zellyse führen. Die relativen Zytotoxizitäten wurden im Folgenden mit Abzug der Substanzkontrolle 2 gebildet, da hierbei die unspezifische Erhöhung der LDH-Werte, die rein durch das Komplementserum bedingt ist, keinen Einfluss auf die Zytotoxizität des Patientenserums hat. In der 1:20 Verdünnung zeigt das Patientenserum 6 eine um 20 Prozent erhöhte Zytotoxizität, während das Kontrollserum keine erhöhte Zytotoxizität misst.

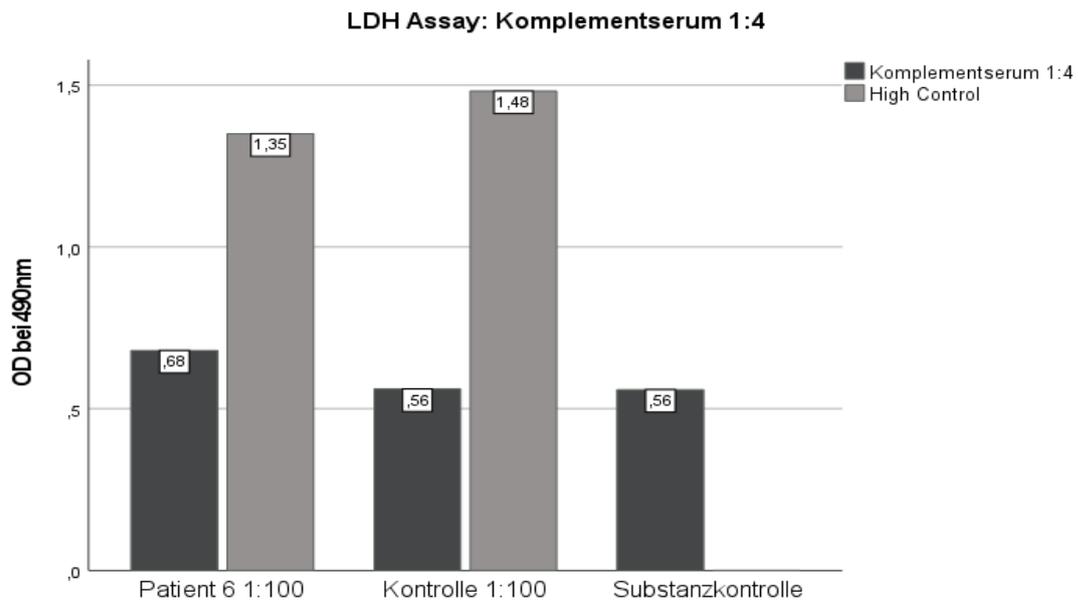


Abbildung 34: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4. Abgebildet sind die absoluten LDH Werte (Optischen Dichten) bei einer Wellenlänge von 490nm für Patientenserum 6 und ein Kontrollserum in 1:100-Verdünnung sowie die Substanzkontrolle 2 des humanen Komplementserums (nur Zellen mit Komplementserum 1:4). Die schwarzen Balken zeigen die absoluten Werte für die Testsubstanz (humanes Komplementserum in 1:4) und die hellgrauen Balken zeigen die Werte der High Kontrolle. Die LDH Werte des Kontrollserums sowie die der Substanzkontrolle mit humanem Komplementserum sind vergleichbar, während die LDH Werte des Patientenserums 6 mit Komplementserum erhöht sind. Dies weist auf eine erhöhte Zellyse des Patientenserums 6 hin. High Control= High Kontrolle mit Triton X 2 %, OD=Optische Dichte. Erstellt mit SPSS.

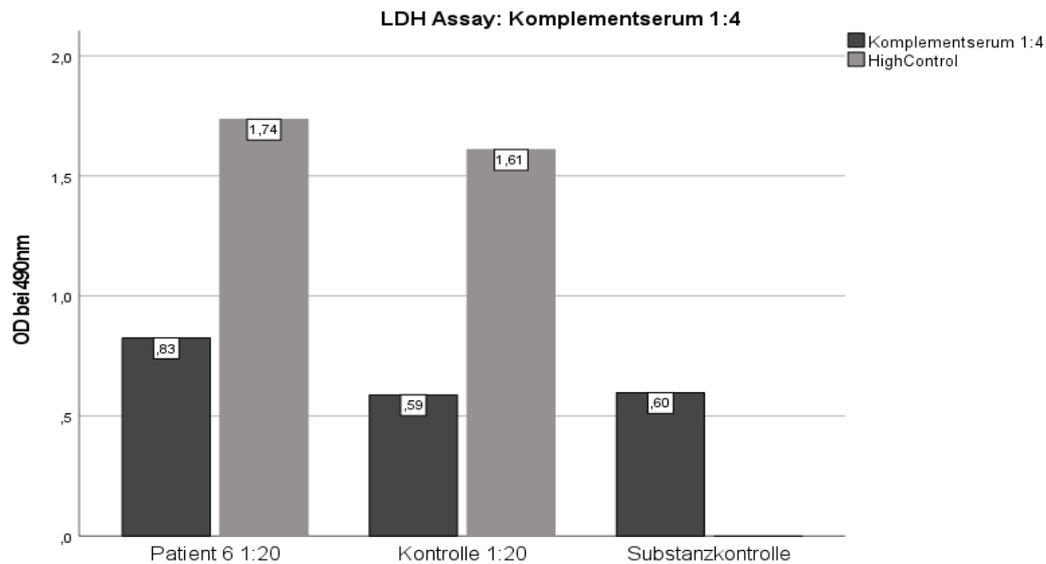


Abbildung 35: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4 (2). Abgebildet sind die absoluten LDH Werte (Optischen Dichten) bei einer Wellenlänge von 490nm für Patientenserum 6 und ein Kontrollserum in 1:20 Verdünnung sowie die Substanzkontrolle 2 des humanen Komplementserums (nur Zellen mit Komplementserum 1:4). Die schwarzen Balken zeigen die absoluten Werte für die Testsubstanz (humanes Komplementserum in 1:4) und die hellgrauen Balken zeigen die Werte der High Kontrolle. Die LDH Werte des Kontrollserums sowie die der Substanzkontrolle mit humanem Komplementserum sind vergleichbar, während die LDH Werte des Patientenserums 6 mit Komplementserum erhöht sind. Dies weist auf eine erhöhte Zellyse des Patientenserums 6 hin. High Control= High Kontrolle mit Triton X 2 %, OD=Optische Dichte. Erstellt mit SPSS.

Patient 1 und 2 mit der IgG4-Prädominanz und negativen Werten im Komplementbindungsassay zeigten im LDH-Zytotoxizitätstest keine erhöhte relative Zytotoxizität bei Zugabe des Komplementserums (relative Zytotoxizität 0 Prozent). Alle fünf weiteren getesteten Kontrollen waren ebenso negativ und zeigten keine Zytotoxizität (0 Prozent). Nur für Patientin 5 mit der IgG1, IgG2 und IgG4 Subklasse konnten leicht erhöhte LDH-Werte, sowie eine leicht erhöhte Zytotoxizität von 4,84 beziehungsweise 7 Prozent in 1:100-Verdünnung nachgewiesen werden. Zu diesem Resultat passt auch das Ergebnis des KBAs, in dem Patientin 5 die zweithöchste Komplementablagerung aufweist.

	Relative Zytotoxizität = $\frac{(\text{Testwert} - \text{Substanzkontrolle})}{(\text{High Kontrolle} - \text{Substanzkontrolle})} * 100$ [%]		
Patient 6 1:20	20,02 %	26,56 %	23,31 % ¹
Patient 6 1:20 mit IVIG	10,5 %		6,8 % ¹
Patientin 5 1:100	4,84 %	7,0 % ¹	
Patientin 5 1:100 mit IVIG	4,67 % ¹		
Patient 4 1:100	0 %		
Patient 3 1:100	0 %		
Patient 2 1:100	0 %		
Patient 1 1:100	0 %		

Tabelle 32: Relative Zytotoxizitäten in Prozent (Spalte 2) für alle sechs seropositiven Patienten/Patientinnen mit Anti-NF-155 Autoantikörpern. In geteilten Spalten wurden auch die reproduzierten Testwerte angegeben. Patient 6 wurde in einer Verdünnung von 1:20 insgesamt dreimal mit Zugabe von Komplementserum getestet (siehe Zeile 2). Die Testung von Komplementserum und IVIG wurde für Patient 6 zweimal getestet (siehe Zeile 3). Patientin 5 wurde in einer Verdünnung von 1:100 zweimal mit Komplementserum getestet (siehe Zeile 4). Die Zugabe von Komplementserum und IVIG wurde für das Patientenserum 5 nur einmal getestet (siehe Zeile 5). Dies entspricht den unter 2.3.2.3 berechneten angepassten Verdünnungen des ELISAs und ermöglicht einen quantitativen Vergleich zwischen den Patientenseren. 1= die markierten Werte wurden alle in einem Versuch durchgeführt und für die weitere Auswertung verwendet.

3.8.3 Effekte von IVIG auf die Zelllyse

Den Ergebnissen von oben entsprechend, wurden nur die Patientenseren 5 und 6, die bei Zugabe von humanem Komplementserum in 1:4 eine erhöhte Zytotoxizität aufwiesen, mit IVIG und Milchpulver getestet. IVIG und Milchpulver führten zu einer Erhöhung der ODs, weshalb die relativen Zytotoxizitäten mit den entsprechenden Substanzkontrollen 3 (Zellen mit Komplementserum und IVIG 25 mg/ml) und 4 (Zellen mit Komplementserum und Milchpulver 25 mg/ml) berechnet wurden, um die reinen Effekte abzubilden. Im Vergleich mit dem Kontrollserum und der jeweiligen Substanzkontrolle wurde deutlich, dass bei Zugabe von Milchpulver mit Komplementserum erhöhte LDH-Werte des Patientenserums 6 und auch leicht erhöhte Werte des Patientenserums 5 bestimmt wurden. Dies spricht dafür, dass die durch das

Komplementsystem bedingte Erhöhung der Zelllyse durch Milchpulver nicht abgeschwächt wurde. Bei Koinkubation von IVIG in 25 mg/ml mit dem Komplementserum zeigten sich allerdings ähnliche absolute LDH Werte der beiden Patientenserum 5 und 6, des Kontrollserums, sowie der Substanzkontrolle 3. Dies spricht dafür, dass bei Zugabe von IVIG die absoluten LDH Werte und damit die komplementabhängige Zelllyse des Patientenserums im Vergleich zum Kontrollserum nicht erhöht sind. Dieser Effekt konnte auch in den relativen Zytotoxizitäten abgebildet werden. Für Patient 6 mit einer erhöhten Ausgangszytotoxizität mit Komplementserum von 23,3 Prozent betrug die Zytotoxizität bei Zugabe von IVIG zum Komplementserum nur noch 6,8 Prozent. Auch für Patientin 5 wurde eine Reduktion der Zytotoxizität von 7 Prozent auf 4,7 Prozent mit IVIG festgestellt. Die Ergebnisse von Patient 6 waren in weiteren Tests reproduzierbar. Die relative Zytotoxizität von Patient 6 in 1:20-Verdünnung mit der Testsubstanz Komplementserum 1:4 konnte insgesamt dreimal reproduziert werden mit folgenden Werten: 23, 26 und 20 Prozent (siehe Tabelle 32). Die relative Zytotoxizität von Patient 6 in 1:20-Verdünnung mit der Testsubstanz Komplementserum 1:4 und IVIG 25mg/ml wurde insgesamt in zwei Versuchen bestimmt mit folgenden Werten: 10,5 und 6,8 Prozent. Aufgrund von Materialknappheit wurden keine weiteren IVIG Konzentrationen getestet und die oben genannte Konzentration, die auch der physiologischen IVIG Konzentration im Blut entspricht, gilt als exemplarisch.

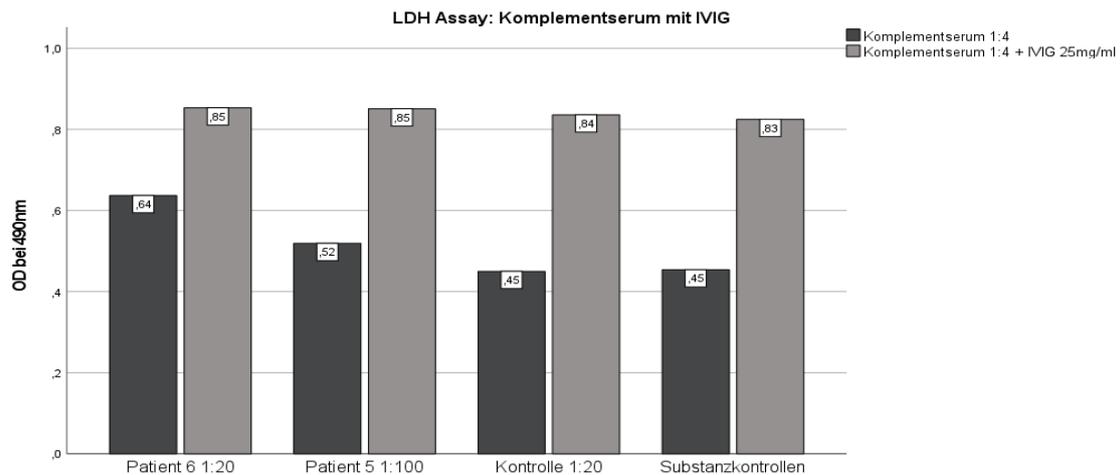


Abbildung 36: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4 und IVIG. Das Diagramm zeigt die absoluten LDH Werte (Optischen Dichten) bei einer Wellenlänge von 490nm des LDH Assays. Hierbei sind jeweils für das Patientenserum 6 in 1:20, das Patientenserum 5 in 1:100 und ein Kontrollserum die absoluten LDH Werte mit Komplementserum 1:4 (schwarze Balken) beziehungsweise mit Komplementserum 1:4 und IVIG 25mg/ml (hellgraue Balken) abgebildet. Die Substanzkontrolle beinhaltet zum einen nur Zellen mit Komplementserum 1:4 (schwarz, Substanzkontrolle 2) und zum anderen nur Zellen mit Komplementserum 1:4 und IVIG 25mg/ml (hellgrau, Substanzkontrolle 3). Patient 6 zeigt, im Vergleich zur Kontrolle und Substanzkontrolle, mit dem Komplementserum 1:4 eine erhöhte Zytotoxizität gemessen an LDH Werten, gefolgt von Patientin 5. Bei Koinkubation von Komplementserum mit IVIG zeigen sich ähnliche Werte für Patient/-in, Kontrolle und Substanzkontrolle bei insgesamt erhöhten Optischen Dichten durch unspezifische Bindung. OD=Optische Dichte. Erstellt mit SPSS.

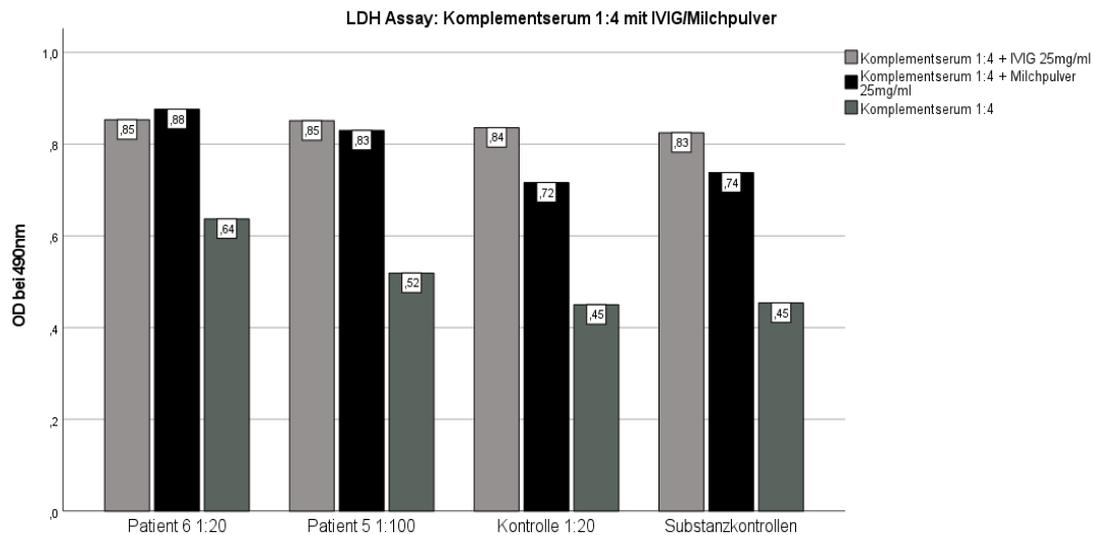


Abbildung 37: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4 und IVIG/Milchpulver. Das Diagramm zeigt die absoluten LDH Werte (Optischen Dichten) bei einer Wellenlänge von 490nm des LDH Assays. Hierbei sind jeweils für das Patientenserum 6 in 1:20, das Patientenserum 5 in 1:100 und ein Kontrollserum die absoluten LDH Werte mit Komplementserum 1:4 (dunkelgraue Balken) beziehungsweise mit Komplementserum 1:4 und IVIG 25mg/ml (hellgraue Balken) und Komplementserum 1:4 und Milchpulver 25mg/ml (schwarze Balken) abgebildet. Die Substanzkontrolle beinhaltet zum einen nur Zellen mit Komplementserum 1:4 (dunkelgrau, Substanzkontrolle 2) und zum anderen nur Zellen mit Komplementserum 1:4 und IVIG 25mg/ml (hellgrau, Substanzkontrolle 3) sowie nur Zellen mit Komplementserum 1:4 mit Milchpulver 25mg/ml (schwarz, Substanzkontrolle 4). Patient 6 zeigt, im Vergleich zur Kontrolle und Substanzkontrolle, mit dem Komplementserum 1:4 (dunkelgrau) sowie mit Komplementserum 1:4 und Milchpulver (schwarz) eine erhöhte Zytotoxizität gemessen an LDH Werten, gefolgt von Patientin 5. Bei Inkubation von Komplementserum mit IVIG (hellgrau) zeigen sich ähnliche Werte für Patient/-in, Kontrolle und Substanzkontrolle bei insgesamt erhöhten Optischen Dichten durch unspezifische Bindung. OD=Optische Dichte. Erstellt mit SPSS.

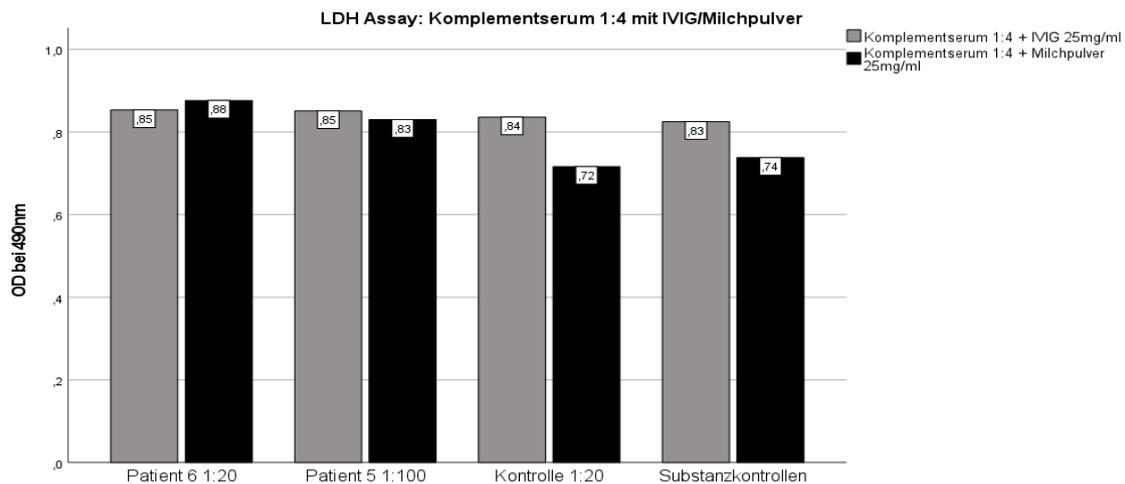


Abbildung 38: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4 und IVIG/Milchpulver (2). Das Diagramm zeigt die absoluten LDH Werte (Optischen Dichten) bei einer Wellenlänge von 490nm des LDH Assays. Hierbei sind jeweils für das Patientenserum 6 in 1:20, das Patientenserum 5 in 1:100 und ein Kontrollserum die absoluten LDH Werte mit Komplementserum 1:4 und IVIG 25mg/ml (hellgraue Balken) und Komplementserum 1:4 und Milchpulver 25mg/ml (schwarze Balken) abgebildet. Die Substanzkontrolle beinhaltet zum einen nur Zellen mit Komplementserum 1:4 und IVIG 25mg/ml (hellgrau, Substanzkontrolle 3) und zum anderen nur Zellen mit Komplementserum 1:4 mit Milchpulver 25mg/ml (schwarz, Substanzkontrolle 4). Patient 6 zeigt, im Vergleich zur Kontrolle und Substanzkontrolle, mit dem Komplementserum 1:4 und Milchpulver (schwarz) eine erhöhte Zytotoxizität gemessen an LDH Werten, gefolgt von Patientin 5. Bei Koinkubation von Komplementserum mit IVIG (hellgrau) zeigen sich ähnliche Werte für Patient/-in, Kontrolle und Substanzkontrolle bei insgesamt erhöhten Optischen Dichten durch unspezifische Bindung. OD=Optische Dichte. Erstellt mit SPSS.

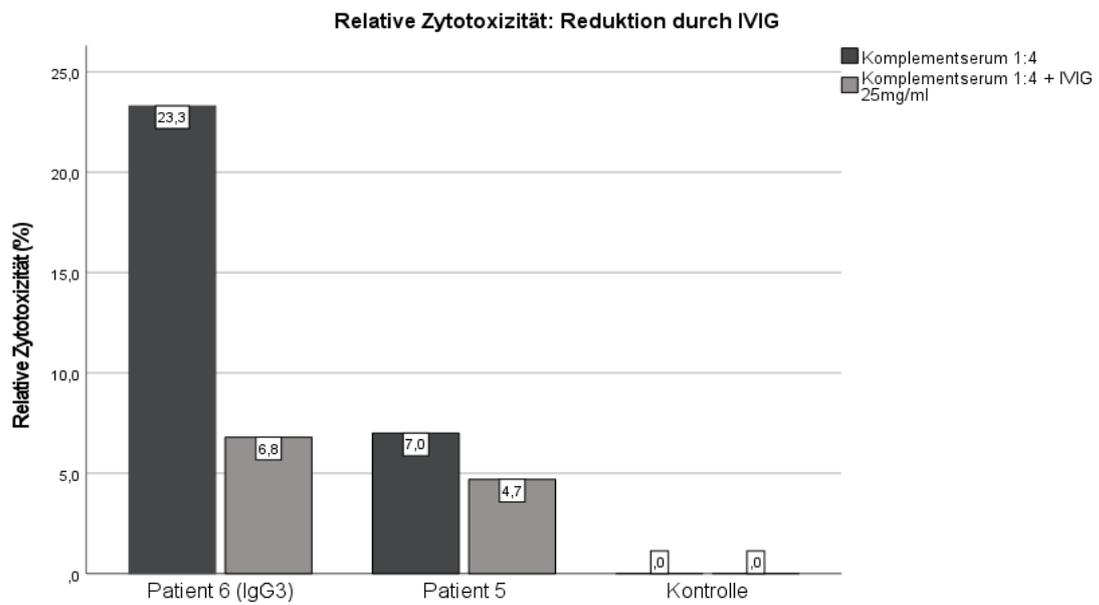


Abbildung 39: Reduktion der relativen Zytotoxizitäten durch IVIG. Abgebildet sind die relativen Zytotoxizitäten in Prozent von Patient 6 mit IgG3-Prädominanz und Patientin 5 sowie einer Kontrolle bei Zugabe von Komplementserum 1:4 (schwarz) beziehungsweise Komplementserum 1:4 mit IVIG 25mg/ml (hellgrau). Eine Reduktion der relativen Zytotoxizitäten durch Zugabe von IVIG ist bei Patientin 5 (von 7 % auf 4,7 % bei IVIG Zugabe) und 6 (von 23,3 % auf 6,8 % bei IVIG Zugabe) deutlich, während die Kontrolle keine erhöhte Zytotoxizität (0 %) aufweist. Erstellt mit SPSS.

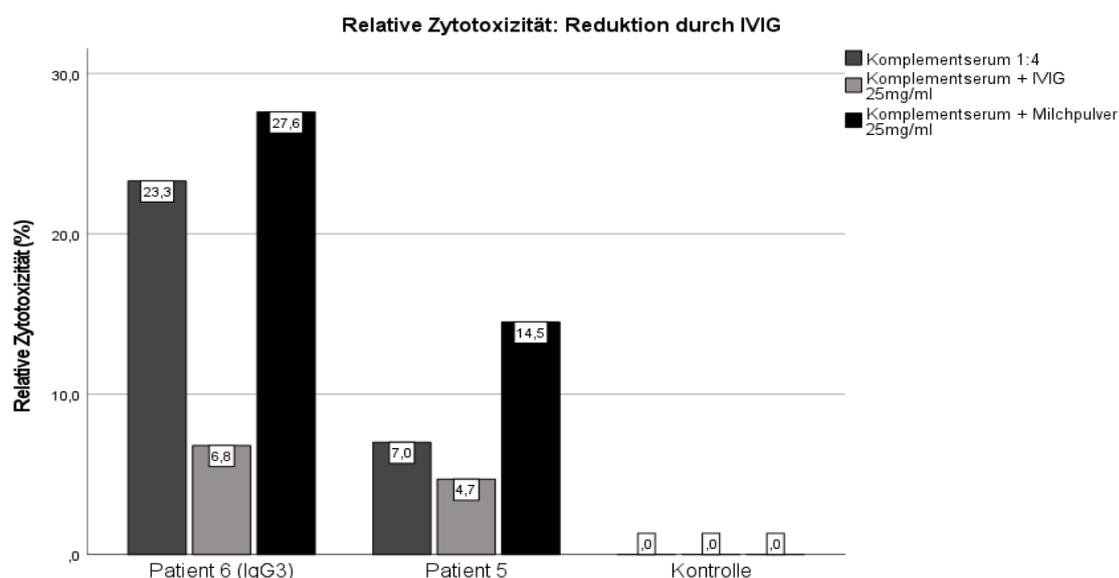


Abbildung 40: Reduktion der relativen Zytotoxizitäten durch IVIG (2). Abgebildet sind die relativen Zytotoxizitäten in Prozent von Patient 6 mit IgG3-Prädominanz und Patientin 5 sowie einer Kontrolle bei Zugabe von Komplementserum 1:4 (dunkelgrau), Komplementserum 1:4 mit IVIG 25mg/ml (hellgrau) und Komplementserum 1:4 mit Milchpulver 25mg/ml (schwarz). Eine Reduktion der relativen Zytotoxizitäten durch Zugabe von IVIG ist bei Patientin 5 (von 7 % auf 4,7 % bei IVIG Zugabe) und 6 (von 23,3 % auf 6,8 % bei IVIG Zugabe) deutlich, während die Kontrolle keine erhöhte Zytotoxizität (0 %) aufweist. Zusätzlich sind in dieser Abbildung, im Vergleich zur Abbildung 39, noch die relativen Zytotoxizitäten bei Zugabe von Milchpulver abgebildet. Erstellt mit SPSS.

3.9 Klinische Merkmale der Patienten/Patientinnen

3.9.1 Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen NF-155

Bei Patient 1 handelt es sich um einen, bei Einschluss in die Studie, 18-jährigen, jungen Mann. Seit seinem 11. Lebensjahr bemerkte er eine zunehmende Schwäche mit Feinmotorikstörung der Hände und Füße, sowie Gefühlsstörungen und ein Zittern der Hände. Im Alter von 18 Jahren erfolgte die Erstvorstellung in einer externen Klinik. Hier zeigte der Patient in der klinisch-neurologischen Untersuchung einen niederfrequenten, grobschlägigen, linksbetonten Halte-, Aktions- und Intentionstremor der Arme, der seitdem langsam progredient war. Zudem zeigte sich eine dezente, distale Schwäche mit progredienten distal betonten Paresen der Hände und Füße sowie eine distale Hypopallästhesie und Hypästhesien der Hände und Füße. Es zeigte sich zudem ein ataktisches Gangbild. Der Finger-Nase-Versuch sowie der Knie-Hacke-Versuch waren in der neurologischen Untersuchung ataktisch. Die Familienanamnese für neurologische Erkrankungen erwies sich als leer. In der elektroneurographischen Untersuchung war ein deutlich demyelinisierendes Muster mit sekundär axonalem Schaden festzustellen. Im Liquor waren eine zytalbuminäre Dissoziation sowie negative oligoklonale Banden

ersichtlich. In Zusammenschau der Befunde wurde der Verdacht auf eine CIDP gestellt. Die EFNS-/PNS-Kriterien von 2010 für die definitive Diagnose einer CIDP wurden bei Patient 1 erfüllt (Van den Bergh et al., 2010). Unter IVIG-Therapie mit insgesamt zwei Zyklen im Februar und Juli 2018 zeigte sich keine Besserung der Symptomatik. Nach vier Zyklen Plasmapheresetherapie im April 2019 sowie zweimaliger Gabe von Rituximab im März 2019 berichtete der Patient von einer deutlichen Besserung der Symptomatik. Der Tremor sei anamnestisch deutlich rückläufig und das Gangbild sicherer. In der klinisch-neurologischen Untersuchung zeigte sich nur noch eine leichte Unsicherheit beim Gehen ohne gerichtete Fallneigung. In Zusammenschau der Befunde wurde dies als gutes Ansprechen auf die Rituximabtherapie gewertet.

Bei Patient 2 handelt sich um einen bei Einschluss in die Studie 33-jährigen, männlichen Patienten. Die Symptome, wie rasch fortschreitende Schwächen der Beinmuskulatur, Gangunsicherheit und Taubheitsgefühl der Hände und Füße traten erstmalig 14 Monate vor Einschluss in die Studie im März 2018 auf. Er wurde erstmalig in einer externen Klinik vorgestellt. In der neurologischen Untersuchung zeigte sich eine aufsteigende Tetraparese mit Hyporeflexie. Außerdem stand ein sensibel-ataktisches Gangbild im Vordergrund. Der Hirnnervenbefund war unauffällig. Es zeigte sich eine Bradydysdiadochokinese, sowie ein links ataktischer und dysmetrischer Finger-Finger- und Finger-Nase-Versuch. Das Sensibilitätsempfinden wurde als seitengleich intakt angegeben. Der Lagesinn war am Großzehengrundgelenk aufgehoben und am Fingerendgelenk deutlich herabgesetzt. Die Elektroneurographie zeigte ein gemischt axonal-demyelinisierendes Muster. In der Liquordiagnostik offenbarte sich mehrmals eine zytalbuminäre Dissoziation, während oligoklonale Banden negativ waren. Zusätzlich wurde ein ANA-Titer von 1:1600 bestimmt. Es wurde der Verdacht auf eine schwer verlaufenden CIDP mit subakutem Beginn gestellt. Die EFNS-/PNS-Kriterien von 2010 für die definitive Diagnose einer CIDP wurden bei Patient 2 erfüllt (Van den Bergh et al., 2010). Eine Therapie mit IVIG im Juli und Dezember 2018 erwies sich als unwirksam, während fünftägige Plasmapheresezyklen im März 2019 eine langfristige Besserung der Symptome erzielten. Seit der Plasmapheresebehandlung ist der Patient wieder mit einem Rollator gehfähig. Eine Kortisonpulstherapie mit 1g Methylprednisolon über drei Tage im Februar und März 2019 zeigte keine Besserung. Aufgrund einer anaphylaktischen Reaktion während der Plasmapherese wurde als weitere Therapie im Juni 2019 eine Immunadsorption mit Protein-A-Säule und anschließender Rituximabtherapie begonnen. Hier berichtete der Patient von einer deutlichen Besserung der Symptome hinsichtlich der Kraft und Koordination. Am Rollator war er zunächst 300

Meter gehfähig. Nach dem dritten Zyklus der Rituximabtherapie berichtete der Patient im Frühjahr 2021 erneut von einer deutlichen Besserung der Symptomatik und Beschwerdefreiheit. Die Gehstrecke war nicht mehr eingeschränkt und Kraft, Sensibilität und Feinmotorik haben anamnestisch wieder den Normalzustand erreicht. In der klinisch-neurologischen Untersuchung ließ sich die Verbesserung objektivieren mit einer residuell bestehenden leichten Großzehenheberparese beidseits. Die Elektrophysiologie ergab ebenfalls eine deutliche Befundbesserung im Vergleich zur Voruntersuchung mit normwertigen distal motorischen Latenzen und nur leicht erniedrigten Nervenleitgeschwindigkeiten des N. tibialis und N. medianus. Serologisch zeigte sich eine Remission der Anti-NF-155 Autoantikörper, sodass zunächst eine Pausierung der Rituximab-Therapie unter weiteren Verlaufskontrollen veranlasst wurde.

Der bei Aufnahme in die Studie 78-jährige Patient 3 wurde in einer externen Klinik vorstellig. Erstmals war im Dezember 2017 eine Gangunsicherheit aufgefallen. Daraufhin seien stechende Schmerzen der Hände und Füße aufgetreten, die sich daraufhin wieder besserten. Zudem habe er Kribbelmissempfindungen der Hände sowie eine Schwäche der Beinmuskulatur bemerkt. Seit Beginn der Symptome war er nur noch mit Rollator mobil. Im Februar 2018 war er zur mikrochirurgischen Resektion einer Arachnoidalzyste auf Höhe BWK 4/5 vorstellig gewesen. Nach der Operation blieben die Symptome allerdings unverändert. Während eines stationären Rehaaufenthaltes erkrankte der Patient an einer Pneumonie mit respiratorischer Partialinsuffizienz, die eine invasive Beatmung nötig machte. Seitdem seien wieder stechende Schmerzen der Hände und Füße aufgetreten. Außerdem sei es vermehrt zu Stürzen gekommen, weswegen der Patient sich im Juli 2018 in einer externen Klinik vorstellte. In der Vorgeschichte war ein gastrointestinaler Infekt zu eruieren. Zur weiteren Abklärung der progredienten Symptomatik wurde der Patient daraufhin am Uniklinikum Würzburg stationär aufgenommen. Bei Aufnahme am UKW zeigte sich in der klinisch-neurologischen Untersuchung ein unauffälliger Hirnnervenbefund sowie leichtgradige Paresen der oberen Extremität und hochgradige Paresen der unteren Extremität. Insbesondere die Fußhebung war schwer betroffen. Zudem offenbarte sich ein Ruhe- und Haltetremor des linken Daumens und Zeigefingers. Im Finger-Nase-Versuch war ein Aktionstremor und eine Ataxie sichtbar. Außerdem zeigte sich eine ausgeprägte sensible Stand- und Gangataxie. Auffällig war außerdem eine Atrophie der Thenarmuskulatur mit gehäuften Faszikulationen. Muskeleigenreflexe waren nicht auslösbar. Als sensible Symptome lagen eine distal betonte Hypästhesie der oberen Extremität sowie eine Anästhesie der unteren Extremität ab Kniehöhe vor. In der Elektroneurographie zeigte

sich ein gemischt axonal-demyelinisierendes Muster mit Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeiten und motorischen und sensiblen Amplituden. Bei der Hautbiopsie wurde eine normale Anzahl intraepidermaler Nervenfasern mit 10,6 Fasern/mm befundet. In der Hautprobe vom Finger zeigten sich wenige myelinisierte Fasern sowie verlängerte Ranvier-Schnürringe. In der Liquoruntersuchung zeigte sich eine zytalbuminäre Dissoziation. Im Labor waren ANA, ENA und ANCA negativ. Es wurde eine gemischt sensomotorische symmetrische demyelinisierende Polyneuropathie im Sinne einer CIDP nach EFNS-/PNS-Kriterien von 2010 diagnostiziert (Van den Bergh et al., 2010). Daraufhin wurde eine Therapie mit intravenösen Immunglobulinen 2g/kg Körpergewicht, fraktioniert über fünf Tage, begonnen. Es folgten sechs Zyklen, die allerdings nur initial mit einer Besserung der Symptome einhergingen. Ein weiterer Therapieversuch mit fünfmaliger Plasmapheresebehandlung wurde durchgeführt, unter der sich vor allem die neuropathischen Schmerzen und die Allodynie besserten. Eine langfristige Behandlung mit Rituximab wurde daraufhin begonnen. Hierunter zeigte sich eine deutliche Besserung der Ataxie der Extremitäten sowie in Übereinstimmung mit der Selbsteinschätzung des Patienten eine Besserung der distalen und beinbetonten Paresen.

Patient 4 stellte sich im Alter von 28 Jahren erstmalig im Oktober 2017 zur Einholung einer Zweitmeinung bei auswärtig diagnostizierter CIDP in der Polyneuropathiesprechstunde des Uniklinikum Würzburgs vor. Erstmals habe er Missempfindungen und ein Taubheitsgefühl der Füße nach einem Auslandsaufenthalt im Dezember 2015 bemerkt. Daraufhin entwickelten sich innerhalb der nächsten drei Monate distale und proximale Schwächen mit Gangunsicherheit und subjektiver Koordinationsstörung der unteren Extremität. In der klinisch-neurologischen Untersuchung zeigte sich ein unauffälliger Hirnnervenbefund sowie ein unsicheres, breitbasiges Gangbild mit Steppergang beider Beine. Der Patient war, bis auf zwei bis drei Schritte, nur mit Hilfe eines Rollators gehfähig. In der Kraftprüfung zeigte sich eine Plegie der Fußheber sowie Zehenheber und -senker. Zudem war eine symmetrische Atrophie der Unterschenkel aufgefallen, mit Betonung am distalen Fuß. Im Finger-Nase-Versuch zeigten sich beidseits ein Flapping-Tremor, pseudoathetotische Bewegungen der Hände sowie ein Intentionstremor. In der Sensibilitätsprüfung war eine strumpf- und handschuhförmige Hypästhesie auffällig. Zudem lag eine Areflexie vor. Als autonome Symptome zeigte der Patient Blutdruckschwankungen, Schwindel im Sinne einer orthostatischen Hypotension, eine Veränderung des Hautcolorits und eine Pollakisurie. Zudem bestehe seit 2015 eine Depression. Die Familienanamnese ist leer für

neurologische Erkrankungen. In der ersten Elektroneurographie 2015 fiel ein demyelinisierendes Muster, sowie nicht abgrenzbare F-Wellen, verlängerte distal motorische Latenzen und reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten auf. In der Liquordiagnostik zeigte sich eine zytalbuminäre Dissoziation mit 4 Zellen und erhöhtem Eiweißgehalt. Die EFNS-/PNS-Kriterien von 2010 für die definitive Diagnose einer CIDP wurden bei Patient 4 erfüllt (Van den Bergh et al., 2010). Ab 2015 wurde eine Therapie mit intravenösen Immunglobulinen mit 2g/kg Körpergewicht über vier Tage alle vier Wochen begonnen. Hier zeigte sich eine deutliche Besserung der proximalen Paresen sowie der Gangunsicherheit. Außerdem führte eine Cortisonstoßtherapie zu einer Besserung der Symptome. Allerdings verschlechterte sich der Zustand des Patienten während eines Reha-Aufenthalts weiter, sodass eine Steroidpulstherapie über drei Tage begonnen wurde. Unter der Steroidtherapie kam es zu einer weiteren Verschlechterung der Symptome, sodass erneut Immunglobuline in einer Gesamtdosis von 160g über fünf Tage verabreicht wurden. Daraufhin folgten regelmäßige Immunglobulingaben von 1g/kg Körpergewicht alle drei Wochen. Aufgrund der zunehmenden Verschlechterung des Patienten mussten die Intervalle verkürzt und die Maximaldosis verabreicht werden. Im Jahr 2017 hat sich der Zustand des Patienten weiter verschlechtert, sodass er auf einen Rollstuhl angewiesen war. Außerdem entwickelte der Patient einen Handtremor sowie eine orthostatische Dysregulation. Im Laufe des Jahres 2017 haben auch die Sensibilitätsstörungen des Patienten zugenommen. Des Weiteren klagte der Patient auch über neuropathische Schmerzen, vor allem der unteren Extremität unter Angabe von 7 von 10 Punkten auf der numerischen Ratingskala NRS. Aufgrund der Verschlechterung der Symptomatik haben die behandelnden Ärzte in Mainz eine Eskalation der immunmodulatorischen Therapie vorgeschlagen. Seit 2018 erfolgten subkutane Immunglobulingaben (SCIG). Ein Therapieversuch mit Rituximab 2017/2018 wurde als Eskalationstherapie empfohlen. Unter insgesamt sechs Zyklen Rituximab zeigte sich eine Besserung des Tremors. Im November 2021 berichtete der Patient unter SCIG und Rituximabtherapie von einer stabilen neurologischen Symptomatik mit Kribbelparästhesien, beidseitiger Fußheberschwäche sowie einer Begrenzung der Gehstrecke auf 100m mit Rollator.

Bei Patientin 5 handelt es sich um eine bei Rekrutierung 52-jährige, weibliche, in einer externen Klinik vorstellige Patientin. Die Erstmanifestation der Symptome mit Muskelschmerzen, Taubheitsgefühl der Zehen, Feinmotorikstörung der Hände und progredienter Schwäche der Beine mit resultierenden Stürzen erfolgte im Juli 2016. In der klinisch-neurologischen Untersuchung zeigte sich eine distal betonte

sensomotorische Polyneuropathie mit schlaffer Tetraparese, distaler Hypästhesie, sensibler Ataxie und Hyporeflexie. In der Elektroneurographie zeigte sich ein schweres demyelinisierendes Muster mit am ehesten sekundär axonalem Schaden. Die Liquordiagnostik offenbarte negative oligoklonale Banden und eine zytalbuminäre Dissoziation mit normaler Zellzahl und gleichzeitig erhöhtem Eiweiß. In Zusammenschau der Befunde wurde der Verdacht auf eine CIDP nach EFNS-/PNS-Kriterien von 2010 gestellt (Van den Bergh et al., 2010). Daraufhin erfolgte eine Cortisonstoßtherapie im Januar 2017 mit 1g Methylprednisolon über vier Tage, die jedoch zu keiner Besserung führte. Im Frühjahr 2017 habe sich die Feinmotorikstörung der Hände verschlechtert, sodass ein Therapieversuch mit IVIG durchgeführt wurde, der allerdings kaum eine Wirkung zeigte. Des Weiteren wurde eine Therapie mit Azathioprin aufgrund gastrointestinaler Nebenwirkungen abgebrochen. Zum Zeitpunkt der Rekrutierung befand sich die Patientin im vierten Zyklus der Immunadsorption 2018. Die Immunadsorptionen führten zunächst zu einer deutlichen Besserung der Kraft sowie der Sensibilitätsstörungen. Dieser Effekt hielt jedoch nur ungefähr vier Wochen an. Bei anamnestisch unzureichendem Ansprechen auf eine Immunadsorption wurden von 2019 bis 2021 insgesamt acht Plasmapheresezyklen über fünf Tage durchgeführt. Subjektiv habe die Patientin anfangs von den Plasmapheresezyklen besser profitiert. Insgesamt sei der neurologische Befund stabil geblieben. Die Patientin leide insbesondere unter der Hypästhesie der Hände sowie der Feinmotorikstörung. Aufgrund der gleichbleibenden Symptomatik sowie dem Ausbleiben von Exazerbationen der CIDP konnte das Plasmaphereseintervall verlängert werden. In der Familienanamnese ist auffällig, dass die Schwester der Patientin auch an einer CIDP leidet. Das Serum der Schwester wurde ebenfalls auf Antikörper gegen Neurofascin-155 und Contactin-1 im ELISA und an Zupfnerven untersucht. Hier zeigten sich keine paranodalen Antikörper im Serum.

Patient 6 ist ein bei Rekrutierung 71-jähriger, männlicher Patient mit schwerer CIDP aus Halle und Pan-Neurofascin Autoantikörpern. Seit September 2017 entwickelte der Patient in kurzer Zeit symmetrisch aufsteigende Paresen. In der neurologischen Untersuchung zeigte sich initial eine Tetraparese mit MRC Kraftgraden von 2/5 der oberen und unteren Extremität, sowie eine ausgeprägte Fazialisparese und okulomotorische Defizite. Die Muskeleigenreflexe waren allseits erloschen. In der Sensibilitätsprüfung zeigte sich eine Pallanästhesie sowie eine Hypästhesie. In der initialen elektrophysiologischen Untersuchung des N. tibialis und N. ulnaris zeigten sich keine Reizantworten. In einer anschließenden motorischen Elektroneurographie wurden

verlängerte distal motorische Latenzen, reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten und ein F-Wellen Verlust beschrieben. Im Liquor fand sich eine zytalbuminäre Dissoziation sowie zwölf identische Banden im Liquor und Serum ohne lokale Synthese. Seit Beginn des klinischen Aufenthaltes war der Patient bei Globalinsuffizienz beatmungspflichtig. Er zeigte eine schwere CIDP mit Erfüllung der EFNS-/PNS-Kriterien von 2010 mit Hirnnervenbeteiligung und respiratorischer Insuffizienz sowie autonomer Beteiligung (Van den Bergh et al., 2010). Unter IVIG-Therapie mit einer Gesamtdosis von 200g im September 2017 zeigte sich eine Progredienz der Symptomatik und zunehmende Affektion der kaudalen Hirnnerven. Schlucken war dem Patienten nicht möglich. Unter Plasmapheresetherapie konnte zunächst eine Besserung der Fazialisparese sowie der Okulomotorikstörung erreicht werden. Der Patient wurde noch während des stationären Aufenthaltes kardiopulmonal instabil und musste aufgrund eines hypoxischen Kreislaufversagens reanimiert werden. Bei progredientem Nierenversagen wurde zudem die Indikation zur Dialyse gestellt. Eine bestehende pneumogene Sepsis wurde mit verschiedenen Antibiotika und Antimykotika behandelt. Aufgrund einer chronischen Anämie erhielt der Patient mehrere Erythrozytenkonzentrate sowie Erythropoetin. Unter Immunadsorption besserte sich die Symptomatik zunächst. Es zeigte sich eine leichte Spontanbewegung der Arme und Finger und eine CPAP Beatmung war möglich. Im Folgenden kam es jedoch erneut zu einer Progredienz der Paresen, sodass die Gabe von Rituximab sowie Steroidpulstherapien erfolgten. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine respiratorische Globalinsuffizienz bei ansteigenden Entzündungsparametern und Katecholaminpflichtigkeit. Im Juli 2018 verstarb Patient 6 an einer pneumogenen Sepsis mit Multiorganversagen.

Patient/-in	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Geschlecht	m	m	m	m	w	m
Alter	18	33	78	28	52	71
Zeit von Symptombeginn bis Rekrutierung (Monate)	84,0	14,0	10,0	22,0	28,0	< 1
Vorausgegangener Infekt	nein	nein	GIT	nein	nein	nein
Motorische Symptome	Dezente distale Paresen	Schlaffe Tetraparese Gehunfähigkeit	Distale Paresen UE Atrophie Thenar Faszikulation Gehunfähigkeit	Distale Paresen UE Gehunfähigkeit Stand-/Gangunsicherheit	Schlaffe Tetraparese	Tetraparese
Tremor	Halte-, Aktions- und Intentionstremor der Arme li	nein	Ruhe- und Haltetremor Aktionstremor	Intentionstremor Flapping-Tremor beidseits	nein	nein
MRC-Score (max 60) zum Zeitpunkt der Rekrutierung	56	50	46	50	46	24

Lokalisation der motorischen Symptome	Distal> proximal Sym.	Distal nach proximal aufsteigend Sym.	Distal> proximal Sym.	Distal> proximal Sym.	Distal> proximal Sym.	Distal nach proximal aufsteigend Sym.
Sensible Symptome	Distale Hyp- ästhesie sensible Ataxie	Distale Hyp- ästhesie sensible Ataxie	Distale Hyp- ästhesie Anästhesie ab Knie sensible Ataxie Allodynie	Distale Hyp- ästhesie neuropathischer Schmerz sensible Ataxie	Hypästhesie Pallhypästhesie sensible Ataxie	Pallanästhesie distale und proximale Hyp- ästhesie
Hirnnerven-Beteiligung	nein	nein	nein	nein	nein	III, VI, VII, IX, X
Vegetative Symptome	nein	nein	Beinödeme Herzinsuffizienz	RR-Schwank. Pollakisurie Hautcolorit	nein	Nierenversagen CPR
Muskeleigenreflexe	Areflexie	Hyporeflexie	Areflexie	Areflexie	Hyporeflexie	Areflexie
Liquor: Zellzahl/µl	3 Zellen/µl	4 Zellen/µl	8 Zellen/µl	4 Zellen/µl	1 Zelle/µl	2 Zellen/µl
Liquor: Eiweiß [mg/dl]	439,7 mg/dl	145,5 mg/dl	140 mg/dl	200 mg/dl	146,2 mg/dl	90 mg/dl
Elektroneuro-graphie	Demyelinisierend Sekundär axonaler Schaden	Gemischt axonal demyelinisierend	Gemischt axonal demyelinisierend	Gemischt axonal demyelinisierend	Demyelinisierend Sekundär axonaler Schaden	Demyelinisierend

dmL	↑	↑	↑	↑	norm	↑
Sensible NLG	↓	↓	↓	↓	↓	n.d.
Sensible Amplitude	↓	↓	↓	↓	↓	n.d.
Motorische NLG	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Motorische Amplitude	↓ UE	↓	↓	↓	↓	↓
F-Wellen	Latenz ↑	keine	keine	keine	keine	keine
Leitungsblock	nein	Mgl.	nein	Mgl. Dispersion	Leitungsblöcke Dispersion	Dispersion
EMG: Spontanaktivität	nein	nein	ja	gering	n.d.	ja
Paranodale Ak	Anti-NF-155 hlgG	Anti-NF-155 hlgG	Anti-NF-155 hlgG	Anti-NF- 155 hlgG	Anti-NF-155 hlgG	Pan-NF hlgG
Titer	1:1500	1:5000	1:14000	1:6000	1:5000	1:1500

Tabelle 33: Klinische Daten, Liquorbefunde und Ergebnisse der Elektroneurographie der sechs seropositiven Patienten mit Anti-NF-155 Autoantikörpern. III= Hirnnerv 3 befallen, N. oculomotorius; VI=Hirnnerv 6 befallen, N. abducens; VII=Hirnnerv 7 befallen, N. facialis; XI=Hirnnerv 9 befallen, N. glossopharyngeus; X=Hirnnerv 10 befallen, N. vagus; Ak=Antikörper; CPR=cardiopulmonary resuscitation/kardiale Wiederbelebung; dmL=distal motorsiche Latenz; EMG=Elektromyographie; GIT=gastrointestinal; hlgG=humanes IgG; HN=Hirnnerven; li=links; m=männlich; Mgl=möglich; MRC-Score=Medical Research Council Scale Muskelkraft modifiziert nach Merkies et al (Merkies et al., 2003); n.d.=nicht durchgeführt; NLG=Nervenleitgeschwindigkeit; OE=obere Extremität; re=rechts; RR-Schwank=Blutdruckschwankung; sym.=symmetrisch; UE=untere Extremität; w=weiblich.

Patient/-in	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
IVIG	unwirksam	unwirksam	Akutphase Besserung	Akutphase deutliche Besserung	Kaum wirksam	unwirksam
Plasmapherese	Besserung	Besserung	Besserung	n.d.	n.d.	Initiale Besserung
Steroidpuls- therapie	n.d.	unwirksam	n.d.	Besserung	unwirksam	unwirksam
Immunad- sorption	n.d.	Besserung	n.d.	n.d.	Initiale Besserung	Initiale Besserung
Rituximab	Besserung	Deutliche Besserung	Besserung	Besserung des Tremors	n.d.	Initiale Besserung

Tabelle 34: Therapeutisches Ansprechen der sechs seropositiven Patienten. N.d.= Therapieform nicht durchgeführt

Bei den beiden seropositiven Patienten 9 und 10 mit niedrigtitrigen Anti-NF-155 Autoantikörpern handelt es sich um männliche Patienten mit einer A-CIDP. Patient 9 ist ein 76-jähriger Patient mit subakutem Beginn bei vorwiegend motorischer Affektion, Verlust der Gehfähigkeit und Hirnnervenbeteiligung mit Dysphagie und einer Hypoglossusparese. In der Elektroneurographie zeigte sich ein axonal-demyelinisierendes Muster mit Spontanaktivität. Ein Therapieversuch mit IVIG erzielte initial eine Besserung. Dennoch verstarb der Patient in der Akutphase der Erkrankung.

Bei dem 50-jährigen A-CIDP Patienten 10 zeigte sich ebenfalls ein subakuter Beginn mit progredienter proximal betonter bilateraler Armparese, Kribbelparästhesien der Arme und Areflexie. Zudem wurde ein deutlich motorisch betonter demyelinisierender Schaden mit Verlängerung der F-Wellen sowie Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit detektiert. Unter IVIG Therapie zeigte sich eine permanente Verbesserung der Symptomatik.

3.9.2 Zusammenfassung der klinischen Merkmale

Bei der Auswertung der klinischen Daten der Erkrankten wurde ersichtlich, dass die klinische Präsentation der Patienten/Patientinnen 1 bis 5 dem klinischen Phänotyp der in der Literatur bereits beschriebenen Anti-NF-155 Paranodopathie ähneln (Querol et al., 2014). Die Kohorte der NF-155 seropositiven Erkrankten zeigt zum einen eine männliche Prädominanz mit vier von fünf Männern sowie zum anderen ein sehr junges Erkrankungsalter bei Rekrutierung. Insbesondere sind die Patienten 1, 2 und 4 mit einem Alter von unter 35 Jahren zu nennen. Ein subakuter Beginn mit insbesondere motorischen Defiziten und Verlust der Gehfähigkeit wurde zudem apparent. Als ein weiteres spezifisches Charakteristikum der NF-155-Paranodopathie ist das Auftreten eines Tremors zu nennen. In unserer Kohorte war bei drei Patienten ein Tremor auffällig. Hier zeigt Patient 1 einen Halte-, Aktions- und Intentionstremor, Patient 3 einen Halte-, Aktions- und Ruhetremor und Patient 4 einen Intention- und Flapping Tremor. Ein schlechtes Ansprechen auf IVIG sowie die Prädominanz der IgG4 Subklasse zeigt sich bei einigen der Patienten/Patientinnen.

Von dieser Gruppe ist der Phänotyp des Patienten 6 mit Anti-Pan-Neurofascin Autoantikörpern und der IgG3 Subklasse abzugrenzen. In dieser Kohorte zeigte zwar nur ein Patient Antikörper gegen alle drei Isoformen des Neurofascin, jedoch ist das klinische Bild deutlich von dem der Anti-NF-155 Patienten/Patientinnen zu

differenzieren. Patient 6 zeigte einen akuten GBS-artigen monophasischen Beginn mit einem fulminanten Verlauf. Der Patient entwickelte sehr schnell eine Tetraparese mit einem deutlich reduzierten MRC Score von 24. Insgesamt präsentierte sich ein GBS-ähnlicher Phänotyp mit Hirnnervenbeteiligung und von distal nach proximal aufsteigenden Paresen. Zum Vergleich lagen die MRC Scores aller Anti-NF-155 Patienten/Patientinnen über 45 und bei keinem wurde eine Hirnnervenbeteiligung beschrieben. Patient 6 zeigte zudem keinen Tremor, der mit der Anti-NF-155 Paraneuropathie assoziiert wird. Darüberhinaus zeigte sich ein fulminanter Verlauf des Patienten 6 mit Nierenversagen, respiratorischer Insuffizienz, der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Versorgung mit invasiver Beatmung sowie letztendlich dem Versterben des Patienten. Schlussfolgernd hebt sich der Verlauf des Patienten 6 mit Anti-Pan-Neurofascin Autoantikörpern durch den fulminanten Verlauf deutlich von dem klinischen Phänotyp der fünf Anti-NF-155 seropositiven Patienten/Patientinnen ab.

3.9.3 Patienten mit Autoantikörpern gegen Contactin-1

Es konnten zwei Patienten mit Autoantikörpern gegen Contactin-1 mittels ELISA, Zupfnerven und HEK-Zellen detektiert werden.

Bei Patient 7 handelt es sich um einen bei Aufnahme in die Studie 71-jährigen Mann, der innerhalb eines Monats Symptome zeigte, die die Verdachtsdiagnose eines Guillain-Barré-Syndroms nahelegten. Die Brighton Kriterien für die Diagnose eines GBS wurden jedoch nicht erfüllt. Er entwickelte von distal nach proximal aufsteigende motorische Paresen und Parästhesien, neuropathische Schmerzen und eine Feinmotorikstörung. Ein Therapieversuch mit IVIG zeigte einen permanenten Erfolg. Es kam zur Rückbildung der Paresen bis auf residuelle Paresen der Finger sowie zur Verbesserung der Gehfähigkeit.

Bei Patient 8 handelt es sich um einen bei Aufnahme in die Studie 62-jährigen, männlichen Patienten mit A-CIDP nach den EFNS-/PNS-Kriterien von 2010, der in einer externen Klinik vorstellig wurde (Van den Bergh et al., 2010). Es zeigte sich ein subakuter motorisch betonter Symptombeginn mit Verlust der Gehfähigkeit, distalen höhergradigen Paresen und neuropathischen Schmerzen. In der Elektroneurographie wurde ein axonal-demyelinisierendes Muster, sowie Spontanaktivität im M. gastrocnemius links und ein Leitungsblock im linken Nervus medianus diagnostiziert. Das Liquoreiweiß war im Rahmen einer zyalbuminären Dissoziation erhöht. Eine

Therapie mit IVIG blieb erfolglos, während Plasmaphereseverfahren und Rituximabgaben einen initialen Therapieerfolg zeigten. Eine Cortisonstoßtherapie zeigte eine anhaltende Besserung der Symptomatik.

Patient	Patient 7	Patient 8
Geschlecht	m	m
Alter	71	62
Diagnose	GBS	A-CIDP
Zeit von Symptombeginn bis zur Rekrutierung (Monate)	1,0	5,0
Vorausgegangener Infekt	nein	nein
Motorische Symptome	Paresen	Distale Paresen Verlust Gehfähigkeit
MRC	49	12
Lokalisation der motorischen Symptome	Distal nach proximal aufsteigend Sym.	Distal>proximal Sym.
Tremor	nein	nein
Sensible Symptome	Kribbelparästhesien Neuropathischer Schmerz	Pallhypästhesie Neuropathischer Schmerz
Hirnnervenbeteiligung	nein	nein
Liquor: Zellzahl/ μ l	5 Zellen/ μ l	4 Zellen/ μ l
Liquor: Eiweiß [mg/dl]	79 mg/dl	574 mg/dl
Elektroneurographie	demyelinisierend	Gemischt axonal-demyelinisierend
dML	↑	↑
sensible NLG	↓	↓
sensible Amplitude	↓	↓
motorische NLG	↓	↓
motor. Amplitude	↓	↓
Leitungsblock	nein	Ja
Spontanaktivität	nein	Ja
Paranodale Ak	CNTN-1	CNTN-1
Titer	1:500	1:10000

Tabelle 35: Klinische Daten, Liquorbefunde und Ergebnisse der Elektroneurographie der zwei seropositiven Patienten mit Anti-Contactin-1 Autoantikörpern. Ak=Antikörper, CNTN-1=Contactin-1, dML=distal motorische Latenz, li=links, m=männlich, motor=motorisch, NLG=Nervenleitgeschwindigkeit, Sym.=symmetrisch.

4 Diskussion

In einer Kohorte von 212 Patienten/Patientinnen mit Diagnose einer inflammatorischen PNP konnten sieben Erkrankte mit Anti-NF-155 Antikörpern, ein Patient mit Anti-Pan-NF Autoantikörpern und zwei Erkrankte mit Anti-CNTN-1 Antikörpern identifiziert werden.

Bei sechs hochtitrigen Patienten/Patientinnen mit nodo-paranodalen Autoantikörpern gegen NF wurde zudem die IgG Subklassenverteilung bestimmt sowie in vitro und zellbasierte Komplementbindungsassays durchgeführt. Der Anti-Pan-NF Patient mit einer prädominanten IgG3-Subklasse zeigte die deutlichste Komplementablagerung. Bei drei Patienten/Patientinnen, die IgG1, IgG2 und IgG4 aufwiesen, war auch eine Aktivierung des Komplementsystems zu beobachten, während bei zwei Patienten mit Prädominanz der IgG4-Antikörpersubklasse keine Komplementablagerung nachweisbar war.

In den Koinkubations- und Präinkubationsversuchen mit IVIG zeigte sich keine Reduktion der Antikörperbindung an das Zielantigen. Eine Koinkubation von IVIG mit dem Komplementfaktor C1q sowie die Präinkubation gebundener Antikörper mit IVIG vor C1q-Zugabe führten jedoch zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Reduktion der Autoantikörper-vermittelten Komplementablagerung.

In LDH-Zytotoxizitätsassays zeigten zwei Patientenseren mit hoher Komplementbindung auch eine erhöhte relative Zytotoxizität bei Zugabe von humanem Komplementserum. Der Patient mit Anti-Pan-NF Antikörpern, IgG3 Prädominanz und den höchsten ODs im Komplementbindungsassay zeigte die höchste relative Zytotoxizität, die bei Zugabe von IVIG reduziert werden konnte.

In der retrospektiven Auswertung des klinischen Phänotyps konnte ein subakuter Beginn, eine männliche Prädominanz mit jungem Erkrankungsalter, motorische Paresen sowie das Auftreten von Tremor und sensibler Ataxie bei den Anti-NF-155 Erkrankten eruiert werden. Hiervon abzugrenzen ist der Patient mit Anti-Pan-NF Autoantikörpern, der einen fulminanten Verlauf mit hochgradigen Paresen zeigte. Dies resultierte in der Notwendigkeit intensivmedizinischer Therapie sowie dem Versterben des Patienten.

4.1 Evaluation der diagnostischen Methoden

In dieser Studie dienten ELISAs sowie immunhistochemische Färbungen an murinen Zupfnerven als Screeningmethode für Autoantikörper gegen paranodale Antigene. Im Falle eines positiven Ergebnisses wurden Bindungsversuche an transfizierten HEK-293-Zellen als Bestätigungstest durchgeführt. ELISAs eignen sich durch ihren geringen methodologischen Aufwand, Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie gleichzeitige Testung multipler Proben als Screeningverfahren für paranodale Autoantikörper (Appeltshauser L., 2018). In mehreren Studien konnten die Vorteile der ELISA-basierten Screeningverfahren bereits belegt werden (Appeltshauser et al., 2017; Kadoya et al., 2016; Querol et al., 2014). Der in dieser Studie verwendete ELISA weist mit hoher Sicherheit Autoantikörper gegen NF-155/186/140 und Contactin-1 nach, sodass sich dieses Verfahren hervorragend als Screeningmethode eignet. Zudem bieten ELISA-basierte Verfahren die Möglichkeit der Bestimmung der Antikörpersubklasse durch die Verwendung von spezifischen Sekundär-Antikörpern (siehe 2.3.2.2). Die Subklassenanalyse könnte insbesondere ein mögliches Therapieansprechen auf IVIG vorhersagen und sollte daher eine wichtige Rolle in der Diagnostik der Nodoparanodopathie spielen. Die Testung an murinen Zupfnerven stellt ein weiteres mögliches Screeningverfahren dar. Vorteil dieser Methode ist die Aussage über mehrere nodale und paranodale Autoantikörper gleichzeitig durch Visualisierung einer spezifischen Bindung. Trotz der Ähnlichkeit des murinen und humanen Ranvier'schen Schnürringes, könnte das Bindungsverhalten der Autoantikörper an murinen Materialien doch von den humanen abweichen und sollte nur in Verbindung mit weiteren Verfahren evaluiert werden (Cortese et al., 2016). Bei der Auswahl der Methode spielt außerdem die Art der Epitope eine Rolle. Konformationale Epitope werden oft nur in zellbasierten Assays und Bindungsversuchen an Geweben erkannt wie beispielsweise bei vielen Autoimmunenzephalitiden mit Anti-Caspr2-, Anti-LGI1- oder Anti-NMDA-Rezeptor-Antikörpern (Dahm et al., 2014; Dutra et al., 2018). Bei den nodo-paranodalen Autoantikörpern hat sich jedoch gezeigt, dass sich diese gut im ELISA nachweisen lassen, was zudem durch die gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Mäusezupfnervenfärbungen belegt wird (Kadoya et al., 2016). Zudem dienten zellbasierte immunhistochemische Färbungen an HEK-293-Zellen als Bestätigungstests. Aufgrund des hohen methodologischen Aufwands, dem hohen Materialverbrauch an Patientenserum und Sekundär-Antikörpern sowie der untersucherabhängigen Auswertung am Mikroskop eignen sich immunhistochemische Färbungen nur bedingt als Screeningverfahren. Schlussfolgernd haben sich die in der

Studie verwendeten ELISA-basierten Verfahren optimal als Screeningmethode für nodale oder paranodale Autoantikörper bei Patienten/Patientinnen mit CIDP, GBS oder anderen Polyneuropathien erwiesen. Zur Erhöhung der Vortestwahrscheinlichkeit, kann die Gruppe an zu testenden Patienten/Patientinnen durch Erfragung von spezifischen Symptomen weiter eingegrenzt werden. In dieser Studie wurde ein Fragebogen für die mitwirkenden Kliniken verwendet, der auf nodo-paranodopathieverdächtige Symptome abzielt. Ein subakuter Erkrankungsbeginn, junges Alter, Verlust der Gehfähigkeit sowie vorwiegend motorische Defizite und das Vorhandensein von Tremor sind beispielsweise hochverdächtig für die NF-155 Autoantikörper positive Paranodopathie mit IgG4 Prädominanz (Ogata et al., 2015; Querol et al., 2014; Vural, Doppler, & Meinl, 2018). Neuropathische Schmerzen wurden zudem durch den Fragebogen abgefragt und scheinen vor allem bei der Paranodopathie mit Autoantikörpern gegen Caspr-1 vorzukommen (Doppler et al., 2016).

4.2 Klinischer Phänotyp der NF-155-assoziierten Paranodopathie

In einer Kohorte von 212 Probanden konnten acht Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen paranodales Neurofascin-155 identifiziert werden.

Wie bereits in anderen publizierten Studien zu Anti-Neurofascin-155 Autoantikörpern herausgestellt werden konnte, weist auch diese Kohorte spezielle Merkmale der Anti-NF-155-IgG4 Subgruppe, wie schwere motorische Defizite bis hin zu Tetraplegie, Verlust der Gehfähigkeit und Vorhandensein eines Tremors auf (Kuwabara, Misawa, & Mori, 2017; Querol et al., 2014). Unter anderem ist eine männliche Prädominanz mit fünf von sechs Männern auffällig. Vier der sechs Patienten/Patientinnen wies außerdem ein junges Alter bei Erstmanifestation der Erkrankung mit subakutem Verlauf auf. Bei drei der Erkrankten wurde ebenso ein Tremor diagnostiziert. Diese gemeinsamen Auffälligkeiten bestätigen die Ergebnisse bisheriger Studien und geben Anlass zur Zusammenfassung der Neurofascin-155 Autoantikörper vermittelten Paranodopathie als eigene Entität der Immunneuropathien (Kuwabara et al., 2017).

Ein weiterer klinischer Phänotyp der Nodo-Paranodopathie ist hiervon abzugrenzen: Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen alle drei nodo-paranodalen Isoformen des Neurofascins. In dieser Kohorte weist der schwer betroffene Patient 6 eine Prädominanz der IgG3 Subklasse sowie einen fulminanten Verlauf mit respiratorischer Insuffizienz, rasch progredienter Tetraparese und Hirnnervenbeteiligung auf. Der GBS-

ähnliche klinische Phänotyp des Patienten 6 unterscheidet sich deutlich von dem der anderen fünf Patienten/Patientinnen mit Anti-NF-155 Paranodopathie durch den fulminanten Verlauf mit niedrigen MRC-Scores, intensivmedizinischer Behandlung und Beatmung, Hirnnervenbeteiligung sowie schließlich dem Versterben des Patienten. Dieser Phänotyp stimmt mit Fallberichten und Fallserien aus der Literatur überein (Burnor et al., 2018; Fehmi et al., 2021; Fels et al., 2021; Stengel et al., 2019; Vallat et al., 2018). Bei manchen Patienten/Patientinnen mit Anti-Pan-NF Autoantikörpern wurde in der Literatur ein klinisches Bild ähnlich einem Locked-In Syndrom beschrieben (Stengel et al., 2019). In dieser Studie von Stengel et al. wurde, neben einem typischen klinischen Phänotyp mit oben aufgeführten Charakteristika und differenter IgG-Subklassenverteilung bei drei Patienten/Patientinnen mit Anti-Pan-NF Neuropathie, zudem ein anderes Zielepitop der Autoantikörper beschrieben. Während Anti-NF-155 Autoantikörper gegen die NF-155 spezifische Fn3Fn4-Domäne gerichtet sind, scheint das Zielepitop der Anti-Pan-NF Autoantikörper die Ig-Domäne zu sein, die alle Isoformen des Neurofascin gemein haben (Stengel et al., 2019). Die Abgrenzung der Anti-Pan-NF Neuropathie als eigenständige Entität unter den Anti-NF-155 Paranodopathien wird von weiteren Studien unterstützt. In mehreren Fallstudien wurden bisher Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen alle drei Isoformen des Neurofascins beschrieben, deren klinischer Phänotyp dem des Patienten 6 dieser Studie ähnelt (Burnor et al., 2018; Vallat et al., 2018). Bei Burnor et al. zeigte sich jedoch bei dem Patienten mit Pan-NF-Antikörpern und einem Locked-in-ähnlichen klinischen Phänotyp eine Prädominanz der IgG4 Subklasse, sodass erforscht werden sollte, ob der fulminante und schwere Verlauf dieser Subgruppe durch die vorherrschende IgG Subklasse oder eher durch das Autoantigen hervorgerufen wird (Burnor et al., 2018). In einer Studie mit Prädominanz der IgG1 Subklasse bei acht Patienten/Patientinnen mit Anti-Pan-NF Autoantikörpern und einem fulminanten Verlauf mit erhöhter Mortalität wurde ein mögliches Therapieansprechen bei vier von acht Erkrankten auf eine Rituximabtherapie beschrieben (Fehmi et al., 2021). Dies sollte jedoch in größeren Studien verifiziert werden.

Schlussfolgernd unterstützen die Ergebnisse dieser Studie die Erkenntnisse von Burnor et al. und Stengel et al., dass sich der Phänotyp der Anti-Pan-Neurofascin Neuropathie deutlich von der Anti-NF-155 Neuropathie unterscheidet und die Subklassenzusammensetzung eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt und folglich zu diagnostischen und therapeutischen Zwecken bestimmt werden sollte (Stengel et al., 2019).

4.3 Einfluss der IgG Subklasse

Im Kontrast zu anderen bereits veröffentlichten Studien (Querol et al 2014; Uncini et al 2017; Deveaux et al 2019), die Kohorten mit vorwiegend Neurofascin-155 Antikörpern der IgG4 Subklasse beschreiben, konnten in unserer Studie auch andere Subklassenzusammensetzungen identifiziert werden. Während Patient 1 und 2 vor allem den IgG4 Typ aufweisen, ist bei Patient/-in 3, 4 und 5 neben IgG4 auch die IgG2 Subklasse vertreten. Patient 6 zeigt als einziger Patient der Kohorte hohe Titer von IgG3 und niedrige Titer von IgG4 sowie Pan-NF Antikörper gegen die verschiedenen Isotypen des Neurofascins (NF-140/155/186). Hinsichtlich der IgG-Subklassenverteilung und des davon abhängigen Aktivierungsverhaltens von inflammatorischen Signalkaskaden, zeigte sich in der Kohorte eine unterschiedlich starke Komplementablagerung, induziert durch Antikörper. Zudem war bei einem der Patienten/Patientinnen eine Therapie mit IVIG in der Akutphase wirksam. Die Erkenntnisse dieser Studie weisen auf einen Einfluss der IgG Subklasse auf den Verlauf der Erkrankung und das Therapieansprechen, insbesondere auf IVIG, hin.

In bereits veröffentlichten Studien wurden neben dem typischen IgG4-prädominanten Phänotyp der Anti-NF-155 Paranodopathie auch eine Präsenz der IgG Subklassen IgG1 bis IgG3 beschrieben (Doppler et al., 2016; Ng et al., 2012; Stengel et al., 2019). Bei Anti-Gangliosid-Antikörper-assoziierten Nodopathien waren ebenfalls die Subklassen IgG1 bis IgG3 vorherrschend (Ilyas, Chen, Cook, Mithen, & Singhal, 2001).

IgG4 Antikörper entstehen erst nach chronischem Antigenkontakt und sind eher im Verlauf der Erkrankung beziehungsweise nach einem potenziellen Antikörperwechsel von IgG3 zu IgG4 im Laufe der Chronifizierung apparent (siehe 1.3.1.4) (Aalberse, Stapel, Schuurman, & Rispens, 2009; Doppler et al., 2015). Ein Wechsel der Antikörpersubklasse wurde bereits bei Formen der membranösen Glomerulonephritis mit IgG1 Antikörpern in der akuten Phase und einem Wechsel zu IgG4 Antikörpern in der chronischen Phase der Erkrankung beschrieben (Huang et al., 2013). Die Präsenz der Subklassen IgG1, 2 und 3 kann mit einem akuten Erkrankungsbeginn und monophasischem Verlauf assoziiert werden (Doppler et al., 2016; Doppler et al., 2015). Möglicherweise könnte der initiale, subakute Beginn der Erkrankung IgG3-getriggert sein und den GBS-artigen, fulminanten Verlauf des Patienten 6 mit IgG3 Prädominanz erklären, während bei Vorherrschen der IgG4 Subklasse die chronische, langsam progrediente Phase der Erkrankung erreicht wäre (Doppler et al., 2015). Einen Subklassenwechsel von IgG3 in der akuten Phase zu IgG4 im Laufe der Erkrankung

konnte auch bei der Nodoparanodopathie bereits bei einem Patienten gezeigt werden (Appeltshauser et al., 2020). Außerdem zeigen Patienten/Patientinnen mit IgG4-Prädominanz ein schlechtes Ansprechen auf IVIG, analog zu Patient 1 und 2 dieser Studie, während bei Patienten/Patientinnen mit IgG1 oder IgG3-Antikörpern ein Effekt durch IVIG detektierbar war (Cortese et al., 2020).

Denkbar wäre zudem ein unterschiedlicher Pathomechanismus abhängig von der IgG-Subklasse. Die Pathogenese der IgG4-assoziierten Nodoparanodopathie beruht vermutlich auf der Zerstörung der nodoparanodalen Architektur mit Abnahme von NF-155 sowie auf Protein-Protein-Interaktionen und der Inhibierung von paranodaler axoglialem Komplex von NF-155/CNTN-1/Caspr-1 durch antiinflammatorische bispezifische monovalente IgG4-Antikörper, während proinflammatorische IgG3-Antikörper über Antigenquervernetzung, Internalisierung des Zielantigens sowie über die Initiierung einer starken Komplementreaktion pathogenetisch sind (Cortese et al., 2020; Dalakas, 2022; Manso et al., 2019).

4.4 Komplementaktivierung als Teil des Pathomechanismus

Die Beteiligung des Komplementsystems ist komplex und vielfältig und besitzt eine wichtige physiologische Rolle bei der Immunabwehr des Körpers (siehe 1.4). Es gibt inzwischen Nachweise der Mitwirkung oder Ablagerung von Komplementbestandteilen bei verschiedenen autoimmunen und neurodegenerativen Erkrankungen sowie bei entzündlichen Neuropathien (siehe 1.4.3) (Dalakas et al., 2020). Darüber hinaus gibt es neuromuskuläre Erkrankungen, wie die MG, bei der die Komplement-vermittelte Pathogenität der Acetylcholin-Autoantikörper in mehreren Studien bewiesen wurde und die Therapie bereits auf die Komplementkaskade abzielt (Conti-Fine, Milani, & Kaminski, 2006).

Bei der Nodoparanodopathie mit Autoantikörpern gegen paranodale Proteine des Ranvier'schen Schnürringes, wurden in der Literatur hauptsächlich IgG4-Antikörper identifiziert, die nicht in der Lage sind, C1q zu binden und über das Komplementsystem und die Makrophagenaktivierung eine Demyelinisierung hervorzurufen (Stathopoulos, Alexopoulos, & Dalakas, 2015). In einigen Studien sowie in dieser Arbeit konnte aber eine andere Subklassenzusammensetzung und eine Komplementablagerung durch paranodale Autoantikörper gezeigt werden (Appeltshauser, Weishaupt, Sommer, & Doppler, 2017).

In dieser Studie kann gezeigt werden, dass die Verteilung der IgG-Subklassen Einfluss auf die Menge an Komplementablagerung hat. So weisen im Komplementbindungsassay die Patienten 1 und 2, mit einer Prädominanz der IgG4-Antikörper, ODs unter dem jeweils für die Verdünnung berechneten Grenzwert auf. Patient 6 mit Prädominanz der IgG3-Subklasse weist die höchste Komplementablagerung auf. Patienten/Patientinnen mit IgG2 und IgG1 Autoantikörpern weisen ebenfalls eine Komplementablagerung auf. Dies wird durch eine signifikante positive Korrelation der Summe der Subklassen IgG1, 2 und 3 mit der Menge an Komplementablagerung bestätigt. Die Komplementbindung bei Neurofascinspezifischen Antikörpern stimmt also mit der allgemeinen, in der Literatur vorbeschriebenen Fähigkeit der IgG-Subklassen zur Komplementbindung und -aktivierung überein (siehe 1.3.1).

Somit ist die Komplementablagerung, abhängig von der physiologischen C1q-Bindungskapazität, mit der Präsenz der IgG Subklassen in folgender Wichtung IgG3>IgG1>IgG2>IgG4 assoziiert.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die durch IgG3-Antikörper des Patienten 6 induzierte starke Komplementablagerung zu einer erhöhten Zelllyse führt und somit Teile des Pathomechanismus der Antikörper erklären kann. Anhand der Daten dieser Studie kann geschlussfolgert werden, dass die Patientenserum ohne Komplementbindung, ähnlich der Kontrollserum, keine erhöhte relative Zytotoxizität aufweisen, während Patientenserum mit erhöhter Autoantikörper-induzierter Komplementablagerung eine erhöhte relative Zytotoxizität und Zelllyse zeigen. Aus den Ergebnissen kann als Hypothese abgeleitet werden, dass es hierdurch zur gesteigerten Zelllyse von beispielsweise myelinisierten Schwanzzellen oder Nervenaxonen kommt. Im Folgenden wäre denkbar, dass die gesteigerte Lyse von Schwanzzellen in der Demyelinisierung betroffener Nerven resultiert und somit Teile der Pathogenese der demyelinisierenden Polyneuropathie erklärt. Bei der Polyneuropathie mit Anti-Gangliosid Antikörpern konnte in der Literatur eine Komplement-assoziierte Schädigung myelinisierter Schwanzzellen gezeigt werden. Die Spontanaktivität sowie die weiteren Befunde der Elektrophysiologie der Anti-NF-Paranodopathie mit sekundär axonalem Schädigungsmuster sprechen zudem für den Untergang von Axonen. Zur besseren Differenzierung der Komplement-vermittelten zytotoxischen Effekte sind jedoch weitere zellbasierte Versuche notwendig.

4.5 Effekte von IVIG

Im Allgemeinen konnte in verschiedenen randomisierten Kontrollstudien gezeigt werden, dass eine Therapie mit verschiedenen IVIG Präparaten bei Patienten/Patientinnen mit einer CIDP zu einer Verbesserung der Symptome führt und vergleichbare Effekte wie eine Therapie mit Steroiden oder Plasmaersatzverfahren aufweist (Eftimov et al., 2013). In einer Analyse konnte zudem der Effekt von dem in dieser Studie verwendeten *Privigen® IVIG* bei CIDP-Erkrankten belegt werden, indem eine Verbesserung der INCAT Kriterien der CIDP (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group) sowie eine Optimierung der Muskelkraft, anhand von MRC Scores, unter IVIG Therapie demonstriert wurde (Merkies et al., 2019).

Die Effekte von IVIG auf die Antikörperbindung und Komplementablagerung wurden bereits bei Anti-GQ1b-Antikörpern untersucht, deren Anwesenheit stark mit einer Ophthalmoplegie bei Patienten/Patientinnen mit Miller-Fisher-Syndrom oder GBS assoziiert ist (Chiba, Kusunoki, Obata, Machinami, & Kanazawa, 1993; Jacobs et al., 2003). In den durchgeführten ELISAs zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Antikörperbindung an GQ1b bei verschiedenen IVIG Konzentrationen von 1, 5 und 25mg/ml. Hierbei wurde demonstriert, dass IVIG zum einen die Bindung der Antikörper an ihr Zielepitop verhindern als auch zum anderen bereits gebundene Anti-GQ1b-Antikörper aus dem Antikörper-Antigen-Komplex herauslösen kann (Jacobs et al., 2003). Der beobachtete Nervenschaden bei an MFS/GBS Erkrankten scheint auf die Aktivierung des Komplementsystems durch Anti-GQ1b-Autoantikörper und α -Latrotoxin ähnliche Effekte wie Nervenpotentialschwankungen zurückzuführen zu sein (Goodyear et al., 1999; Jacobs et al., 2003). In Komplementbindungsassays mit C1q konnte zudem gezeigt werden, dass IVIG die Komplementbindung durch Anti-GQ1b-Antikörper reduziert. Aufgrund der Reduktion der Antikörperbindung an GQ1b sowie der Reduktion der C1q-Bindung durch hohe IVIG Konzentrationen, ist hier unklar, ob IVIG einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Formierung des C1q-Komplexes besitzt (Jacobs et al., 2003).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass IVIG keinen Effekt auf die Antikörperbindung an ihr Zielantigen NF-155 aufweist. Dies wurde durch in vitro Versuche wie ELISAs mit IVIG und BSA in verschiedenen Konzentrationen bewiesen. In HEK-Zellversuchen zeigte sich zwar bei hohen IVIG Konzentrationen eine Reduktion der Antikörperbindung an NF-155 transfizierte HEK-Zellen, hier ist jedoch, bei zum einen schlechterer Beurteilbarkeit durch den hohen unspezifischen Hintergrund, und zum

anderen durch eine Bindung des Sekundär-Antikörpers an Immunglobuline des *Privigen® IVIG*, nicht von einer spezifischen Reduktion der Antikörperbindung durch IVIG auszugehen. Die schwächere Bindung bei hohen IVIG Konzentrationen kann hinreichend durch die unspezifische Bindung an gelöstes IVIG und somit den Verbrauch des Sekundär-Antikörpers erklärt werden. Bei Koinkubationsversuchen des Sekundär-Antikörpers mit IVIG und gemeinsamer Gabe zeigte sich auch bei geringen IVIG Konzentrationen von 0,78mg/ml eine schwächere Bindung der NF-155 positiven Patientenserien an die NF-155-DNA transfizierten HEK-Zellen. Somit wurde die Limitation der Methode aufgezeigt und andere Verfahren sind notwendig zur immunhistochemischen Untersuchung der Komplementablagerung an Zellen.

Es zeigte sich jedoch eine deutliche, dosisabhängige Reduktion der Komplementbindung durch IVIG. Dabei scheint IVIG sowohl den Komplementfaktor C1q abzufangen als auch die Komplementbindung der Autoantikörper beispielsweise durch Bindung der Fc-Region und Besetzen von Komplementbindungsstellen zu reduzieren. Der Ansatzpunkt der intravenösen Immunglobuline scheint hierbei vor allem die Komplementbindung zu sein. Die Ergebnisse sind im Einklang mit einer bereits veröffentlichten Studie von Appeltshauser et al, die eine ähnliche Fragestellung bei einer Kohorte mit Anti-Contactin-1-Antikörper positiven Patienten/Patientinnen untersuchte. Hier zeigte sich kein Effekt von IVIG auf die Antikörperbindung, sondern eine dosisabhängige Reduktion der Komplementbindung (Appeltshauser et al., 2017).

IVIG greift vermutlich an mehreren Stellen auf das Komplementsystem ein. Zum einen kann IVIG C1q binden und so pathogene Antikörper von einer Bindung und Aktivierung der Komplementkaskade abhalten (Dalakas, 2014). Zum anderen scheinen die F(ab')₂ Arme von IVIG an der Neutralisierung verschiedener Komplementkomponenten wie C3a und C5a beteiligt zu sein (Dalakas, 2014). Die Hauptwirkung der Komplementinhibierung von IVIG wird aber vermutlich über C3 erzielt, indem IVIG Komplexe mit C3b formt und so die C3 Konvertase und C5 Konvertase unterbindet (Basta & Dalakas, 1994). Diese Ergebnisse konnten in einer Studie mit Dermatomyositis Erkrankten gewonnen werden, sind aber vermutlich auf andere Komplement-medierte neurologische Erkrankungen übertragbar (Dalakas et al., 2020). Als Limitation unserer Studie kann angeführt werden, dass dieser Effekt hier nicht untersucht wurde, da keine in vitro Komplementaktivierungsversuche durchgeführt wurden. Andererseits konnten hier Effekte von IVIG auf die Zellyse nachgewiesen werden. Somit kann indirekt die Rolle von IVIG auf die weitere Kaskade des Komplementsystems untersucht werden.

Die Komplementablagerung und deren Effektorfunktionen, wie die Zellyse von möglicherweise myelinbildenden Schwanzzellen oder Neuronen, kann zumindest bei einem Patienten mit starker Komplementbindung durch IVIG konzentrationsabhängig reduziert werden. Dieser Effekt wurde in den LDH-Zytotoxizitätsassays beobachtet. Hier muss allerdings angeführt werden, dass aufgrund von Materialknappheit der Patientenseren nur eine IVIG Konzentration (25mg/ml) an zwei Patienten/Patientinnen getestet werden konnte und diese Ergebnisse nur einmal reproduziert wurden. Außerdem führt allein die Zugabe von IVIG zu erhöhten ODs beziehungsweise absoluten LDH Werten. Es wurde versucht, den unspezifischen Effekt der Testsubstanzen wie IVIG oder Milchpulver durch Abzug der jeweiligen Substanzkontrollen in der Berechnung der relativen Zytotoxizitäten zu minimieren. Dennoch wird hierdurch die Aussagekraft des LDH-Zytotoxizitätsassays eingeschränkt.

In bisherigen Studien wurde für die Subgruppe der NF-155 Autoantikörper-vermittelten Immunneuropathien ein schlechtes Ansprechen der intravenösen Immunglobuline festgestellt (Querol et al., 2014). Dieses Ergebnis geht mit der Tatsache einher, dass die Kohorten in diesen Studien hauptsächlich die IgG4-Subklasse aufweisen, die zu keiner Komplementablagerung führt und IVIG seine therapeutische Wirkung unter anderem über die Inhibierung des Komplementsystems entfaltet (Querol et al., 2014). Darüber hinaus beinhaltet IVIG hauptsächlich IgG1-Antikörper und nur ungefähr zwei Prozent der IgG4 Subklasse, sodass die zirkulierenden pathologischen IgG4-Autoantikörper nicht durch idiotypische Antikörper neutralisiert oder blockiert werden können (Dalakas, 2022). Patient 1 und Patient 2 mit IgG4-Prädominanz und fehlender Komplementablagerung zeigten ebenfalls kein Therapieansprechen auf IVIG. Zwei der Patienten (3, 4) mit differenter Subklassenverteilung zeigten in der Akutphase ein Ansprechen auf IVIG. Ein langfristiger Effekt wurde hierdurch jedoch nicht erzielt. Es ist von einem Komplement-assoziierten Effekt von IVIG auszugehen, der jedoch nicht stark genug zu sein scheint und nur initial zu einem Therapieansprechen führt. Möglicherweise hängt diese Beobachtung mit dem Subklassenwechsel von IgG3 zu IgG4 im Chronifizierungsprozess zusammen, sodass das Ansprechen auf IVIG durch die Prädominanz von proinflammatorischen komplementaktivierenden IgG3 Antikörpern in der Akutphase zu erklären ist (Appeltshauser et al., 2020).

Schlussfolgernd ist die Autoantikörper-induzierte Komplementablagerung abhängig von der prädominanten IgG Subklasse und kann durch IVIG reduziert werden. Dementsprechend kann die Analyse der IgG-Subklasse der Patienten/Patientinnen mit

Immuneuropathien das therapeutische Ansprechen auf IVIG möglicherweise vorhersagen und sollte daher eine Rolle in der Diagnostik der Nodo-Paranodopathie spielen.

4.6 Komplementkaskade als therapeutisches Ziel

Das Komplementsystem ist eine Effektorfunktion des innatens und adaptiven Immunsystems. Eine Störung des Ablaufs oder der Kontrolle dieses komplexen Systems wird als Pathomechanismus einiger neurologischer Erkrankungen mit autoimmuner Genese und sogar teilweise bei neurodegenerativen Krankheiten diskutiert. Infolgedessen stieg das Interesse an möglichen, die Komplementkaskade adressierenden, Therapieoptionen zur Vorbeugung von Gewebeschäden bei einigen neurologischen Erkrankungen (Dalakas et al., 2020). Als mögliche Angriffspunkte kommen der Initiierungsprozess über die C1q-Bindung, die Aktivität der Konvertasen, die Spaltung von C5 in C5a und C5b sowie die Formierung des Membranangriffskomplexes in Frage (Dalakas et al., 2020).

Möglicherweise kann die Komplementkaskade als Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie der Nodo-Paranodopathie, insbesondere bei IgG3-Antikörper Prädominanz und/oder hoher Komplementablagerung, dienen (Latov, 2021). Im Speziellen kann bei schwer betroffenen Erkrankten mit Anti-Pan-NF Autoantikörpern und IgG3-Prädominanz der Einsatz von Therapeutika, die auf die Komplementablagerung abzielen, erwogen werden.

Beispielsweise könnte der im Jahre 2007 als Orphan-Arzneimittel zugelassene Anti-C5-Antikörper Eculizumab (Soliris; Alexion Pharmaceuticals Inc., Cheshire, CT, USA) als Therapieoption dienen (Jacob et al., 2020). Eculizumab wurde initial zur Behandlung der PNH und des HUS zugelassen und findet darüber hinaus Anwendung bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen mit Komplement-assoziiierter Pathogenese wie der NMOSD sowie der MG (siehe 1.1.5.5).

Der Erfolg der zielgerichteten Anti-C5 Therapie unterstützte die Modifikation der Komplementkaskade als therapeutisches Ziel und führte zu vermehrter Forschung auf dem Gebiet der komplementassoziierten Medikamentenentwicklung bei diversen Erkrankungen (Mastellos, Ricklin, & Lambris, 2019). Biosimilars des Anti-C5 Antikörpers Eculizumab von verschiedenen Firmen sind aktuell in klinischen Studien und könnten das therapeutische Spektrum erweitern (Mastellos et al., 2019). Außerdem hat die Firma

Alexion eine langwirksame Version des Eculizumab (Ravulizumab, Ultomiris, ALXN1210) auf den Markt gebracht, die Infusionen in einem achtwöchigen, anstelle des zweiwöchigen, Rhythmus bei vergleichbarer Wirksamkeit zulässt (Kulasekararaj et al., 2019; Lee et al., 2019). Die längere Plasmaverfügbarkeit von Ravulizumab basiert auf dem Fc-Rezeptor-abhängigen Recycling der Antikörper (Sheridan et al., 2018). Des Weiteren rückt das Gebiet der C3-gerichteten Therapeutika weiter in den Vordergrund (Mastellos et al., 2019). Erwähnenswert sind hier vor allem zwei C3-Inhibitoren, der PEGylierte APL-2 (Apellis) und der nicht-PEGylierte AMY-101 (Amyndas) (Mastellos et al., 2019). APL-2 hat in Phase-2-Studien sowohl als Zusatztherapie zu Eculizumab als auch in Monotherapie bei Patienten/Patientinnen mit PNH zu vielversprechenden Resultaten geführt (NCT03500549, 2019). In verschiedenen Studien konnte zudem die Sicherheit und gute Verträglichkeit der beiden C3-Inhibitoren nachgewiesen werden (Reis et al., 2018).

Die Komplexität der Komplementkaskade mit diversen pathogenetischen Triggermöglichkeiten weist darauf hin, dass für verschiedene Indikationen auch abgestimmte Komplement-assoziierte Therapeutika in Frage kommen können (Mastellos et al., 2019). Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass das Gebiet der Anti-Komplement Therapeutika eine vielversprechende Option für verschiedenste neurologische Erkrankungen, wie möglicherweise auch die Nodo-Paranodopathien mit IgG3-Prädominanz und Komplement-assoziiierter Pathogenese, darstellt und große multizentrische Studien zu deren Einsatz notwendig sind (Dalakas et al., 2020). Insbesondere kann bei einem fulminanten akuten Verlauf, wie beispielsweise bei der Anti-Pan-Neurofascin Nodo-Paranodopathie, der Einsatz von diesen Therapeutika erwogen werden (Latov, 2021). Dem gegenüber stehen allerdings potenzielle Nebenwirkungen der applizierten Antikörper sowie hohe Therapiekosten.

4.7 Ausblick

Die Entität der Nodo-Paranodopathien wurde nach Einführung des Begriffes durch Uncini et al. auf verschiedene Autoantikörper gegen nodale und paranodale Antigene ausgeweitet und es kristallisierten sich spezielle Merkmale für die einzelnen Autoantikörper-assoziierten Subgruppen heraus. Die NF-155 positive Paranodopathie mit dem bekannten Phänotyp wurde bereits in mehreren Studien beschrieben (Kadoya et al., 2016; Pruss, Schwab, Derst, Gortzen, & Veh, 2011; Querol et al., 2014). In einer

Studie von Stengel et al konnte hiervon eine weitere Subgruppe abgegrenzt werden: Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen alle Isoformen des Neurofascins sowie einem fulminanten klinischen Phänotyp (Stengel et al., 2019). Hier zeigte sich zudem eine andere IgG Subklassenzusammensetzung mit Prädominanz der IgG3 Autoantikörper. In der hier durchgeführten Studie war auch eine abweichende Subklassenzusammensetzung einiger Patienten/Patientinnen auffällig mit konsekutiver Komplementablagerung. Weitere multizentrische Studien sind notwendig, um die Einflüsse der IgG Subklasse auf Komplementverhalten und Therapieansprechen zu belegen sowie einen möglichen Subklassenwechsel im Chronifizierungsprozess zu detektieren. Interessant wäre zudem die weitere Erforschung der durch IVIG induzierten Komplementabhängigen Zytotoxizität auf zellbasierter Ebene. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen zwar eine erhöhte Zellyse der Autoantikörper eines Patienten mit IgG3 Prädominanz und erhöhter Komplementablagerung, es ist jedoch noch unklar, welche Zellen hiervon im Speziellen betroffen wären. Des Weiteren kommt der Erforschung von Therapeutika, die auf die Komplementkaskade abzielen, bei Erkrankten mit Nodoparanopathien, insbesondere der Anti-Pan-Neurofascin positiven Neuropathie, eine wichtige Rolle zu. Zudem sind weitere Studien zu anderen nodalen, paranodalen und juxtapanodalen Autoantikörpern gegen beispielsweise Gliomedin, NrCam, Caspr-2, Contactin-2 sowie bisher noch unbekanntem Antigenen des Ranvier'schen Schnürringes notwendig. Die bisherigen Ergebnisse der Studien zu inflammatorischen Polyneuropathien weisen darauf hin, dass es sich um eine Erkrankung mit vielen Subgruppen und eigenständigen Entitäten handelt, die sich in Hinblick auf den klinischen Phänotyp, die Subklassenzusammensetzung, die Pathogenese und das Therapieansprechen differenzieren. Studien wie diese erweitern das Verständnis dieser neuen Entität insbesondere hinsichtlich Antikörper-spezifischer und Subklassenspezifischer Charakteristika und haben somit für die Zukunft eine hohe diagnostische und therapeutische Relevanz.

5 Abstract

Autoantibodies against nodo-paranodal proteins of the Node of Ranvier like Neurofascin-155 (NF-155), Contactin-1 (CNTN-1) and Contactin-associated-protein-1 (Caspr-1) can be detected in patients with autoimmune polyneuropathies. In 2-10% of patients with inflammatory polyneuropathies autoantibodies against isoforms of the (para)nodal protein neurofascin (NF-140/155/186) can be detected. NF-155-seropositive patients present a severe, motor-predominant phenotype with subacute onset, tremor and poor response to intravenous immunoglobulins (IVIG) which might be due to the predominance of non-complement activating IgG4 antibodies. Anti-pan-NF-associated neuropathy is associated with a fulminant clinical phenotype and IgG3 predominance whereas treatment response has not been thoroughly investigated. In the present study, we aim to measure autoantibody-associated complement activation, the role of IgG subclasses and the effects of IVIG on antibody binding, complement deposition and effector functions.

Sera of 212 patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP), Guillain-Barré syndrome (GBS) or other forms of polyneuropathies were screened for anti-NF autoantibodies and subclasses by binding assays on murine teased fibers and by ELISA. Antibodies were confirmed in seropositive patients by cell-based assay. Complement binding and the effects of different concentrations of IVIG on complement deposition and complement-dependent cell lysis were analyzed via ELISA, cell-based tests and LDH-cytotoxicity assay.

Five patients with autoantibodies against NF-155 and one patient with anti-pan-NF autoantibodies were identified in this study. Two patients with predominance of the IgG4 subclass did not show a complement deposition whereas four patients with predominant IgG1 to IgG3 did. Complement binding was associated with the presence of IgG subclass IgG3>IgG1>IgG2>IgG4, corresponding to physiological C1q binding-capacities. IVIG led to a strong reduction of complement deposition in a dose dependent manner. In the cytotoxicity assay patient sera with high amounts of complement deposition showed an increased relative cytotoxicity that can be reduced by high-dose IVIG.

We conclude that complement deposition in NF-associated neuropathy is IgG subclass-dependent and IVIG leads to a reduction of complement deposition and its effector functions, such as possible cytolysis of myelinating Schwann cells or neurons. The characterization of autoantibody subclasses as well as IVIG and other options targeting

the complement cascade can be considered in the therapeutic regime of severely-affected patients, especially in anti-pan-NF-associated neuropathy.

6 Zusammenfassung

Autoantikörper gegen nodo-paranodale Proteine des Ranvier'schen Schnürrings wie Neurofascin-155 (NF-155), Contactin-1 und Caspr wurden in der Literatur bei Patienten/Patientinnen mit Immunneuropathien beschrieben. Bei zwei bis zehn Prozent der Patienten/Patientinnen mit Immunneuropathien können Autoantikörper gegen Isoformen des Neurofascin detektiert werden. Patienten/Patientinnen mit Autoantikörpern gegen NF-155 weisen gemeinsame klinische Merkmale auf, unter anderem einen schweren Verlauf mit subakutem Beginn, vorwiegend motorischen Defiziten, Tremor und einem schlechten Ansprechen auf eine Therapie mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg). Ein Grund für Letzteres könnte sein, dass es sich überwiegend um Autoantikörper der Subklasse IgG4 handelt, die als anti-inflammatorisch gelten und kein Komplement aktivieren. Neben der IgG4-Subklasse können bei manchen Erkrankten auch die proinflammatorischen IgG-Subklassen 1 bis 3 nachgewiesen werden. Bei der Anti-Pan-Neurofascin (155/140/186) Polyneuropathie zeigt sich klinisch häufig ein fulminanter Phänotyp mit IgG3 Prädominanz. Das Ziel dieser Studie war, die Autoantikörper-induzierte Komplementablagerung zu detektieren, sowie die Rolle der IgG Subklasse und die Effekte von IVIg auf Antikörperbindung, Komplementaktivierung und Effektorfunktionen zu untersuchen.

Hierzu wurde das Serum von 212 Probanden/-innen mit der Verdachtsdiagnose einer entzündlichen Neuropathie auf Autoantikörper gegen NF-155 mittels ELISA und Bindungsversuchen an Mäusezupfnerven gescreent. Im Fall eines positiven Ergebnisses dienten zellbasierte Bindungsversuche mit NF-155-transfizierten HEK-293-Zellen als Bestätigungstest. Die Effekte unterschiedlicher IVIg Konzentrationen auf die Antikörperbindung und Komplementablagerung wurden in ELISA, Komplementbindungsassays und zellbasierten Verfahren getestet. Außerdem wurde mithilfe von LDH-Zytotoxizitätsmessungen die Komplement-induzierte Zellyse sowie die Effekte von IVIg untersucht. Klinische Daten wurden retrospektiv ausgewertet.

Fünf Patienten/Patientinnen mit hohen Autoantikörpertitern gegen NF-155 und ein Patient mit Anti-Pan-Neurofascin Autoantikörpern konnten in der Studie detektiert werden. Der Patient mit Autoantikörpern gegen alle drei Isoformen des Neurofascins und IgG3-Prädominanz zeigte die deutlichste Komplementablagerung. Bei drei Patienten/Patientinnen, die IgG1, IgG2 und IgG4 aufwiesen, war eine Aktivierung des Komplementsystems zu beobachten, während bei zwei Patienten mit prädominanter IgG4-Antikörpersubklasse keine Komplementablagerung nachweisbar war. Bei

Letzteren war eine Therapie mit IVIG in der Vorgeschichte erfolglos, während es bei zwei der Patienten/Patientinnen mit anderen IgG-Subklassen und Komplementbindung unter IVIG Therapie zu einer mäßigen bis deutlichen Symptombesserung in der Akutphase kam. Eine Koinkubation mit IVIG führte in den ELISA basierten und zellbasierten Versuchen zu keinem Effekt auf die Autoantikörperbindung an das Zielantigen, jedoch zu einer deutlichen Reduktion der Antikörper-vermittelten Komplementbindung. Diese Reduktion war sowohl bei Koinkubation von IVIG mit dem Komplementfaktor C1q als auch bei Präinkubation von IVIG vor C1q Gabe zu sehen. Bei zwei der Patienten/Patientinnen mit hohen Komplementablagerungen konnte eine erhöhte Zytotoxizität nachgewiesen werden, welche bei Zugabe von IVIG verringert wurde.

Schlussfolgernd ist die Autoantikörper-induzierte Komplementablagerung abhängig von der prädominanten IgG Subklasse. IVIG führt zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Reduktion der Komplementablagerung, sowie möglicher zytotoxischer Effektorfunktionen wie die Zytolyse myelinisierter Schwannzellen oder Nervenaxonen. Darüber hinaus könnte die Subklassenanalyse von Erkrankten das Therapieansprechen auf IVIG vorhersagen und sollte daher eine wichtige Rolle in der Diagnostik der Nodo-Paranodopathie spielen. IVIG sowie andere über das Komplementsystem wirkende Therapeutika können in der Behandlung der schwer betroffenen Patienten/Patientinnen, insbesondere bei Anti-Pan-Neurofascin positiver Neuropathie, in Betracht gezogen werden.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Smart Servier: <https://smart.servier.com/>, 2020.
- Aalberse, R. C., Stapel, S. O., Schuurman, J., & Rispens, T. (2009). Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin Exp Allergy*, 39(4), 469-477. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03207.x
- Alessandro, L., Pastor Rueda, J. M., Wilken, M., Querol, L., Marrodan, M., Acosta, J. N., . . . Farez, M. F. (2018). Differences between acute-onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and acute inflammatory demyelinating polyneuropathy in adult patients. *J Peripher Nerv Syst*, 23(3), 154-158. doi:10.1111/jns.12266
- Alexion Europe SAS, (Mai 2020). Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels Soliris 300mg Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, EU/1/07/393/001, Rote Liste Service GmbH, Fachinfo-Service Frankfurt.
- Alexopoulos, H., Biba, A., & Dalakas, M. C. (2016). Anti-B-Cell Therapies in Autoimmune Neurological Diseases: Rationale and Efficacy Trials. *Neurotherapeutics*, 13(1), 20-33. doi:10.1007/s13311-015-0402-6
- Almitairi, J. O. M., Venkatraman Girija, U., Furze, C. M., Simpson-Gray, X., Badakshi, F., Marshall, J. E., . . . Wallis, R. (2018). Structure of the C1r-C1s interaction of the C1 complex of complement activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(4), 768-773. doi:10.1073/pnas.1718709115
- Amor, V., Zhang, C., Vainshtein, A., Zhang, A., Zollinger, D. R., Eshed-Eisenbach, Y., . . . Peles, E. (2017). The paranodal cytoskeleton clusters Na(+) channels at nodes of Ranvier. *Elife*, 6. doi:10.7554/eLife.21392
- Anthony, R. M., Wermeling, F., & Ravetch, J. V. (2012). Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci*, 1253, 170-180. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06305.x
- Appeltshauser, L., Brunder, A. M., Heinius, A., Kortvelyessy, P., Wandinger, K. P., Junker, R., . . . Doppler, K. (2020). Antiparanodal antibodies and IgG subclasses in acute autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 7(5). doi:10.1212/NXI.0000000000000817
- Appeltshauser, L., Junghof, H., Messinger, J., Linke, J., Haarmann, A., Ayzenberg, I., . . . Doppler, K. (2022). Anti-pan-neurofascin antibodies induce subclass-related complement activation and nodo-paranodal damage. *Brain*. doi:10.1093/brain/awac418
- Appeltshauser, L., Messinger, J., Starz, K., Heinrich, D., Brunder, A. M., Stengel, H., . . . Doppler, K. (2022). Diabetes Mellitus Is a Possible Risk Factor for Nodoparanodopathy With Antiparanodal Autoantibodies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 9(3). doi:10.1212/NXI.0000000000001163
- Appeltshauser, Luise Theresia (30.08.2018). Detektion und Charakterisierung von Autoantikörpern gegen paranodale Proteine bei Patienten mit inflammatorischer Polyneuropathie. urn:nbn:de:bvb:20-opus-169457
- 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. doi:10.1016/j.expneurol.2016.10.006
- Asavapanumas, N., Tradtrantip, L., & Verkman, A. S. (2021). Targeting the complement system in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Expert Opin Biol Ther*, 21(8), 1073-1086. doi:10.1080/14712598.2021.1884223

- Asbury, A. K., & Cornblath, D. R. (1990). Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, *27 Suppl*, S21-24. doi:10.1002/ana.410270707
- Atkinson, J., Liszewski, K., & Yu, C.-Y. (2021). Clinical aspects of the complement system in systemic lupus erythematosus. In (pp. 113-122).
- 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. doi:10.7916/D81560ZW
- Basta, M., & Dalakas, M. C. (1994). High-dose intravenous immunoglobulin exerts its beneficial effect in patients with dermatomyositis by blocking endomysial deposition of activated complement fragments. *J Clin Invest*, *94*(5), 1729-1735. doi:10.1172/JCI117520
- Benamu, E., & Montoya, J. G. (2016). Infections associated with the use of eculizumab: recommendations for prevention and prophylaxis. *Curr Opin Infect Dis*, *29*(4), 319-329. doi:10.1097/QCO.0000000000000279
- Benedetti, L., Briani, C., Franciotta, D., Fazio, R., Paolasso, I., Comi, C., . . . Cocito, D. (2011). Rituximab in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a report of 13 cases and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *82*(3), 306-308. doi:10.1136/jnnp.2009.188912
- Bidlack, J. M., & Lockshin, R. A. (1976). Evolution of LDH isozymes during programmed cell death. *Comp Biochem Physiol B*, *55*(2), 161-166. doi:10.1016/0305-0491(76)90223-6
- Bindon, C. I., Hale, G., Bruggemann, M., & Waldmann, H. (1988). Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med*, *168*(1), 127-142. doi:10.1084/jem.168.1.127
- Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol*, *37*(18), 1141-1149. doi:10.1016/s0161-5890(01)00025-6
- Bogliun, G., Beghi, E., & Italian, G. B. S. R. S. G. (2004). Incidence and clinical features of acute inflammatory polyradiculoneuropathy in Lombardy, Italy, 1996. *Acta Neurol Scand*, *110*(2), 100-106. doi:10.1111/j.1600-0404.2004.00272.x
- Bohannon, C., Powers, R., Satyabhama, L., Cui, A., Tipton, C., Michaeli, M., . . . Jacob, J. (2016). Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. *Nat Commun*, *7*, 11826. doi:10.1038/ncomms11826
- Bondza, S., Foy, E., Brooks, J., Andersson, K., Robinson, J., Richalet, P., & Buijs, J. (2017). Real-time Characterization of Antibody Binding to Receptors on Living Immune Cells. *Front Immunol*, *8*, 455. doi:10.3389/fimmu.2017.00455
- Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G., & Herzenberg, L. A. (1972). Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum*, *43*(3), 404-409. doi:10.1063/1.1685647
- Bonnon, C., Bel, C., Goutebroze, L., Maignet, B., Girault, J. A., & Faivre-Sarrailh, C. (2007). PGY repeats and N-glycans govern the trafficking of paranodin and its selective association with contactin and neurofascin-155. *Mol Biol Cell*, *18*(1), 229-241. doi:10.1091/mbc.e06-06-0570
- Bonnon, C., Goutebroze, L., Denisenko-Nehrbass, N., Girault, J. A., & Faivre-Sarrailh, C. (2003). The paranodal complex of F3/contactin and caspr/paranodin traffics to the cell surface via a non-conventional pathway. *J Biol Chem*, *278*(48), 48339-48347. doi:10.1074/jbc.M309120200
- Bournazos, S., & Ravetch, J. V. (2015). Fcγ receptor pathways during active and passive immunization. *Immunol Rev*, *268*(1), 88-103. doi:10.1111/imr.12343
- Bournazos, S., & Ravetch, J. V. (2017). Diversification of IgG effector functions. *Int Immunol*, *29*(7), 303-310. doi:10.1093/intimm/dxx025

- Boyle, M. E., Berglund, E. O., Murai, K. K., Weber, L., Peles, E., & Ranscht, B. (2001). Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron*, *30*(2), 385-397. doi:10.1016/s0896-6273(01)00296-3
- Bresin, E., Rurai, E., Caprioli, J., Sanchez-Corral, P., Fremeaux-Bacchi, V., Rodriguez de Cordoba, S., . . . European Working Party on Complement Genetics in Renal, D. (2013). Combined complement gene mutations in atypical hemolytic uremic syndrome influence clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol*, *24*(3), 475-486. doi:10.1681/ASN.2012090884
- Brouwers, H. A., Overbeeke, M. A., Ouwehand, W. H., Keuning, K., van Ertbruggen, I., van Leeuwen, E. F., . . . Engelfriet, C. P. (1988). Maternal antibodies against fetal blood group antigens A or B: lytic activity of IgG subclasses in monocyte-driven cytotoxicity and correlation with ABO haemolytic disease of the newborn. *Br J Haematol*, *70*(4), 465-469. doi:10.1111/j.1365-2141.1988.tb02518.x
- Buchacher, A., & Iberer, G. (2006). Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma--aspects of yield and virus safety. *Biotechnol J*, *1*(2), 148-163. doi:10.1002/biot.200500037
- Burnor, E., Yang, L., Zhou, H., Patterson, K. R., Quinn, C., Reilly, M. M., . . . Lancaster, E. (2018). Neurofascin antibodies in autoimmune, genetic, and idiopathic neuropathies. *Neurology*, *90*(1), e31-e38. doi:10.1212/WNL.0000000000004773
- Capasso, A., Ompad, D. C., Vieira, D. L., Wilder-Smith, A., & Tozan, Y. (2019). Incidence of Guillain-Barre Syndrome (GBS) in Latin America and the Caribbean before and during the 2015-2016 Zika virus epidemic: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, *13*(8), e0007622. doi:10.1371/journal.pntd.0007622
- Cellerino, M., Boffa, G., Lapucci, C., Tazza, F., Sbragia, E., Mancuso, E., . . . Inglese, M. (2021). Predictors of Ocrelizumab Effectiveness in Patients with Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*, *18*(4), 2579-2588. doi:10.1007/s13311-021-01104-8
- Chapel, H. M., Spickett, G. P., Ericson, D., Engl, W., Eibl, M. M., & Bjorkander, J. (2000). The comparison of the efficacy and safety of intravenous versus subcutaneous immunoglobulin replacement therapy. *J Clin Immunol*, *20*(2), 94-100. doi:10.1023/a:1006678312925
- Charles, P., Tait, S., Faivre-Sarrailh, C., Barbin, G., Gunn-Moore, F., Denisenko-Nehrbass, N., . . . Lubetzki, C. (2002). Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr-contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr Biol*, *12*(3), 217-220. doi:10.1016/s0960-9822(01)00680-7
- Chiba, A., Kusunoki, S., Obata, H., Machinami, R., & Kanazawa, I. (1993). Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome: clinical and immunohistochemical studies. *Neurology*, *43*(10), 1911-1917. doi:10.1212/wnl.43.10.1911
- Conti-Fine, B. M., Milani, M., & Kaminski, H. J. (2006). Myasthenia gravis: past, present, and future. *J Clin Invest*, *116*(11), 2843-2854. doi:10.1172/JCI29894
- Cortese, A., Devaux, J. J., Zardini, E., Manso, C., Taieb, G., Carra Dalliere, C., . . . Franciotta, D. (2016). Neurofascin-155 as a putative antigen in combined central and peripheral demyelination. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, *3*(4), e238. doi:10.1212/NXI.0000000000000238
- Cortese, A., Lombardi, R., Briani, C., Callegari, I., Benedetti, L., Manganelli, F., . . . Franciotta, D. (2020). Antibodies to neurofascin, contactin-1, and contactin-associated protein 1 in CIDP: Clinical relevance of IgG isotype. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, *7*(1). doi:10.1212/NXI.0000000000000639

- Cree, B. A. C., Bennett, J. L., Kim, H. J., Weinschenker, B. G., Pittock, S. J., Wingerchuk, D. M., . . . investigators, N. M. S. (2019). Inebilizumab for the treatment of neuromyelitis optica spectrum disorder (N-MOmentum): a double-blind, randomised placebo-controlled phase 2/3 trial. *Lancet*, *394*(10206), 1352-1363. doi:10.1016/S0140-6736(19)31817-3
- Czajkowsky, D. M., & Shao, Z. (2009). The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(35), 14960-14965. doi:10.1073/pnas.0903805106
- Dahm, L., Ott, C., Steiner, J., Stepniak, B., Teegen, B., Saschenbrecker, S., . . . Ehrenreich, H. (2014). Seroprevalence of autoantibodies against brain antigens in health and disease. *Ann Neurol*, *76*(1), 82-94. doi:10.1002/ana.24189
- Dalakas, M. C. (1997). Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases. *Ann Intern Med*, *126*(9), 721-730. doi:10.7326/0003-4819-126-9-199705010-00008
- 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. doi:10.1212/wnl.59.12_suppl_6.s13
- Dalakas, M. C. (2014). Mechanistic effects of IVIg in neuroinflammatory diseases: conclusions based on clinicopathologic correlations. *J Clin Immunol*, *34* Suppl 1, S120-126. doi:10.1007/s10875-014-0024-5
- Dalakas, M. C. (2022). IgG4-Mediated Neurologic Autoimmunities: Understanding the Pathogenicity of IgG4, Ineffectiveness of IVIg, and Long-Lasting Benefits of Anti-B Cell Therapies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, *9*(1). doi:10.1212/NXI.0000000000001116
- Dalakas, M. C., Alexopoulos, H., & Spaeth, P. J. (2020). Complement in neurological disorders and emerging complement-targeted therapeutics. *Nat Rev Neurol*, *16*(11), 601-617. doi:10.1038/s41582-020-0400-0
- Dalakas, M. C., & Engel, W. K. (1980). Immunoglobulin and complement deposits in nerves of patients with chronic relapsing polyneuropathy. *Arch Neurol*, *37*(10), 637-640. doi:10.1001/archneur.1980.00500590061010
- Darbelli, L., Vogel, G., Almazan, G., & Richard, S. (2016). Quaking Regulates Neurofascin 155 Expression for Myelin and Axoglial Junction Maintenance. *J Neurosci*, *36*(14), 4106-4120. doi:10.1523/JNEUROSCI.3529-15.2016
- Davis, J. Q., Lambert, S., & Bennett, V. (1996). Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol*, *135*(5), 1355-1367. doi:10.1083/jcb.135.5.1355
- Delmont, E., Manso, C., Querol, L., Cortese, A., Berardinelli, A., Lozza, A., . . . Devaux, J. J. (2017). Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain*, *140*(7), 1851-1858. doi:10.1093/brain/awx124
- Devaux, J. J., Miura, Y., Fukami, Y., Inoue, T., Manso, C., Belghazi, M., . . . Yuki, N. (2016). Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*, *86*(9), 800-807. doi:10.1212/WNL.0000000000002418
- Devaux, J. J., Odaka, M., & Yuki, N. (2012). Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barre syndrome. *J Peripher Nerv Syst*, *17*(1), 62-71. doi:10.1111/j.1529-8027.2012.00372.x
- Diebold, C. A., Beurskens, F. J., de Jong, R. N., Koning, R. I., Strumane, K., Lindorfer, M. A., . . . Parren, P. W. (2014). Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*, *343*(6176), 1260-1263. doi:10.1126/science.1248943

- Doppler, K., Appeltshauser, L., Kramer, H. H., Ng, J. K., Meinel, E., Villmann, C., . . . Sommer, C. (2015). Contactin-1 and Neurofascin-155/-186 Are Not Targets of Auto-Antibodies in Multifocal Motor Neuropathy. *PLoS One*, *10*(7), e0134274. doi:10.1371/journal.pone.0134274
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Villmann, C., Martin, C., Peles, E., Kramer, H. H., . . . Sommer, C. (2016). Auto-antibodies to contactin-associated protein 1 (Caspr) in two patients with painful inflammatory neuropathy. *Brain*, *139*(Pt 10), 2617-2630. doi:10.1093/brain/aww189
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Wilhelmi, K., Villmann, C., Dib-Hajj, S. D., Waxman, S. G., . . . Sommer, C. (2015). Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *86*(7), 720-728. doi:10.1136/jnnp-2014-309916
- Doppler, K., Schuster, Y., Appeltshauser, L., Biko, L., Villmann, C., Weishaupt, A., . . . Sommer, C. (2019). Anti-CNTN1 IgG3 induces acute conduction block and motor deficits in a passive transfer rat model. *J Neuroinflammation*, *16*(1), 73. doi:10.1186/s12974-019-1462-z
- Doppler, K., Stengel, H., Appeltshauser, L., Grosskreutz, J., Man Ng, J. K., Meinel, E., & Sommer, C. (2018). Neurofascin-155 IgM autoantibodies in patients with inflammatory neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *89*(11), 1145-1151. doi:10.1136/jnnp-2018-318170
- Dunkelberger, J. R., & Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, *20*(1), 34-50. doi:10.1038/cr.2009.139
- Dutra, L. A., Abrantes, F., Toso, F. F., Pedroso, J. L., Barsottini, O. G. P., & Hoftberger, R. (2018). Autoimmune encephalitis: a review of diagnosis and treatment. *Arq Neuropsiquiatr*, *76*(1), 41-49. doi:10.1590/0004-282X20170176
- EFNS, J. T. F. o. t., & PNS, t. (2010). European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society--First Revision. *J Peripher Nerv Syst*, *15*(1), 1-9. doi:10.1111/j.1529-8027.2010.00245.x
- Eftimov, F., Winer, J. B., Vermeulen, M., de Haan, R., & van Schaik, I. N. (2013). Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*(12), CD001797. doi:10.1002/14651858.CD001797.pub3
- 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. doi:10.1083/jcb.139.6.1495
- Esser, A. F. (1994). The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology*, *87*(1-3), 229-247. doi:10.1016/0300-483x(94)90253-4
- Faivre-Sarrailh, C., & Devaux, J. J. (2013). Neuro-glial interactions at the nodes of Ranvier: implication in health and diseases. *Front Cell Neurosci*, *7*, 196. doi: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. doi:10.1083/jcb.149.2.491
- Fehmi, J., Davies, A. J., Walters, J., Lavin, T., Keh, R., Rossor, A. M., . . . Rinaldi, S. (2021). IgG1 pan-neurofascin antibodies identify a severe yet treatable

- neuropathy with a high mortality. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 92(10), 1089-1095. doi:10.1136/jnnp-2021-326343
- Fellah, J. S., Wiles, M. V., Charlemagne, J., & Schwager, J. (1992). Evolution of vertebrate IgM: complete amino acid sequence of the constant region of *Ambystoma mexicanum* mu chain deduced from cDNA sequence. *Eur J Immunol*, 22(10), 2595-2601. doi:10.1002/eji.1830221019
- Fels, M., Fisse, A. L., Schwake, C., Motte, J., Athanasopoulos, D., Gruter, T., . . . Labedi, A. (2021). Report of a fulminant anti-pan-neurofascin-associated neuropathy responsive to rituximab and bortezomib. *J Peripher Nerv Syst*, 26(4), 475-480. doi:10.1111/jns.12465
- Ferrante, A., Beard, L. J., & Feldman, R. G. (1990). IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr Infect Dis J*, 9(8 Suppl), S16-24.
- Figueroa, J. J., Dyck, P. J., Laughlin, R. S., Mercado, J. A., Massie, R., Sandroni, P., . . . Low, P. A. (2012). Autonomic dysfunction in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology*, 78(10), 702-708. doi:10.1212/WNL.0b013e3182494d66
- Fritzing, D. C., & Benjamin, D. E. (2016). The Complement System in Neuropathic and Postoperative Pain. *Open Pain J*, 9, 26-37. doi:10.2174/1876386301609010026
- 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. doi:10.1016/j.jns.2017.11.035
- Garg, N., Park, S. B., Yiannikas, C., Vucic, S., Howells, J., Noto, Y. I., . . . Kiernan, M. C. (2018). Neurofascin-155 IGG4 Neuropathy: Pathophysiological Insights, Spectrum of Clinical Severity and Response To treatment. *Muscle Nerve*, 57(5), 848-851. doi:10.1002/mus.26010
- Gelfand, E. W. (2006). Differences between IGIV products: impact on clinical outcome. *Int Immunopharmacol*, 6(4), 592-599. doi:10.1016/j.intimp.2005.11.003
- Gesellschaft für Neuropädiatrie: Diagnose und Therapie des Guillain-Barré Syndroms im Kindes- und Jugendalter, 4. Auflage, Version 1.0, verfügbar unter: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/022-008.html>, Zugriff am: 28.11.2021
- Glocker F, Kottlors M. Vaskulitische Polyneuropathie. In: Hufschmidt A, Lücking C, Rauer S, Glocker F, Hrsg. Neurologie compact. 8., unveränderte Auflage. Stuttgart: Thieme; 2020. doi:10.1055/b-007-170972
- Gollan, L., Salomon, D., Salzer, J. L., & Peles, E. (2003). Caspr regulates the processing of contactin and inhibits its binding to neurofascin. *J Cell Biol*, 163(6), 1213-1218. doi:10.1083/jcb.200309147
- Gong, S., & Ruprecht, R. M. (2020). Immunoglobulin M: An Ancient Antiviral Weapon - Rediscovered. *Front Immunol*, 11, 1943. doi:10.3389/fimmu.2020.01943
- Gonzalez-Quintela, A., Alende, R., Gude, F., Campos, J., Rey, J., Meijide, L. M., . . . Vidal, C. (2008). Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol*, 151(1), 42-50. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03545.x
- Goodfellow, J. A., Bowes, T., Sheikh, K., Odaka, M., Halstead, S. K., Humphreys, P. D., . . . Willison, H. J. (2005). Overexpression of GD1a ganglioside sensitizes motor nerve terminals to anti-GD1a antibody-mediated injury in a model of acute motor axonal neuropathy. *J Neurosci*, 25(7), 1620-1628. doi:10.1523/JNEUROSCI.4279-04.2005

- Goodfellow, J. A., & Willison, H. J. (2016). Guillain-Barre syndrome: a century of progress. *Nat Rev Neurol*, 12(12), 723-731. doi:10.1038/nrneuro.2016.172
- Goodyear, C. S., O'Hanlon, G. M., Plomp, J. J., Wagner, E. R., Morrison, I., Veitch, J., . . . Willison, H. J. (1999). Monoclonal antibodies raised against Guillain-Barre syndrome-associated *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharides react with neuronal gangliosides and paralyze muscle-nerve preparations. *J Clin Invest*, 104(6), 697-708. doi:10.1172/JCI6837
- Gordon, S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111(7), 927-930. doi:10.1016/s0092-8674(02)01201-1
- 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. doi:10.1212/wnl.48.2.321
- Grand'Maison, F., Feasby, T. E., Hahn, A. F., & Koopman, W. J. (1992). Recurrent Guillain-Barre syndrome. Clinical and laboratory features. *Brain*, 115 (Pt 4), 1093-1106. doi:10.1093/brain/115.4.1093
- Groggel, G. C., & Terreros, D. A. (1990). Role of the terminal complement pathway in accelerated autologous anti-glomerular basement membrane nephritis. *Am J Pathol*, 136(3), 533-540. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2180310>
- Gruner, J., Stengel, H., Werner, C., Appeltshauer, L., Sommer, C., Villmann, C., & Doppler, K. (2021). Anti-contactin-1 Antibodies Affect Surface Expression and Sodium Currents in Dorsal Root Ganglia. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 8(5). doi:10.1212/NXI.0000000000001056
- Haas, P. J., & van Strijp, J. (2007). Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunol Res*, 37(3), 161-175. doi:10.1007/BF02697367
- Hafer-Macko, C. E., Sheikh, K. A., Li, C. Y., Ho, T. W., Cornblath, D. R., McKhann, G. M., . . . Griffin, J. W. (1996). Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*, 39(5), 625-635. doi:10.1002/ana.410390512
- Hahn, A. F. (1996). Management of Guillain-Barre syndrome (GBS). *Baillieres Clin Neurol*, 5(3), 627-644.
- Hansch, G. M., Seitz, M., Martinotti, G., Betz, M., Rauterberg, E. W., & Gemsa, D. (1984). Macrophages release arachidonic acid, prostaglandin E₂, and thromboxane in response to late complement components. *J Immunol*, 133(4), 2145-2150. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6432907>
- Harmat, V., Gal, P., Kardos, J., Szilagyi, K., Ambrus, G., Vegh, B., . . . Zavodszky, P. (2004). The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. *J Mol Biol*, 342(5), 1533-1546. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.014
- Heuß D. et al., Diagnostik bei Polyneuropathien, S1-Leitlinie, 2019, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 28.11.2021)
- Hiramoto, E., Tsutsumi, A., Suzuki, R., Matsuoka, S., Arai, S., Kikkawa, M., & Miyazaki, T. (2018). The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci Adv*, 4(10), eaau1199. doi:10.1126/sciadv.aau1199
- Hmiel, L. K., Brorson, K. A., & Boyne, M. T., 2nd. (2015). Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity. *Anal Bioanal Chem*, 407(1), 79-94. doi:10.1007/s00216-014-8108-x
- Hourcade, D. E. (2008). Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr Drug Targets*, 9(2), 158-164. doi:10.2174/138945008783502458

- Howard, J. F., Jr., Utsugisawa, K., Benatar, M., Murai, H., Barohn, R. J., Illa, I., . . . Group, R. S. (2017). Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Lancet Neurol*, *16*(12), 976-986. doi:10.1016/S1474-4422(17)30369-1
- Howell, O. W., Palser, A., Polito, A., Melrose, S., Zonta, B., Scheiermann, C., . . . Reynolds, R. (2006). Disruption of neurofascin localization reveals early changes preceding demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain*, *129*(Pt 12), 3173-3185. doi:10.1093/brain/awl290
- Huang, C. C., Lehman, A., Albawardi, A., Satoskar, A., Brodsky, S., Nadasdy, G., . . . Nadasdy, T. (2013). IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Mod Pathol*, *26*(6), 799-805. doi:10.1038/modpathol.2012.237
- Hughes, R. (2008). The role of IVIg in autoimmune neuropathies: the latest evidence. *J Neurol*, *255* Suppl 3, 7-11. doi:10.1007/s00415-008-3003-z
- Hughes, R. A., & Cornblath, D. R. (2005). Guillain-Barre syndrome. *Lancet*, *366*(9497), 1653-1666. doi:10.1016/S0140-6736(05)67665-9
- Hulett, H. R., Bonner, W. A., Barrett, J., & Herzenberg, L. A. (1969). Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, *166*(3906), 747-749. doi:10.1126/science.166.3906.747
- Iijima, M., Koike, H., Hattori, N., Tamakoshi, A., Katsuno, M., Tanaka, F., . . . Refractory Peripheral Neuropathy Study Group of, J. (2008). Prevalence and incidence rates of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in the Japanese population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *79*(9), 1040-1043. doi:10.1136/jnnp.2007.128132
- Ilyas, A. A., Chen, Z. W., Cook, S. D., Mithen, F. A., & Singhal, B. S. (2001). Immunoglobulin G subclass distribution of autoantibodies to gangliosides in patients with Guillain-Barre syndrome. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, *109*(1-2), 115-123. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458979>
- Imagawa, D. K., Barbour, S. E., Morgan, B. P., Wright, T. M., Shin, H. S., & Ramm, L. E. (1987). Role of complement C9 and calcium in the generation of arachidonic acid and its metabolites from rat polymorphonuclear leukocytes. *Mol Immunol*, *24*(12), 1263-1271. doi:10.1016/0161-5890(87)90120-9
- Imbach, P., Barandun, S., d'Apuzzo, V., Baumgartner, C., Hirt, A., Morell, A., . . . Wagner, H. P. (1981). High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet*, *1*(8232), 1228-1231. doi:10.1016/s0140-6736(81)92400-4
- Inoshita, H., Ohsawa, I., Onda, K., Tamano, M., Horikoshi, S., Ohi, H., & Tomino, Y. (2012). An analysis of functional activity via the three complement pathways during hemodialysis sessions: a new insight into the association between the lectin pathway and C5 activation. *Clin Kidney J*, *5*(5), 401-404. doi:10.1093/ckj/sfs089
- Jacob, S., Murai, H., Utsugisawa, K., Nowak, R. J., Wiendl, H., Fujita, K. P., . . . Howard, J. F., Jr. (2020). Response to eculizumab in patients with myasthenia gravis recently treated with chronic IVIg: a subgroup analysis of REGAIN and its open-label extension study. *Ther Adv Neurol Disord*, *13*, 1756286420911784. doi:10.1177/1756286420911784
- Jacob, S., & Rajabally, Y. A. (2009). Current proposed mechanisms of action of intravenous immunoglobulins in inflammatory neuropathies. *Curr Neuroparmacol*, *7*(4), 337-342. doi:10.2174/157015909790031166
- Jacobs, B. C., O'Hanlon, G. M., Bullens, R. W., Veitch, J., Plomp, J. J., & Willison, H. J. (2003). Immunoglobulins inhibit pathophysiological effects of anti-GQ1b-positive

- sera at motor nerve terminals through inhibition of antibody binding. *Brain*, 126(Pt 10), 2220-2234. doi:10.1093/brain/awg235
- Jaspert, A., & al., e. (1995). [Value of proximal conduction block study in diagnosis of inflammatory neuropathies]. *Nervenarzt*, 66(6), 445-454. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637830>
- Jutel, M., & Akdis, C. A. (2011). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 66(6), 725-732. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02589.x
- Kabat, E. A., Wu, T. T., & Bilofsky, H. (1978). Variable region genes for the immunoglobulin framework are assembled from small segments of DNA--a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(5), 2429-2433. doi:10.1073/pnas.75.5.2429
- Kadoya, M., Kaida, K., Koike, H., Takazaki, H., Ogata, H., Moriguchi, K., . . . 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. doi:10.1016/j.jneuroim.2016.10.013
- Kaji, R., Shibasaki, H., & Kimura, J. (1992). Multifocal demyelinating motor neuropathy: cranial nerve involvement and immunoglobulin therapy. *Neurology*, 42(3 Pt 1), 506-509. doi:10.1212/wnl.42.3.506
- Kanda, H., Ling, J., Tonomura, S., Noguchi, K., Matalon, S., & Gu, J. G. (2019). TREK-1 and TRAAK Are Principal K(+) Channels at the Nodes of Ranvier for Rapid Action Potential Conduction on Mammalian Myelinated Afferent Nerves. *Neuron*, 104(5), 960-971 e967. doi:10.1016/j.neuron.2019.08.042
- Karbani, N., Eshed-Eisenbach, Y., Tabib, A., Hoizman, H., Morgan, B. P., Schueler-Furman, O., . . . Mevorach, D. (2018). Molecular pathogenesis of human CD59 deficiency. *Neurol Genet*, 4(6), e280. doi:10.1212/NXG.0000000000000280
- Katz, J. S., & Saperstein, D. S. (2001). Asymmetric Acquired Demyelinating Polyneuropathies: MMN and MADSAM. *Curr Treat Options Neurol*, 3(2), 119-125. doi:10.1007/s11940-001-0046-1
- Kawamura, N., Yamasaki, R., Yonekawa, T., Matsushita, T., Kusunoki, S., Nagayama, S., . . . Kira, J. (2013). Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology*, 81(8), 714-722. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a1aa9c
- Kearney, J. A., Buchner, D. A., De Haan, G., Adamska, M., Levin, S. I., Furay, A. R., . . . Meisler, M. H. (2002). Molecular and pathological effects of a modifier gene on deficiency of the sodium channel Scn8a (Na(v)1.6). *Hum Mol Genet*, 11(22), 2765-2775. doi:10.1093/hmg/11.22.2765
- 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. doi:10.1016/s0301-0082(00)00060-5
- Kieseier, B. C., Tani, M., Mahad, D., Oka, N., Ho, T., Woodroffe, N., . . . Hartung, H. P. (2002). Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain*, 125(Pt 4), 823-834. doi:10.1093/brain/awf070
- Kira, J. I., Yamasaki, R., & Ogata, H. (2019). Anti-neurofascin autoantibody and demyelination. *Neurochem Int*, 130, 104360. doi:10.1016/j.neuint.2018.12.011
- Koike, H., Kadoya, M., Kaida, K. I., Ikeda, S., Kawagashira, Y., Iijima, 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. doi:10.1136/jnnp-2016-314895
- Koneczny, I. (2018). A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol*, 9, 97. doi:10.3389/fimmu.2018.00097

- Korzeniewski, C., & Callewaert, D. M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, *64*(3), 313-320. doi:10.1016/0022-1759(83)90438-6
- Kuijpers, T. W., Weening, R. S., & Out, T. A. (1992). IgG subclass deficiencies and recurrent pyogenic infections, unresponsiveness against bacterial polysaccharide antigens. *Allergol Immunopathol (Madr)*, *20*(1), 28-34.
- Kuitwaard, K., de Gelder, J., Tio-Gillen, A. P., Hop, W. C., van Gelder, T., van Toorenenbergen, A. W., . . . Jacobs, B. C. (2009). Pharmacokinetics of intravenous immunoglobulin and outcome in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol*, *66*(5), 597-603. doi:10.1002/ana.21737
- 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. doi:10.1136/jnnp.2008.156463
- Kulasekararaj, A. G., Hill, A., Rottinghaus, S. T., Langemeijer, S., Wells, R., Gonzalez-Fernandez, F. A., . . . Peffault de Latour, R. (2019). Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study. *Blood*, *133*(6), 540-549. doi:10.1182/blood-2018-09-876805
- Kurlander, R. J., Rosse, W. F., & Logue, G. L. (1978). Quantitative influence of antibody and complement coating of red cells on monocyte-mediated cell lysis. *J Clin Invest*, *61*(5), 1309-1319. doi:10.1172/JCI109048
- Kuwabara, S., Misawa, S., & Mori, M. (2017). Nodopathy: chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin 155 antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *88*(6), 459. doi:10.1136/jnnp-2016-315170
- Kuwabara, S., Nakajima, M., Matsuda, S., & Hattori, T. (1997). Magnetic resonance imaging at the demyelination foci in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology*, *48*(4), 874-877. doi:10.1212/wnl.48.4.874
- Labasque, M., Hivert, B., Nogales-Gadea, G., Querol, L., Illa, I., & Faivre-Sarrailh, C. (2014). Specific contactin N-glycans are implicated in neurofascin binding and autoimmune targeting in peripheral neuropathies. *J Biol Chem*, *289*(11), 7907-7918. doi:10.1074/jbc.M113.528489
- Latov, N. (2021). Immune mechanisms, the role of complement, and related therapies in autoimmune neuropathies. *Expert Rev Clin Immunol*, 1-13. doi:10.1080/1744666X.2021.2002147
- Laughlin, R. S., Dyck, P. J., Melton, L. J., 3rd, Leibson, C., Ransom, J., & Dyck, P. J. (2009). Incidence and prevalence of CIDP and the association of diabetes mellitus. *Neurology*, *73*(1), 39-45. doi:10.1212/WNL.0b013e3181aaea47
- Lee, J. W., Sicre de Fontbrune, F., Wong Lee Lee, L., Pessoa, V., Gualandro, S., Fureder, W., . . . Hill, A. (2019). Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in adult patients with PNH naive to complement inhibitors: the 301 study. *Blood*, *133*(6), 530-539. doi:10.1182/blood-2018-09-876136
- Levine, T. D. (2019). Safety of an Abbreviated Transition Period When Switching From Intravenous Immunoglobulin to Eculizumab in Patients with Treatment-Refractory Myasthenia Gravis: A Case Series. *Am J Case Rep*, *20*, 965-970. doi:10.12659/AJCR.916424
- Lienenklaus, S., Ames, R. S., Tornetta, M. A., Sarau, H. M., Foley, J. J., Crass, T., . . . Bautsch, W. (1998). Human anaphylatoxin C4a is a potent agonist of the guinea pig but not the human C3a receptor. *J Immunol*, *161*(5), 2089-2093.
- Lleixa, C., Martin-Aguilar, L., Pascual-Goni, E., Franco, T., Caballero, M., de Luna, N., . . . Querol, L. (2021). Autoantibody screening in Guillain-Barre syndrome. *J Neuroinflammation*, *18*(1), 251. doi:10.1186/s12974-021-02301-0
- Lobner, D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods*, *96*(2), 147-152. doi:10.1016/S0165-0270(99)00193-4

- Loirat, C., Noris, M., & Fremeaux-Bacchi, V. (2008). Complement and the atypical hemolytic uremic syndrome in children. *Pediatr Nephrol*, *23*(11), 1957-1972. doi:10.1007/s00467-008-0872-4
- Mahajan, V. S., Mattoo, H., Deshpande, V., Pillai, S. S., & Stone, J. H. (2014). IgG4-related disease. *Annu Rev Pathol*, *9*, 315-347. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104708
- Manso, C., Querol, L., Lleixa, C., Poncelet, M., Mekaouche, M., Vallat, J. M., . . . Devaux, J. J. (2019). Anti-Neurofascin-155 IgG4 antibodies prevent paranodal complex formation in vivo. *J Clin Invest*, *129*(6), 2222-2236. doi: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*(Pt 6), 1700-1712. doi:10.1093/brain/aww062
- Mastellos, D. C., Ricklin, D., & Lambris, J. D. (2019). Clinical promise of next-generation complement therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, *18*(9), 707-729. doi:10.1038/s41573-019-0031-6
- Mathey, E. K., Derfuss, T., Storch, M. K., Williams, K. R., Hales, K., Woolley, D. R., . . . Linington, C. (2007). Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med*, *204*(10), 2363-2372. doi:10.1084/jem.20071053
- Mathey, E. K., Garg, N., Park, S. B., Nguyen, T., Baker, S., Yuki, N., . . . Kiernan, M. C. (2017). Autoantibody responses to nodal and paranodal antigens in chronic inflammatory neuropathies. *J Neuroimmunol*, *309*, 41-46. doi: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., . . . Lin, C. S. (2015). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *86*(9), 973-985. doi:10.1136/jnnp-2014-309697
- McCombe, P. A., Pollard, J. D., & McLeod, J. G. (1987). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases. *Brain*, *110* (Pt 6), 1617-1630. doi:10.1093/brain/110.6.1617
- McGonigal, R., Rowan, E. G., Greenshields, K. N., Halstead, S. K., Humphreys, P. D., Rother, R. P., . . . Willison, H. J. (2010). Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain*, *133*(Pt 7), 1944-1960. doi:10.1093/brain/awq119
- McGrogan, A., Madle, G. C., Seaman, H. E., & de Vries, C. S. (2009). The epidemiology of Guillain-Barre syndrome worldwide. A systematic literature review. *Neuroepidemiology*, *32*(2), 150-163. doi:10.1159/000184748
- 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.
- Medzhitov, R., & Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med*, *343*(5), 338-344. doi:10.1056/NEJM200008033430506
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, *296*(5566), 298-300. doi:10.1126/science.1068883
- Mehndiratta, M. M., Hughes, R. A., & Pritchard, J. (2015). Plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst Rev*(8), CD003906. doi:10.1002/14651858.CD003906.pub4
- Melendez-Vasquez, C., Carey, D. J., Zanazzi, G., Reizes, O., Maurel, P., & Salzer, J. L. (2005). Differential expression of proteoglycans at central and peripheral nodes of Ranvier. *Glia*, *52*(4), 301-308. doi:10.1002/glia.20245

- Menegoz, M., Gaspar, P., Le Bert, M., Galvez, T., Burgaya, F., Palfrey, C., . . . Girault, J. A. (1997). Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron*, *19*(2), 319-331. doi:10.1016/s0896-6273(00)80942-3
- Merkies, I. S., Schmitz, P. I., van der Meche, F. G., Samijn, J. P., van Doorn, P. A., Inflammatory Neuropathy, C., & Treatment, G. (2003). Connecting impairment, disability, and handicap in immune mediated polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *74*(1), 99-104. doi:10.1136/jnnp.74.1.99
- Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*, *6*, 262. doi:10.3389/fimmu.2015.00262
- Merle, N. S., Noe, R., Halbwachs-Mecarelli, L., Fremeaux-Bacchi, V., & Roumenina, L. T. (2015). Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*, *6*, 257. doi:10.3389/fimmu.2015.00257
- Merkies, I. S. J., van Schaik, I. N., Leger, J. M., Bril, V., van Geloven, N., Hartung, H. P., . . . the, P. S. G. (2019). Efficacy and safety of IVIG in CIDP: Combined data of the PRIMA and PATH studies. *J Peripher Nerv Syst*, *24*(1), 48-55. doi:10.1111/jns.12302
- Mevorach, D., Reiner, I., Grau, A., Ilan, U., Berkun, Y., Ta-Shma, A., . . . Tabib, A. (2016). Therapy with eculizumab for patients with CD59 p.Cys89Tyr mutation. *Ann Neurol*, *80*(5), 708-717. doi:10.1002/ana.24770
- Miura, Y., Devaux, J. J., Fukami, Y., Manso, C., Belghazi, M., Wong, A. H., . . . Group, C. C. S. (2015). Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain*, *138*(Pt 6), 1484-1491. doi:10.1093/brain/awv054
- Morgan, A., Jones, N. D., Nesbitt, A. M., Chaplin, L., Bodmer, M. W., & Emtage, J. S. (1995). The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for C1q, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding. *Immunology*, *86*(2), 319-324.
- Muley, S. A., Jacobsen, B., Parry, G., Usman, U., Ortega, E., Walk, D., . . . Dimachkie, M. M. (2020). Rituximab in refractory chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve*, *61*(5), 575-579. doi:10.1002/mus.26804
- Muley, S. A., & Parry, G. J. (2009). Inflammatory demyelinating neuropathies. *Curr Treat Options Neurol*, *11*(3), 221-227. doi:10.1007/s11940-009-0026-4
- Muppidi, S., Utsugisawa, K., Benatar, M., Murai, H., Barohn, R. J., Illa, I., . . . Regain Study, G. (2019). Long-term safety and efficacy of eculizumab in generalized myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, *60*(1), 14-24. doi:10.1002/mus.26447
- Myhr, K. M., Torkildsen, O., Lossius, A., Bo, L., & Holmoy, T. (2019). B cell depletion in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther*, *19*(3), 261-271. doi:10.1080/14712598.2019.1568407
- Nakane, P. K., & Kawaoi, A. (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, *22*(12), 1084-1091. doi:10.1177/22.12.1084
- Ng, J. K., Malotka, J., Kawakami, N., Derfuss, T., Khademi, M., Olsson, T., . . . Meinl, E. (2012). Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology*, *79*(23), 2241-2248. doi: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 U S A*, *92*(7), 2884-2888. doi:10.1073/pnas.92.7.2884
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol*, *26*, 513-533. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232

- Nithagon, P., Cortazar, F., Shah, S. I., Weins, A., Laliberte, K., Jeyabalan, A., . . . Zonozi, R. (2021). Eculizumab and Complement Activation in Anti-glomerular Basement Membrane Disease. *Kidney Int Rep*, 6(10), 2713-2717. doi:10.1016/j.ekir.2021.07.001
- Notturmo, F., Di Febo, T., Yuki, N., Fernandez Rodriguez, B. M., Corti, D., Nobile-Orazio, E., . . . Uncini, A. (2014). Autoantibodies to neurofascin-186 and gliomedin in multifocal motor neuropathy. *J Neuroimmunol*, 276(1-2), 207-212. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.09.001
- Ogata, H., Yamasaki, R., Hiwatashi, A., Oka, N., Kawamura, N., Matsuse, D., . . . Kira, J. (2015). Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann Clin Transl Neurol*, 2(10), 960-971. doi:10.1002/acn3.248
- Ogata, H., Zhang, X., Yamasaki, R., Fujii, T., Machida, A., Morimoto, N., . . . Kira, J. I. (2019). Intrathecal cytokine profile in neuropathy with anti-neurofascin 155 antibody. *Ann Clin Transl Neurol*, 6(11), 2304-2316. doi:10.1002/acn3.50931
- Oh, S. J., Claussen, G. C., & Kim, D. S. (1997). Motor and sensory demyelinating mononeuropathy multiplex (multifocal motor and sensory demyelinating neuropathy): a separate entity or a variant of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy? *J Peripher Nerv Syst*, 2(4), 362-369.
- Onica, D., Mihaescu, S., Zamfir, G., & Barac, D. (1983). C1q has albumin binding activity but does not interfere in the hemagglutination test for anti-albumin antibodies. *J Immunol Methods*, 59(1), 73-82. doi:10.1016/0022-1759(83)90147-3
- Onrust, S. V., Lamb, H. M., & Balfour, J. A. (1999). Rituximab. *Drugs*, 58(1), 79-88; discussion 89-90. doi:10.2165/00003495-199958010-00009
- Ottesen, E. A., Skvaril, F., Tripathy, S. P., Poindexter, R. W., & Hussain, R. (1985). Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. *J Immunol*, 134(4), 2707-2712.
- Papadimitriou, J. C., Ramm, L. E., Drachenberg, C. B., Trump, B. F., & Shin, M. L. (1991). Quantitative analysis of adenine nucleotides during the prelytic phase of cell death mediated by C5b-9. *J Immunol*, 147(1), 212-217.
- Pascual-Goni, E., Fehmi, J., Lleixa, C., Martin-Aguilar, L., Devaux, J., Hoftberger, R., . . . Querol, L. (2021). Antibodies to the Caspr1/contactin-1 complex in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Brain*, 144(4), 1183-1196. doi:10.1093/brain/awab014
- Patnaik, A. P., Mininni, J., Porter, N. C., & Morris, N. A. (2021). A Severe Course of Relapsing-Remitting Acute-Onset Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy in a Young Man. *Case Rep Neurol*, 13(1), 73-77. doi:10.1159/000511956
- Peles, E., Nativ, M., Campbell, P. L., Sakurai, T., Martinez, R., Lev, S., . . . 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. doi:10.1016/0092-8674(95)90312-7
- Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., . . . Schlessinger, J. (1997). Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions. *EMBO J*, 16(5), 978-988. doi:10.1093/emboj/16.5.978
- Peles, E., & Salzer, J. L. (2000). Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol*, 10(5), 558-565. doi:10.1016/s0959-4388(00)00122-7
- Pincetic, A., Bournazos, S., DiLillo, D. J., Maamary, J., Wang, T. T., Dahan, R., . . . Ravetch, J. V. (2014). Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, 15(8), 707-716. doi:10.1038/ni.2939
- Pittock, S. J., Fujihara, K., Palace, J., Berthele, A., Kim, H. J., Oreja-Guevara, C., . . . Group, P. S. (2021). Eculizumab monotherapy for NMOSD: Data from

- PREVENT and its open-label extension. *Mult Scler*, 13524585211038291. doi:10.1177/13524585211038291
- Poliak, S., Gollan, L., Martinez, R., Custer, A., Einheber, S., Salzer, J. L., . . . Peles, E. (1999). Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron*, 24(4), 1037-1047. doi:10.1016/s0896-6273(00)81049-1
- Poliak, S., & Peles, E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*, 4(12), 968-980. doi:10.1038/nrn1253
- Poliak, S., Salomon, D., Elhanany, H., Sabanay, H., Kiernan, B., Pevny, L., . . . 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. doi:10.1083/jcb.200305018
- Potter, M. (1983). Structural correlates of immunoglobulin diversity. *Surv Immunol Res*, 2(1), 27-42. doi:10.1007/BF02918394
- Press, R., Hiew, F. L., & Rajabally, Y. A. (2016). Steroids for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: evidence base and clinical practice. *Acta Neurol Scand*, 133(4), 228-238. doi:10.1111/ane.12519
- Press, R., Pashenkov, M., Jin, J. P., & Link, H. (2003). Aberrated levels of cerebrospinal fluid chemokines in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Clin Immunol*, 23(4), 259-267. doi:10.1023/a:1024532715775
- Pruss, H., Schwab, J. M., Derst, C., Gortzen, A., & Veh, R. W. (2011). Neurofascin as target of autoantibodies in Guillain-Barre syndrome. *Brain*, 134(Pt 5), e173; author reply e174. doi:10.1093/brain/awq372
- Quast, I., Keller, C. W., Hiepe, F., Tackenberg, B., & Lunemann, J. D. (2016). Terminal complement activation is increased and associated with disease severity in CIDP. *Ann Clin Transl Neurol*, 3(9), 730-735. doi:10.1002/acn3.331
- Querol, L., Nogales-Gadea, G., Rojas-Garcia, R., Diaz-Manera, J., Pardo, J., Ortega-Moreno, A., . . . Illa, I. (2014). Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology*, 82(10), 879-886. doi:10.1212/WNL.0000000000000205
- Querol, L., Nogales-Gadea, G., Rojas-Garcia, R., Martinez-Hernandez, E., Diaz-Manera, J., Suarez-Calvet, X., . . . Illa, I. (2013). Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol*, 73(3), 370-380. doi:10.1002/ana.23794
- Querol, L., Rojas-Garcia, R., Diaz-Manera, J., Barcena, J., Pardo, J., Ortega-Moreno, A., . . . Illa, I. (2015). Rituximab in treatment-resistant CIDP with antibodies against paranodal proteins. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2(5), e149. doi:10.1212/NXI.0000000000000149
- Rajabally, Y. A., Simpson, B. S., Beri, S., Bankart, J., & Gosalakal, J. A. (2009). Epidemiologic variability of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with different diagnostic criteria: study of a UK population. *Muscle Nerve*, 39(4), 432-438. doi:10.1002/mus.21206
- 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. doi:10.1083/jcb.107.4.1561
- Ranvier L. Contributions à l'histologie et à la physiologie des nerfs périphériques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 1871;73:1168-71
- 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. doi:10.1016/0169-328x(94)90372-7

- Reis, E. S., Berger, N., Wang, X., Koutsogiannaki, S., Doot, R. K., Gumas, J. T., . . . Lambris, J. D. (2018). Safety profile after prolonged C3 inhibition. *Clin Immunol*, *197*, 96-106. doi:10.1016/j.clim.2018.09.004
- Renaud, S., Gregor, M., Fuhr, P., Lorenz, D., Deuschl, G., Gratwohl, A., & Steck, A. J. (2003). Rituximab in the treatment of polyneuropathy associated with anti-MAG antibodies. *Muscle Nerve*, *27*(5), 611-615. doi:10.1002/mus.10359
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, *11*(9), 785-797. doi:10.1038/ni.1923
- Rios, J. C., Melendez-Vasquez, C. V., Einheber, S., Lustig, M., Grumet, M., Hemperly, J., . . . 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.
- Robak, P. (2015). Emerging immunological drugs for chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Emerg Drugs*, *20*(3), 423-447. doi:10.1517/14728214.2015.1046432
- Rodriguez, E., Nan, R., Li, K., Gor, J., & Perkins, S. J. (2015). A revised mechanism for the activation of complement C3 to C3b: a molecular explanation of a disease-associated polymorphism. *J Biol Chem*, *290*(4), 2334-2350. doi:10.1074/jbc.M114.605691
- Rosch, R. E., Bamford, A., Hacoheh, Y., Wraige, E., Vincent, A., Mewasingh, L., & Lim, M. (2014). Guillain-Barre syndrome associated with CASPR2 antibodies: two paediatric cases. *J Peripher Nerv Syst*, *19*(3), 246-249. doi:10.1111/jns.12089
- Rother, R. P., Rollins, S. A., Mojcik, C. F., Brodsky, R. A., & Bell, L. (2007). Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol*, *25*(11), 1256-1264. doi:10.1038/nbt1344
- Roux, K. H., Strelets, L., & Michaelsen, T. E. (1997). Flexibility of human IgG subclasses. *J Immunol*, *159*(7), 3372-3382.
- Roux, T., Debs, R., Maisonobe, T., Lenglet, T., Delorme, C., Louapre, C., . . . Viala, K. (2018). Rituximab in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy with associated diseases. *J Peripher Nerv Syst*, *23*(4), 235-240. doi:10.1111/jns.12287
- Ruts, L., Drenthen, J., Jacobs, B. C., van Doorn, P. A., & Dutch, G. B. S. S. G. (2010). Distinguishing acute-onset CIDP from fluctuating Guillain-Barre syndrome: a prospective study. *Neurology*, *74*(21), 1680-1686. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e07d14
- Said, G., & Krarup, C. (2013). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Handb Clin Neurol*, *115*, 403-413. doi:10.1016/B978-0-444-52902-2.00022-9
- Samuelsson, A., Towers, T. L., & Ravetch, J. V. (2001). Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science*, *291*(5503), 484-486. doi:10.1126/science.291.5503.484
- 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. doi:10.1002/1097-4598(200103)24:3<311::aid-mus1001>3.0.co;2-a
- Sawai, S., Satoh, M., Mori, M., Misawa, S., Sogawa, K., Kazami, T., . . . Kuwabara, S. (2014). Moesin is a possible target molecule for cytomegalovirus-related Guillain-Barre syndrome. *Neurology*, *83*(2), 113-117. doi:10.1212/WNL.0000000000000566
- Schafer, D. P., Bansal, R., Hedstrom, K. L., Pfeiffer, S. E., & Rasband, M. N. (2004). Does paranode formation and maintenance require partitioning of neurofascin 155 into lipid rafts? *J Neurosci*, *24*(13), 3176-3185. doi:10.1523/JNEUROSCI.5427-03.2004

- Schneider-Hohendorf, T., Schwab, N., Uceyler, N., Gobel, K., Sommer, C., & Wiendl, H. (2012). CD8+ T-cell immunity in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology*, *78*(6), 402-408. doi:10.1212/WNL.0b013e318245d250
- Sedaghat, Z., & Karimi, N. (2020). Guillain Barre syndrome associated with COVID-19 infection: A case report. *J Clin Neurosci*, *76*, 233-235. doi:10.1016/j.jocn.2020.04.062
- Sejvar, J. J., Baughman, A. L., Wise, M., & Morgan, O. W. (2011). Population incidence of Guillain-Barre syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology*, *36*(2), 123-133. doi:10.1159/000324710
- Sejvar, J. J., Kohl, K. S., Gidudu, J., Amato, A., Bakshi, N., Baxter, R., . . . Brighton Collaboration, G. B. S. W. G. (2011). Guillain-Barre syndrome and Fisher syndrome: case definitions and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*, *29*(3), 599-612. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.003
- Sekul, E. A., Cupler, E. J., & Dalakas, M. C. (1994). Aseptic meningitis associated with high-dose intravenous immunoglobulin therapy: frequency and risk factors. *Ann Intern Med*, *121*(4), 259-262. doi:10.7326/0003-4819-121-4-199408150-00004
- Sharp, T. H., Boyle, A. L., Diebold, 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 U S A*, *116*(24), 11900-11905. doi:10.1073/pnas.1901841116
- Shelly, S., Klein, C. J., Dyck, P. J. B., Paul, P., Mauermann, M. L., Berini, S. E., . . . Dubey, D. (2021). Neurofascin-155 Immunoglobulin Subtypes: Clinicopathologic Associations and Neurologic Outcomes. *Neurology*, *97*(24), e2392-e2403. doi:10.1212/WNL.0000000000012932
- Sheridan, D., Yu, Z. X., Zhang, Y., Patel, R., Sun, F., Lasaro, M. A., . . . Tamburini, P. (2018). Design and preclinical characterization of ALXN1210: A novel anti-C5 antibody with extended duration of action. *PLoS One*, *13*(4), e0195909. doi:10.1371/journal.pone.0195909
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*, *59*, 223-239. doi:10.1002/jcp.1030590302
- Shirazi, Y., Imagawa, D. K., & Shin, M. L. (1987). Release of leukotriene B4 from sublethally injured oligodendrocytes by terminal complement complexes. *J Neurochem*, *48*(1), 271-278. doi:10.1111/j.1471-4159.1987.tb13158.x
- Siber, G. R., Schur, P. H., Aisenberg, A. C., Weitzman, S. A., & Schiffman, G. (1980). Correlation between serum IgG-2 concentrations and the antibody response to bacterial polysaccharide antigens. *N Engl J Med*, *303*(4), 178-182. doi:10.1056/NEJM198007243030402
- Smith, M. R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, *22*(47), 7359-7368. doi:10.1038/sj.onc.1206939
- Sommer C. et al., Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden, S2e-Leitlinie, 2018; in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 24.11.2020)
- 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. doi:10.1212/01.wnl.0000188879.19900.b7

- Sondermann, P., Kaiser, J., & Jacob, U. (2001). Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol*, *309*(3), 737-749. doi:10.1006/jmbi.2001.4670
- Spiegel, I., Salomon, D., Erne, B., Schaeren-Wiemers, N., & Peles, E. (2002). Caspr3 and caspr4, two novel members of the caspr family are expressed in the nervous system and interact with PDZ domains. *Mol Cell Neurosci*, *20*(2), 283-297. doi:10.1006/mcne.2002.1110
- 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. doi:10.1038/nrneurol.2014.260
- Stengel, H., Vural, A., Brunder, A. M., Heinius, A., Appeltshauer, L., Fiebig, B., . . . Doppler, K. (2019). Anti-pan-neurofascin IgG3 as a marker of fulminant autoimmune neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, *6*(5). doi:10.1212/NXI.0000000000000603
- Sudalagunta, S. R., Sodalagunta, M. B., Sepehrar, M., Khorram, H., Bangalore Raja, S. K., Kothandapani, S., . . . Nidsale Sudarshan, R. (2015). Guillain-Barre syndrome: clinical profile and management. *Ger Med Sci*, *13*, Doc16. doi:10.3205/000220
- Susuki, K., Baba, H., Tohyama, K., Kanai, K., Kuwabara, S., Hirata, K., . . . Yuki, N. (2007). Gangliosides contribute to stability of paranodal junctions and ion channel clusters in myelinated nerve fibers. *Glia*, *55*(7), 746-757. doi:10.1002/glia.20503
- Susuki, K., Rasband, M. N., Tohyama, K., Koibuchi, K., Okamoto, S., Funakoshi, K., . . . Yuki, N. (2007). Anti-GM1 antibodies cause complement-mediated disruption of sodium channel clusters in peripheral motor nerve fibers. *J Neurosci*, *27*(15), 3956-3967. doi:10.1523/JNEUROSCI.4401-06.2007
- Tackenberg, B., Nimmerjahn, F., & Lunemann, J. D. (2010). Mechanisms of IVIG efficacy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Clin Immunol*, *30 Suppl 1*, S65-69. doi:10.1007/s10875-010-9398-1
- Tait, S., Gunn-Moore, F., Collinson, J. M., Huang, J., Lubetzki, C., Pedraza, L., . . . 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. doi:10.1083/jcb.150.3.657
- Tam, C. C., Rodrigues, L. C., Petersen, I., Islam, A., Hayward, A., & O'Brien, S. J. (2006). Incidence of Guillain-Barre syndrome among patients with Campylobacter infection: a general practice research database study. *J Infect Dis*, *194*(1), 95-97. doi:10.1086/504294
- 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. doi:10.1084/jem.178.2.661
- 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.5951-09.2010
- Uncini, A., & Kuwabara, S. (2015). Nodopathies of the peripheral nerve: an emerging concept. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *86*(11), 1186-1195. doi:10.1136/jnnp-2014-310097
- Uncini, A., Susuki, K., & Yuki, N. (2013). Nodo-paranodopathy: beyond the demyelinating and axonal classification in anti-ganglioside antibody-mediated neuropathies. *Clin Neurophysiol*, *124*(10), 1928-1934. doi:10.1016/j.clinph.2013.03.025
- US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03500549> (2019).

- Vallat, J. M., Mathis, S., Magy, L., Bounolleau, P., Skarzynski, M., Heitzmann, A., . . . Uncini, A. (2018). Subacute nodopathy with conduction blocks and anti-neurofascin 140/186 antibodies: an ultrastructural study. *Brain*, *141*(7), e56. doi:10.1093/brain/awy134
- Vallat, J. M., Yuki, N., Sekiguchi, K., Kokubun, N., Oka, N., Mathis, S., . . . Devaux, J. J. (2017). Paranodal lesions in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy associated with anti-Neurofascin 155 antibodies. *Neuromuscul Disord*, *27*(3), 290-293. doi:10.1016/j.nmd.2016.10.008
- van Belkum, A., van den Braak, N., Godschalk, P., Ang, W., Jacobs, B., Gilbert, M., . . . Endtz, H. (2001). A *Campylobacter jejuni* gene associated with immune-mediated neuropathy. *Nat Med*, *7*(7), 752-753. doi:10.1038/89831
- van den Berg, B., Walgaard, C., Drenthen, J., Fokke, C., Jacobs, B. C., & van Doorn, P. A. (2014). Guillain-Barre syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. *Nat Rev Neurol*, *10*(8), 469-482. doi:10.1038/nrneurol.2014.121
- Van den Bergh, P. Y., Hadden, R. D., Bouche, P., Cornblath, D. R., Hahn, A., Illa, I., . . . Peripheral Nerve, S. (2010). European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision. *Eur J Neurol*, *17*(3), 356-363. doi:10.1111/j.1468-1331.2009.02930.x
- Van den Bergh, P. Y. K., van Doorn, P. A., Hadden, R. D. M., Avau, B., Vankrunkelsven, P., Allen, J. A., . . . Topaloglu, H. A. (2021). European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint Task Force-Second revision. *J Peripher Nerv Syst*, *26*(3), 242-268. doi:10.1111/jns.12455
- van der Neut Kolschoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W. K., Martinez-Martinez, P., Vermeulen, E., . . . Parren, P. W. (2007). Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science*, *317*(5844), 1554-1557. doi:10.1126/science.1144603
- van Doorn, P. A., Ruts, L., & Jacobs, B. C. (2008). Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol*, *7*(10), 939-950. doi:10.1016/S1474-4422(08)70215-1
- van Schaik, I. N., Eftimov, F., van Doorn, P. A., Brusse, E., van den Berg, L. H., van der Pol, W. L., . . . Vermeulen, M. (2010). Pulsed high-dose dexamethasone versus standard prednisolone treatment for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (PREDICT study): a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*, *9*(3), 245-253. doi:10.1016/S1474-4422(10)70021-1
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*, *5*, 520. doi:10.3389/fimmu.2014.00520
- Vital, C., Vital, A., Lagueny, A., Ferrer, X., Fontan, D., Barat, M., . . . Petry, K. G. (2000). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: immunopathological and ultrastructural study of peripheral nerve biopsy in 42 cases. *Ultrastruct Pathol*, *24*(6), 363-369. doi:10.1080/019131200750060023
- Vlam, L., Cats, E. A., Harschnitz, O., Jansen, M. D., Piepers, S., Veldink, J. H., . . . van der Pol, W. L. (2015). Complement activity is associated with disease severity in multifocal motor neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, *2*(4), e119. doi:10.1212/NXI.0000000000000119
- Vlam, L., Cats, E. A., Willemse, E., Franssen, H., Medic, J., Piepers, S., . . . van der Pol, W. L. (2014). Pharmacokinetics of intravenous immunoglobulin in multifocal

- motor neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85(10), 1145-1148. doi:10.1136/jnnp-2013-306227
- 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. doi:10.3389/fimmu.2018.01029
- Walport, M. J. (2001a). Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 344(14), 1058-1066. doi:10.1056/NEJM200104053441406
- Walport, M. J. (2001b). Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*, 344(15), 1140-1144. doi:10.1056/NEJM200104123441506
- Waxman, S. G., & Ritchie, J. M. (1993). Molecular dissection of the myelinated axon. *Ann Neurol*, 33(2), 121-136. doi:10.1002/ana.410330202
- Weiss, M. D., Dalakas, M. C., & al., e. (1999). Variability in the binding of anti-MAG and anti-SGPG antibodies to target antigens in demyelinating neuropathy and IgM paraproteinemia. *J Neuroimmunol*, 95(1-2), 174-184. doi:10.1016/s0165-5728(98)00247-1
- Wetsel, R. A. (1995). Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *Curr Opin Immunol*, 7(1), 48-53. doi:10.1016/0952-7915(95)80028-x
- Wieske, L., Martin-Aguilar, L., Fehmi, J., Lleixa, C., Koel-Simmelink, M. J. A., Chatterjee, M., . . . Eftimov, F. (2021). Serum Contactin-1 in CIDP: A Cross-Sectional Study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 8(5). doi:10.1212/NXI.0000000000001040
- Willison, H. J., Halstead, S. K., Beveridge, E., Zitman, F. M., Greenshields, K. N., Morgan, B. P., & Plomp, J. J. (2008). The role of complement and complement regulators in mediating motor nerve terminal injury in murine models of Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol*, 201-202, 172-182. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.05.028
- Willison, H., & Scherer, S. S. (2014). Ranvier revisited: novel nodal antigens stimulate interest in GBS pathogenesis. *Neurology*, 83(2), 106-108. doi:10.1212/WNL.0000000000000581
- Yamaguchi, N., Misawa, S., Sato, Y., Nagashima, K., Katayama, K., Sekiguchi, Y., . . . Group, J.-G. (2016). A Prospective, Multicenter, Randomized Phase II Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Eculizumab in Patients with Guillain-Barre Syndrome (GBS): Protocol of Japanese Eculizumab Trial for GBS (JET-GBS). *JMIR Res Protoc*, 5(4), e210. doi:10.2196/resprot.6610
- Yan, W., & al., e. (2014). Antibodies to neurofascin exacerbate adoptive transfer experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*, 277(1-2), 13-17. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.09.012
- Zhang, A., Desmazieres, A., Zonta, B., Melrose, S., Campbell, G., Mahad, D., . . . 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.3552-14.2015
- Zhang, X., Zheng, P., Devaux, J. J., Wang, Y., Liu, C., Li, J., . . . Wang, Y. (2019). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-NF155 IgG4 in China. *J Neuroimmunol*, 337, 577074. doi:10.1016/j.jneuroim.2019.577074

8 Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1: Ranvier-Schnürring des PNS</u>	18
<u>Abbildung 2: Proteine des Ranvier-Schnürringes</u>	23
<u>Abbildung 3: Immunglobulin G Aufbau mit Unterteilung in Fab und Fc Region</u>	33
<u>Abbildung 4: Schema der Komplementkaskade</u>	39
<u>Abbildung 5: Schema eines ELISAs</u>	56
<u>Abbildung 6: Schema eines ELISA-basierten Komplementbindungsassays</u>	61
<u>Abbildung 7: Schema des ELISAs mit Zugabe von IVIG/BSA</u>	64
<u>Abbildung 8: Schema des KBAs mit Zugabe von IVIG/BSA</u>	67
<u>Abbildung 9: Schema des HEK-Zell KBAs</u>	72
<u>Abbildung 10: Mäusezupfnervenfärbung</u>	81
<u>Abbildung 11: IgG-Subklassen der sechs seropositiven Patienten/Patientinnen, Verdünnung 1:100</u>	83
<u>Abbildung 12: IgG-Subklassen der sechs seropositiven Patienten/Patientinnen, Verdünnung an Anti-NF-155 Titer angepasst</u>	85
<u>Abbildung 13: Mäusezupfnervenfärbung (2)</u>	87
<u>Abbildung 14: Contactin-1 DNA transfizierte HEK-293-Zellen</u>	88
<u>Abbildung 15: HEK Zellfärbungen</u>	89
<u>Abbildung 16: Komplementbindungsassay</u>	92
<u>Abbildung 17: Komplementbindungsassay und Subklassen</u>	92
<u>Abbildung 18: Korrelation IgG1 mit Komplementablagerung</u>	95
<u>Abbildung 19: Korrelation IgG3 mit Komplementablagerung</u>	95
<u>Abbildung 20: Korrelation Summe IgG1 bis IgG3 mit Komplementablagerung</u>	96
<u>Abbildung 21: Korrelation IgG4 mit Komplementablagerung</u>	97
<u>Abbildung 22: Korrelation IgG1 bis 3 gewichtet mit Komplementablagerung</u>	98
<u>Abbildung 23: Korrelation IgG4 minus IgG1-3 mit Komplementablagerung</u>	99
<u>Abbildung 24: Kolokalisationsversuche an NF-155 transfizierten HEK-293 Zellen</u>	100
<u>Abbildung 25: Koinkubation von IVIG/BSA mit Patientenserum</u>	102
<u>Abbildung 26: Präinkubation von IVIG/BSA vor Patientenserum</u>	102
<u>Abbildung 27: Koinkubation von IVIG/BSA mit Fab</u>	103
<u>Abbildung 28: Koinkubation der NF-155 transfizierten HEK-293-Zellen von IVIG/BSA mit dem Patientenserum.</u>	104
<u>Abbildung 29: Präinkubation der NF-155 transfizierten HEK-293-Zellen mit IVIG/BSA vor Gabe des Patientenserums</u>	105
<u>Abbildung 30: Inkubation der NF-155 transfizierten HEK-293-Zellen mit IVIG/BSA nach Gabe des Patientenserums/ Koinkubation mit dem Sekundär-Antikörper</u>	106
<u>Abbildung 31: Koinkubation von IVIG/Milchpulver mit C1q</u>	107

<u>Abbildung 32: Komplementbindungsassay an NF-155 transfizierten HEK-293-Zellen mit Koinkubation von IVIG/BSA mit dem Komplementfaktor C1q</u>	109
<u>Abbildung 33: Präinkubation gebundener Ak mit IVIG/Milchpulver vor Zugabe C1q</u>	110
<u>Abbildung 34: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4</u>	113
<u>Abbildung 35: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4 (2)</u>	114
<u>Abbildung 36: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4 und IVIG</u>	117
<u>Abbildung 37: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4 und IVIG/Milchpulver</u>	118
<u>Abbildung 38: LDH Assay mit humanem Komplementserum in 1:4 und IVIG/Milchpulver (2)</u>	119
<u>Abbildung 39: Reduktion der relativen Zytotoxizitäten durch IVIG</u>	120
<u>Abbildung 40: Reduktion der relativen Zytotoxizitäten durch IVIG (2)</u>	121

9 Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1: Brighton Kriterien zur Diagnose eines Guillain-Barré Syndroms</u>	7
<u>Tabelle 2: EFNS-/PNS-Kriterien der CIDP Diagnose</u>	9
<u>Tabelle 3: Studienlage zu nodalen und juxtaparanodalen Autoantikörpern</u>	28
<u>Tabelle 4: Studienlage zu paranodalen Autoantikörpern</u>	29
<u>Tabelle 5: Reagenzien und Materialien für die Immunhistochemie</u>	42
<u>Tabelle 6: Materialien und Reagenzien für ELISA/KBA</u>	43
<u>Tabelle 7: Herstellung von Puffern/Lösungen.</u>	43
<u>Tabelle 8: Primär-Antikörper als Positivkontrolle</u>	44
<u>Tabelle 9: Sekundär-Antikörper</u>	45
<u>Tabelle 10: Proteine</u>	46
<u>Tabelle 11: Materialien und Reagenzien für HEK-Kultur</u>	46
<u>Tabelle 12: Materialien für LDH-Zytotoxizitätsversuche</u>	48
<u>Tabelle 13: Puffer für die HEK-Zellkultur</u>	48
<u>Tabelle 14: Verwendete Geräte</u>	49
<u>Tabelle 15: Verwendete Software</u>	49
<u>Tabelle 16: ELISA: Optische Dichten der Patienten/Patientinnen in verschiedenen Verdünnungen.</u>	57
<u>Tabelle 17: Verhältnisse der Optischen Dichten der Patientenserum</u>	58
<u>Tabelle 18: Berechnete Verdünnung für Patienten/Patientinnen 1 bis 6</u>	59
<u>Tabelle 19: Optimale Verdünnungen der Patienten/Patientinnen 1 bis 6</u>	59
<u>Tabelle 20: Optische Dichten im Fab-ELISA</u>	65
<u>Tabelle 21: Verdünnung der Patientenserum 1 bis 6 in den HEK-Zellversuchen mit IVIG/BSA.</u>	73
<u>Tabelle 22: Optische Dichten im NF-155-ELISA für alle sechs seropositiven Patienten/Patientinnen</u>	79
<u>Tabelle 23: Darstellung der Antikörper-Titer der Patienten/Patientinnen 1 bis 6</u>	82
<u>Tabelle 24: Optische Dichten der seropositiven Patienten/Patientinnen 1 bis 6 in den jeweiligen berechneten ELISA-verifizierten angepassten Verdünnungen</u>	84
<u>Tabelle 25: Optische Dichten der seropositiven Patienten/Patientinnen 1 bis 6 in den jeweiligen berechneten angepassten Verdünnungen für den KBA</u>	84
<u>Tabelle 26: Subklassenverteilung der sechs seropositiven Patienten/Patientinnen</u>	85
<u>Tabelle 27: Optischen Dichten der Anti-NF-155 seropositiven Patienten/Patientinnen im Komplementbindungsassay</u>	91
<u>Tabelle 28: Korrelationen im Spearman-Rho Test</u>	94
<u>Tabelle 29: T-Test bei gepaarten/verbundenen Stichproben</u>	108
<u>Tabelle 30: T-Test bei gepaarten/verbundenen Stichproben (2)</u>	111
<u>Tabelle 31: Relative Zytotoxizität mit humanem Komplementserum</u>	112

<u><i>Tabelle 32: Relative Zytotoxizitäten in Prozent für alle sechs seropositiven Patienten/Patientinnen mit Anti-NF-155 Autoantikörpern</i></u>	115
<u><i>Tabelle 33: Klinische Daten, Liquorbefunde und Ergebnisse der Elektroneurographie der sechs seropositiven Patienten mit Anti-NF-155 Autoantikörpern</i></u>	128
<u><i>Tabelle 34: Therapeutisches Ansprechen der sechs seropositiven Patienten</i></u>	131
<u><i>Tabelle 35: Klinische Daten, Liquorbefunde und Ergebnisse der Elektroneurographie der zwei seropositiven Patienten mit Anti-Contactin-1 Autoantikörpern</i></u>	135

10 Abkürzungsverzeichnis

A-CIDP	acute onset chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
ADAM-22	human a disintegrin and metalloprotease 22
Ag	Antigen
AIDP	akute inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
Ak	Antikörper
AMAN	akute motorische axonale Neuropathie
AMSAN	akute motorische und sensible axonale Neuropathie
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP	alternative pathway
BSA	Bovines Serumalbumin
Caspr	Contactin-associated-protein
CAM	cell adhesion molecule
CIDP	chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CNTN	Contactin
CPR	cardiopulmonary resuscitation
DADS	distal erworbene demyelinisierende symmetrische Neuropathie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dl	Deziliter
dmL	distal motorische Latenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EAN/PNS	European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Societies
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFNS	European Federation of Neurological Societies
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMG	Elektromyographie
ENG	Elektroneurographie
Fab	fragment antigen binding
FBS	fetal bovine serum

Fc	crystalisable fragment
Fn	Fibronektin
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GFP	green fluorescent protein
GIT	gastrointestinal
GLDN	Gliomedin
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HBS	HEPES buffered saline
HEK	human embryonic kidney
HRP	horseradish peroxidase
HUS	hämolytisch urämisches Syndrom
IgG	Immunglobulin G
Il	Interleukin
INCAT	Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment Group
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
KBA	Komplementbindungsassay
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KM	Kontrasmittel
Kv	spannungsgesteuerte Kaliumkanäle
LDH	Laktatdehydrogenase
LLN	lower limit of normal
M	männlich
MAC	Membranangriffskomplex
MADSAM	multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie
MAG	myelin associated glycoprotein
MASP	MBL-assozierte Serinproteasen
MBL	mannose-binding-lectin
MEM	minimal essential medium
MFS	Miller-Fisher-Syndrom
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex

MMN	multifokale motorische Neuropathie
MRC	Medical Research Council
MRT	Magentresonanztomogramm
MS	Multiple Sklerose
Nav	spannungsgesteuerte Natriumkanäle
n.d.	nicht durchgeführt
NF	Neurofascin
NGS	normal goat serum
NLG	Nervenleitungsgeschwindigkeit
NMOSD	Neuromyelitis-Optica-Spektrums-Erkrankungen
NrCAM	neuronal cell adhesion molecule
NRS	Numerische Rating-Skala
MG	Myasthenia gravis
ONGW	oberer Normgrenzwert
OD	Optische Dichte
OE	Obere Extremität
PAMPS	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PDL	Poly-D-Lysin
PE	plasma exchange / Plasmapherese
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGY	Prolin-Glycin-Tyrosin
PNH	paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PNS	peripheres Nervensystem
PRR	pattern-recognition-receptors
SAP	Summenaktionspotential
SIDP	subakut inflammatorische demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
SNAP	sensibles Nervenaktionspotential
SSEP	sensible somatisch evozierte Potentiale
TE	Tris + EDTA
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRAAK	TWIK-related arachidonic acid stimulated potassium channel

TREK-1	TWIK-related potassium channel 1
TRF	treatment related fluctuation
TWIK	Tandem of P-domains in a weakly inward rectifying K ⁺ channel
UE	Untere Extremität
UKW	Universitätsklinikum Würzburg
ULN	upper limit of normal
W	weiblich
ZNS	zentrales Nervensystem

11 Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Kathrin Doppler für die Bereitstellung des Promotionsthemas sowie die herausragende fachliche Betreuung und ausgezeichnete und zeitaufwändige Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Claudia Sommer für die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie die hervorragende langjährige Unterstützung und fachlich wertvollen Ratschläge bedanken.

Zu besonderem Dank bin ich Frau Dr. Luise Appeltshauer verpflichtet, die mich in die Methoden einarbeitete, mich exzellent und unter hohem Zeitaufwand unterstützte, für Fragen stets zur Verfügung stand und durch ihre hervorragenden Ratschläge in hohem Maße zu der Qualität dieser Arbeit beitrug.

Darüber hinaus möchte ich den weiteren Mitgliedern des Promotionskomitees Prof. Dr. Carmen Villman und Prof. Dr. Heike Rittner für die ausgezeichnete Betreuung und fachlichen Anregungen zu meiner Arbeit danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Neurologischen Klinik und insbesondere der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Sommer für die Einarbeitung, technische Unterstützung und stetige Hilfsbereitschaft bedanken. Zu nennen sind hier insbesondere Barbara Reuter, Susi Hellmig, Helena Stengel, Bianca Fiebig und Julia Grüner.

Des Weiteren möchte ich mich für das Promotionsstipendium der Graduate School of Life Sciences und das hervorragende strukturierte Programm für medizinische Doktoranden bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meinen Freunden, insbesondere Lukas Hufnagel, die mich stets in allen Belangen unterstützten und weiter motivierten.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „The effects of IVIG on antibody binding and complement deposition in anti-neurofascin associated neuropathy“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Würzburg, den 20.11.2022

Julia Messinger

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Effekte von IVIG auf die Antikörperbindung und Komplementablagerung bei Anti-Neurofascin-positiver Nodo-Paranodopathie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg, den 20.11.2022

Julia Messinger

