

Christian Albrechts Universität zu Kiel Physiologisches Institut
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Med. M. Bleich

**Untersuchungen zum Nachweis und zur Bedeutung neuronaler
Autoantikörper am Beispiel von Rasmussen Enzephalitis und
Limbischer Enzephalitis**



Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Zahnheilkunde
(Dr. med. dent.)

Vorgelegt von
Stanislav Ivanov

Kiel 2013

1 Berichterstatter

PD Dr. Johann Schmidtmayer

2 Berichterstatter

PD Dr. Nicolas Lang

Tag der mündlichen Prüfung:

19.12.2014

Zum Druck genehmigt, Kiel den

15.10.2014

Eidesstattliche Versicherung:

Hiermit erkläre ich, Stanislav Ivanov an Eides statt, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

„Untersuchungen zum Nachweis und zur Bedeutung neuronale Autoantikörper am Beispiel von Rasmussen Enzephalitis und Limbischer Enzephalitis“

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe.

Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt. Die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Kiel

Unterschrift

1 Einleitung	1
1.1 Rasmussen Enzephalitis	1
1.2 Die Limbische Enzephalitis	2
1.3 Das Immunsystem	4
1.3.1 Immunkompetente Zellen	7
1.3.2 Dendritische Zellen	8
1.3.3 Das Komplementsystem	8
1.3.4 Immunglobuline	9
1.3.4.1 Immunglobulin G (IgG)	11
1.4 Autoantikörper	12
1.4.1 Nachweismethoden von Autoantikörper	14
1.5 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle	14
1.5.1 Struktur und Funktionsmechanismus	14
1.5.2 Akzessorische beta-Untereinheiten	16
1.5.3 Bildung von Heteromultimeren	17
1.5.4 Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv 1.3	17
1.5.5 Regulation des Kv 1.3	17
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	19
1.7 Patientengeschichten	20
1.7.1 Patient LE (aus der Krankenakte der behandelnden Klinik)	20
1.7.2 Patient RE	21
2 Material und Methoden	24
2.1 Zellkulturen	24
2.1.1 Glioma Zelllinien	24

2.1.2 Fibroblasten Zelllinien	24
2.1.2.1 L929	24
2.1.3 Kontrollserum	26
2.1.4 Patientenserum Limbische Enzephalitis	26
2.1.5 Eluat Patientin RE	27
2.2 Patch clamp	27
2.2.1 Patchpipetten	28
2.2.2 Versuchsaufbau	28
2.2.3 Lösungen für die Patch clamp Versuche	29
2.3 Immunhistochemie	30
2.3.1 Versuchsaufbau Immunhistochemie	30
2.3.4 Versuchsaufbau Zytotoxizitätstests RE	31
3 Ergebnisse	33
3.1 Limbische Enzephalitis	33
3.1.1 Immunhistochemieergebnisse	33
3.1.2 Pathogenes Potential der VGKC-Autoantikörper	37
3.1.3 Zytotoxizität	37
3.2 Auswirkung auf die Zellfunktion	39
3.3 Rasmussen Enzephalitis	41
3.3.1 Antikörperbindung an Astrozyten	42
3.3.2 Antikörperbindung an Gliomazellen	44
3.3.3 Zytotoxizitätsversuche	48
(Ausschnitt Abb. 16a)	49
4 Diskussion	52

5 Zusammenfassung	61
6 Literaturverzeichnis	63
7 Danksagung	75
8 Lebenslauf	76

1 Einleitung

1.1 Rasmussen Enzephalitis

Die heute als Rasmussen Enzephalitis bekannte Erkrankung wurde schon vor über 50 Jahre zum ersten Mal von dem Montrealer Neurochirurgen Theodore Rasmussen beschrieben (Rasmussen et al 1958). Es handelt sich um eine seltene (jährliche Inzidenz von ca.1:500.000) chronische progrediente Epilepsieerkrankung, die überwiegend, aber nicht ausschließlich, im Kindesalter auftritt. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen sechs bis sieben Jahren. Über 12-jährige Patienten machen ca. 10-15% aller an Rasmussen Enzephalitis Erkrankten aus. In der Mehrzahl dieser Fälle ist der Verlauf langsamer und scheint weniger schwer zu sein, als bei Kindern (Gray et al 1987, Hart et al 1997).

Die Klinik ist durch das Auftreten einer Epilepsia partialis continua und anderer Formen fokaler, aber auch generalisierter tonisch-klonischer pharmakoresistenter Anfälle gekennzeichnet. Die Ursache dieser Erkrankung ist noch immer unklar. Die Serumuntersuchung auf Autoantikörper gegen die Glutamaterezeptoruntereinheit 3 (GluR3-Ak), vorgeschlagen in der Mitte der 1990-er Jahre (Rogers et al. 1994), kann nicht mehr als diagnostisch aussagekräftig angesehen werden. Die GluR3-Antikörper sind weder spezifisch für die Krankheit, noch stellen sie ein sensitives Diagnoseinstrument dar (Mantegazza et al 2002) .

Nach einer 2009 veröffentlichten Untersuchung (Schwab et al. 2009) entsteht die Erkrankung durch einen gezielten Angriff des Immunsystems auf bislang unbekannte Strukturen im Gehirn. Dabei scheinen zytotoxische CD8-positive T-Zellklone Nervenzellen und Astrozyten anzugreifen. Unklar ist derzeit, ob es sich bei den auslösenden Strukturen um solche handelt, die zum eigenen Körper gehören oder auch möglicherweise Bestandteile bislang unbekannter Viren sind (Schwab et al 2009). Die Diagnose kann im Frühstadium der Erkrankung, wenn das MRT unauffällig ist, schwierig sein. Die ersten MRT-Veränderungen bestehen aus einer T2-Signal-Erhöhung im Mark, das an den

Kortex grenzt. Die Atrophie, häufig beginnend in der Insel und im Frontallappen, tritt erst im Verlauf, oft nach mehreren Jahren, auf. Zu beachten ist auch, dass der Liquor abnorm sein kann (Proteinerhöhung und erhöhte Zahl von Lymphozyten), ein normaler Liquorbefund eine Rasmussen-Enzephalitis aber nicht ausschließt (Oguni et al. 1991).

Da ein durch Antikörper und/oder durch zytotoxische T-Lymphozyten gesteuerter Autoimmunprozess als Pathogenese dieser chronischen Enzephalitis vermutet wird, kommen immunmodulierenden Therapien mit Steroiden, Immunglobulinen, Zytostatika und Tacrolinums (Immunsupresivum verabreicht in Kapselform) große Bedeutung zu (Bien und Elger 2003). Die frühe Hemisphärektomie ist bei Kindern, die bereits hemiparetisch sind, eine Hemianopsie und keine Sprachfunktion in der erkrankten Hemisphäre haben, Therapie der Wahl und führt in den meisten Fällen zu einer Anfallsfreiheit (Oguni et al. 1992).

1.2 Die Limbische Enzephalitis

Die limbische Enzephalitis (LE) wurde in den 1960er Jahren von Brierley und Kollegen in klinisch-neuropathologischen Fallserien bei sechs erwachsenen Patienten beschrieben, die unter einer progredienten neurologischen Erkrankung litten (Brierley et al., 1960). 1968 beschrieben Brierley, Corsellis und Mitarbeiter sechs Patienten, zwischen 50 und 80 Jahren alt. Sie verstarben nach einem bis zu zweijährigen Krankheitsverlauf. Die Erkrankung war gekennzeichnet durch eine schwerere Beeinträchtigung des episodischen Gedächtnisses, Verwirrtheit, Halluzinationen, Bewegungs- und Verhaltensstörungen (Corsellis et al., 1968). Ursprünglich galt LE als ausschließlich paraneoplastische Erkrankung. Bei vier der sechs Patienten von Brierley und Corsellis wurden bei der Autopsie Tumore gefunden, davon drei Lungentumore. LE kann aber auch mit anderen Malignomen einhergehen, wie z.B. Thymom, Hodenkarzinom, Mammakarzinom und Lymphomen (Voltz et al., 2002).

Diese häufige Assoziation der limbischen Enzephalitis mit Karzinomen führte zu dem erweiterten Begriff „paraneoplastische limbische Enzephalitis“ (PLE).

Allerdings werden seit einiger Zeit auch erwachsene Patienten beschrieben, die ohne Tumorerkrankung Symptome entwickeln, die von einer PLE nicht zu unterscheiden sind und bei denen histologisch nach epilepsiechirurgischem Eingriff oder diagnostischer Hirnbiopsie eine chronische lymphozytär-mikronoduläre Enzephalitis nachgewiesen wurde (Bien et al., 2000; Bien, 2008). Charakteristisch für diese nicht-paraneoplastische LE ist das Auftreten von Serum-Antikörpern gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle (Voltage Gated K Channels, VGKC)(Vincent et al., 2004).

Im Gegensatz zu der paraneoplastischer LE ist die LE kombiniert mit VGKC-AK nach einer immunsuppressiven Behandlung potentiell reversibel (Vincent et al., 2004). In anderen Fällen verschwanden die Symptome sogar spontan.

Buckley und Kollegen zeigten eine starke Bindung der Antikörper zum Hippocampus (Buckley et al., 2001) und bezeichneten den Hippocampus als das Hauptzentrum dieser Antikörperaktivität.

Im Gegensatz zu den paraneoplastischen Antikörpern, deren Antigene intrazellulär lokalisiert sind, sind die VGKC-Kanäle als Antigene in der Plasmamembran vorhanden. Sie sind Schlüsseldeterminanten in der Regulierung neuronaler Erregbarkeit (Hille, B., 1992). Veränderungen in menschlichen VGCK-Gen (Kv 1.1) sind oft mit schweren neurologischen Störungen verbunden (Zuberi et al., 2004). Eine ähnliche pathogene Wirkung der VGKC-AK findet man bei Patienten mit peripherer Nervenübererregbarkeit (APNH) und Morvan`s-Syndrom. Bei einem Versuchstier, welches Patientenplasma mit VGCK-AK injiziert bekommen hat, konnte APNH ausgelöst werden (Shillito et al., 1995). Patch-Clamp-Studien (Nagado et al., 1999) zeigten, dass APNH-IgGs die Zahl der funktionellen VGKCs reduzieren, ohne die Kanal- funktion oder ihre Kinetik zu beeinflussen.

1.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist gegen mikrobielle Erreger und genetisch veränderte körpereigene Zellen gerichtet. Ein Teil der Immunität ist von Geburt an vorhanden und besteht zeitlebens; die so genannte angeborene Immunität, ein anderer Teil wird erst im Laufe des Lebens durch die Auseinandersetzung mit Antigenen erworben (adaptive Immunität). B- und T-Lymphozyten gehören zum adaptiven Immunsystem. B-Lymphozyten produzieren nach ihrer Differenzierung zu Plasmazellen Antikörper. Die zellvermittelte adaptive Immunantwort wird vom T-Lymphozyten getragen, die im direkten Zell-Zell-Kontakt infizierte Zellen spezifisch erkennen und zerstören.

Die lymphatischen Organe bieten den Lymphozyten eine optimale Umgebung für ihre Reifung und Spezialisierung. In den primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus) findet die Lymphozytopoese statt. Die sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, Tonsillen und Lymphfollikel der Schleimhäute) werden von den in Knochenmark und Thymus gebildeten Lymphozyten besiedelt. Sie dienen dem Kontakt zwischen den verschiedenen Lymphozytenpopulationen und den Phagozyten, die Antigene präsentieren und damit eine weitere Reifung der Lymphozyten bewirken.

Das Gehirn ist ein „immunpriviligiertes“ Organ. Es besitzt kein lymphatisches System. Die Blut-Hirnschranke wird von den, die Blutgefäße umschließenden Endothelzellen gebildet. Durch Tight junctions bilden sie eine Barriere für größere Moleküle, Proteine und Immunzellen. Außerdem werden fast keine MHC Moleküle exprimiert (Wekerle, 2002), sie scheinen aber durch proinflammatorische Mediatoren (z.B. IFN- γ) in bestimmten Zellen induzierbar zu sein (Neumann et al., 1995, 1996). Die Voraussetzung für eine Entzündung des Gehirns ist die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, wodurch sie neben Immunzellen auch für Antikörper durchlässig wird (Filippi et al, 1996, Archelos et al, 1999). Expression von Integrinen wie intercellular adhesion molecule (ICAM) und vascular cell adhesion molecule (VCAM) auf Endothelzellen kann aktivierte Lymphozyten durch Interaktion mit lymphocyte function-associated

antigen-1 (LFA-1) bzw. very late antigen 4 (VLA-4) festhalten (rolling) und eine Diapedese ermöglichen (Wingerchuk et al., 2001).

Die Kommunikation zwischen Gehirn und Immunsystem erfolgt bidirektional. So basiert die Gehirn-Immunsystem-Kommunikation auf einem Fluss von afferenten Signalen vom Immunsystem zum Gehirn, der u.a. durch Zytokine übermittelt wird, die dann efferente immunregulatorische und neuroendokrine Antworten auslösen (Besedovsky HO, del Rey A, 1996).

Zytokine können auch über selektive Transportmechanismen die Blut-Hirn-Schranke passieren und so in das Gehirn gelangen (Banks et al., 1996). Ein weiterer Weg ist die durch Zytokine vermittelte Induktion von Intermediärprodukten (z.B. Prostaglandine durch IL-1) an der Blut-Hirn-Schranke, die dann in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und Effekte am Zielort hervorzurufen (de Vries et al., 1995). Darüber hinaus wird angenommen, dass Zytokine der Peripherie afferente Signale indirekt über neuronale Wege ins Gehirn leiten. Das geschieht über die Stimulation sensibler Anteile des Nervus vagus, über abdominale Paraganglien oder andere abdominelle Fasern in Nachbarschaft Zytokin-produzierender Zellen (del Rey et al., 2007). Auch wenn es Zytokinen kaum möglich ist aus der Peripherie direkt ins Gehirn zu gelangen, so können sie im Gehirn selbst produziert werden und spielen dort eine wichtige immunregulatorische, physiologische und neuromodulatorische Rolle. Zusammengefasst gibt es eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem Gehirn und dem Immunsystem, die initial entweder durch Stimulisation des Immunsystems oder durch Stimulisation des Gehirns (psychologische) induziert werden kann.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, welchen Einfluss Immunstimuli auf ZNS-Zytokine und zentrale monaminerge Neurotransmitter haben und welche Rolle. Veränderungen dieser zentralen Moleküle für eine periphere Entzündung spielen. Allerdings gibt es nur sehr wenige Studien, die zentrale Immunmediatoren und Neurotransmitter während chronischer Krankheiten untersucht haben. Es konnte gezeigt werden, dass nach kurzfristiger peripherer Immunstimulation nicht nur zentrale neuronale Strukturen stimuliert, sondern

auch Zytokine in verschiedenen Hirnregionen verstärkt exprimiert werden (Maier, 2003). Eine ganze Reihe dieser so genannten „brain-borne“ Zytokine, darunter IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF, werden in geringen Mengen konstitutiv im Gehirn exprimiert und Nervenzellen exprimieren sowohl unter normalen Bedingungen als auch nach Stimulation Rezeptoren oder die mRNA für viele dieser Zytokine. Dabei sind Astrozyten, Mikrogliazellen und bestimmte Neuronen in der Lage Zytokine zu produzieren (del Rey et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) in geringen Dosen, die die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, zu einem starken Anstieg der Expression von IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF im Gehirn führt (Pitossi et al., 1997).

Das Ausbleiben einer Abstoßungsreaktion im ZNS wurde zunächst mit den zwei herausragenden morphologischen Besonderheiten des ZNS erklärt: Der efferente Arm des Immunsystems sollte durch die Existenz der Blut-Hirn-Schranke und der afferente Arm durch das Fehlen klassischer lymphatischer Drainagewege blockiert sein (Medawar 1948). Das Immunprivileg des ZNS, definiert als Toleranz gegenüber Transplantaten (Billingham and Boswell 1953), wurde deshalb oft mit einem Status immunologischer Ignoranz gleichgesetzt (Bechmann, 2005).

Dass die Blut-Hirn-Schranke keine Barriere ist, um Leukozyten vom Eindringen in das ZNS abzuhalten, konnte mittlerweile mehrfach dargestellt werden. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einer ständigen Patrouille von Lymphozyten im intakten ZNS (Hickey et al. 1991, Wekerle 1993, Hickey 2001). Aber auch während einer Entzündung erhöht sich die Anzahl anwesender Lymphozyten stark (Qing et al. 2000). Bisher wurden drei wichtige Wege erkannt, auf denen Lymphozyten vom Blut in das ZNS gelangen können (Ransohoff et al. 2003, Engelhardt and Ransohoff 2005): Über den Plexus choroideus in den Liquor, über den subarachnoidalen Raum und über perivaskuläre Räume. Mit Hilfe von Mauschimären konnten Hickey und Kamura (1988) zeigen, dass aus dem Blut stammende Monozyten in der Lage sind, sich in perivaskulären Räumen niederzulassen. Unter physiologischen

Bedingungen zeigt sich eine langsame Ergänzung residenter Mikroglia durch aus Blut stammenden monozytären Zellen (Lawson et al. 1992, Priller et al. 2001). Auch unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer Erhöhung der Leukozytenzahl im ZNS (Soares et al. 1995, Hausmann et al. 1999).

1.3.1 Immunkompetente Zellen

Mikrogliazellen sind immunkompetente Zellen im Gehirn, deren Hauptfunktion in der Reaktion auf jegliche Form von Veränderung im lokalen Milieu liegt. Circa 15% der Zellen im ZNS sind Mikrogliazellen (Streit und Kincaid-Colton, 1995). Dabei zeigten Studien zur lokalen Verteilung, dass der Anteil von 0,5 bis 16,6% in verschiedenen Bereichen des Parenchyms variiert (Mittelbronn et al., 2001). Des Weiteren besitzen Mikrogliazellen/Makrophagen die Fähigkeit zur Immunregulation durch Kooperation mit Lymphozyten über eine Antigenprozessierung und Antigenpräsentation. Mikrogliazellen und Makrophagen greifen in alle Stadien der Neuroinflammation ein und sind maßgeblich an der Auslösung, der Regulation, aber auch an der Suppression der Neuroinflammation beteiligt. Außerdem sind sie in der Lage, die notwendigen Heilungsprozesse im Gewebe nach einer Entzündung zu unterstützen.

Reaktive Astrozyten, wie man sie bei MS und anderen neurodegenerativen Erkrankungen findet, sind in der Lage Perforin, ein charakteristisches Produkt cytotoxischer T-Zellen, zu exprimieren (Gasque et al., 1998). Des Weiteren sind die Gliazellen zur Synthese von Komplementfaktoren und nach Aktivierung auch zur Bildung von Cytokinen fähig (Gasque et al., 1993 und 1995; Morgan et al., 1996; Zhao und Schwartz, 1998). In der Tat findet man Komplementaktivierung im Gehirn bei bestimmten entzündlichen, degenerativen und traumatischen Prozessen. Als Hauptquelle der Komplementfaktoren wurden die Astrozyten identifiziert (Levi-Strauss und Mallat, 1987; Gasque et al., 1995; Shrikant und Benveniste, 1996). Komplementrezeptoren und Regulatoren wurden hier und ebenfalls auf anderen Zellen des ZNS gefunden (Gasque et al., 1995). Diese Befunde sprechen für eine Aufgabe des Komplementsystems und der Komplementregulatoren wie z.B. FH bei der Im-

munabwehr des ZNS, legen aber ebenso eine Beteiligung an pathologischen entzündlichen Prozessen nahe.

1.3.2 Dendritische Zellen

Die DZ stellen eine heterogene Familie von Zellen dar, die in ihrer Gesamtheit ein Netzwerk von Wächterzellen des Immunsystems bilden. Sie stammen von Leukozyten-Vorläuferzellen ab, die aus dem Knochenmark auswandern und über den Blutkreislauf in periphere Gewebe gelangen (Zhou LJ et al., 1996). Nach Lokalisation und Rezeptorexpression werden die DZ in epitheliale (Langerhans Zellen), interstitielle, Monozyten generierte DZ (MGDZ), CD11- negative- und CD11-positive DZ in den Reifezentren der Lymphknoten (LK) unterteilt (Caux C et al., 2000; Randolph GJ et al., 1999, Häusser G et al., 1997).

Des Weiteren kommen DZ in den Meningen und dem Plexus choroideus vor. Es gelang auch der Nachweis von DZ im Liquor (Link H et al., 1999; Pashenkov M et al., 2001), wobei diese in nur verschwindend geringer Zahl im Liquor von gesunden Menschen, aber in erhöhter Anzahl im Liquor von Patienten mit MS vorkamen. Ebenfalls zeigen Untersuchungen Ähnlichkeiten der zerebelaren Mikroglia (z.B. CD11+) mit den DZ auf (Pashenkov M et al., 2001).

1.3.3 Das Komplementsystem

Die Reaktionswege des Komplementsystems laufen in Form von biochemischen Kaskaden ab, die jeweils durch unterschiedliche Aktivatoren in Gang gesetzt werden und in eine gemeinsame Endstrecke münden.

Derzeit sind drei Wege der Komplementaktivierung bekannt: 1. der alternative Weg (Vollmar et al. 2005), durch den das Komplementsystem stets auf geringem Niveau eingeschaltet ist, 2. der klassische Weg, der Antikörper-abhängig ist, und 3. der Lektin-Weg, der über Kohlenhydratreste auf Oberflächen vermittelt wird.

Im klassischen Komplementweg spaltet das durch Immunkomplexe aktivierte C1 die Faktoren C4 und C2. Es entsteht die C3 Konvertase des klassischen Wegs. Im MBL-Aktivierungsweg wird durch analoge Spaltung von C4 und C2 eine identische C3-Konvertase gebildet. Diese Analogie ist darin begründet, dass die MBL-assoziierte Serinprotease MASP-2 die gleiche Wirkung ausübt wie der Faktor C1 im Klassischen Aktivierungsweg. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass der MBL-Weg zu seiner Aktivierung keine Immunkomplexe benötigt. Im alternativen Reaktionsweg wird Faktor B von bereits vorhandenem C3b gebunden, es entsteht die C3 Konvertase des alternativen Weges. Aktivierende Lipopolysaccharide (LPS) auf Oberflächen vermitteln den Vorgang und aktivieren dadurch den alternativen Reaktionsweg. Die C3 Konvertasen beider Reaktionswege binden nach Spaltung von C3 weiteres C3b. So entstehen die C5-Konvertasen des klassischen und des alternativen Reaktionswegs. Die beiden soeben entstandenen C5-Konvertasen spalten jeweils den Faktor C5, dadurch entstehen die Fragmente C5a und C5b. In der gemeinsamen Endstrecke der Komplementkaskade lagern sich nun die Faktoren C6, C7, C8 und C9-Polymere an C5b an; es entsteht der Membranangriffskomplex, auch als MAC bezeichnet.

1.3.4 Immunglobuline

Die Immunglobuline sind Glycoproteine, die innerhalb der humoralen Immunabwehr bei Wirbeltieren von B-Lymphozyten als Antwort auf Fremdmoleküle oder einen eindringenden Organismus gebildet werden (Roitt et al. 1995). Sie binden oft an das Fremdmolekül oder an die Zelle außerordentlich fest und aktivieren diese dadurch oder kennzeichnen sie für den Abbau durch Phagozyten oder Komplementinduzierte Lyse. Die Immunglobuline besitzen also die Eigenschaft, zwischen verschiedenen Molekülen unterscheiden zu können. Dabei bezeichnet man Moleküle, die eine Immunantwort hervorrufen, als Antigene (Alberts et al. 1995).

Ein Antigen regt meist nur eine geringe Zahl von Lymphozyten mit jeweils passenden Rezeptoren zur Vermehrung an (Selektion). Ein Teil der Zellen

bleibt als Gedächtniszellen für eine beschleunigte und verstärkte Reaktion bei einer Zwischeninfektion mit demselben Erreger erhalten.

Die variable Region und damit die Antigen-spezifität der Immunglobuline einer reifen B-Zelle ist nach Ende der somatischen Rekombination weitgehend festgelegt durch die Auswahl je eines V-, D-, J-Segmentes und das Entfernen der übrigen Segmente. Nur durch die somatische Hypermutation sind noch Veränderungen möglich. Dagegen besitzt der reife, naive B-Lymphozyt noch alle konstanten Regionen und kann damit theoretisch alle Immunglobulinklassen bilden. Die Gensegmente $C\alpha$, $C\gamma$, $C\delta$, $C\epsilon$ und $C\mu$ für die konstante Region der schweren Kette liegen hinter dem JH-Segment. Sie kodieren jeweils für eine Immunglobulinklasse: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Es gibt vier Segmente für $C\gamma$ (1-4) und dementsprechend auch IgG1 – IgG4 sowie zwei Segmente für $C\alpha$ mit IgA1 und IgA2. Am 5' Ende jedes Segments findet sich eine regulatorische DNA-Sequenz (Schalterstelle), die eine Rolle beim Klassenwechsel spielt. Am 3' Ende liegt je ein Exon für die membranständige und die sezernierte Form des Immunglobulins (Cooper 1987). Vor Antigenkontakt werden jedoch nur die $C\mu$ - und $C\delta$ -Gene transkribiert. Der reife, naive B-Lymphozyt exprimiert zunächst gleichzeitig IgM und IgD auf seiner Oberfläche. Für IgM wird das $C\mu$ -Segment alleine transkribiert, für IgD das $C\mu$ - und $C\delta$ -Segment zusammen; danach wird das $C\mu$ -Segment beim Spleißen entfernt (Han et al. 2004; Blom et al. 2006; Geisberger et al. 2006).

Erst nach Antigenkontakt ist ein Klassenwechsel möglich. Dabei wird die variable Region des Immunglobulins durch Ausstülpungen zwischen den Schalterstellen mit einer anderen konstanten Region verbunden. Aus der ausgestülpten DNA entsteht ein zirkuläres Fragment, das dann abgebaut wird (Maizels 2005). Damit ist die Immunglobulinklasse für den B-Lymphozyten endgültig festgelegt. Er kann sich zur Plasmazelle entwickeln und den entsprechenden Antikörper sezernieren. Durch Zytokine werden die Transkription der konstanten Region und damit das Immunglobulinmuster geändert. Normalerweise ist IgG2 das häufigste Immunglobulin im Blut. Nach Einfluss von z.B. IL-4 wird in den stimulierten Zellen entweder IgG4 beim Menschen

(IgG1 bei der Maus) oder IgE gebildet (Jumper et al. 1994). Jede Immunglobulinklasse hat ihre eigene Abwehrfunktion und ihren bevorzugten Wirkungs-ort.

1.3.4.1 Immunglobulin G (IgG)

Der bekannteste Vertreter aus der Familie der Immunglobuline ist das Immunglobulin G (IgG) mit einem Molekulargewicht von ca. 150 000 g/mol (Abb.1).

Die Immunglobuline der Gruppe G umfassen vier Subklassen, die als IgG 1, IgG 2, IgG 3 und IgG 4 bezeichnet werden. Sie zeigen eine ähnliche Proteinstruktur, sind jedoch durch unterschiedliche Gene kodiert. Dadurch ergeben sich unterschiedliche Effekte bei der Komplementbindung, Placentapassage und Fc-Rezeptor-Bindung. Die Bildung von IgG- Subklassen beruht auf einem Wechsel des Isotyps, der unter der Einwirkung von Cytokinen und der Expression der CD 40 – Liganden auf einer T- Helferzelle stattfindet (Jane-way, 2009).

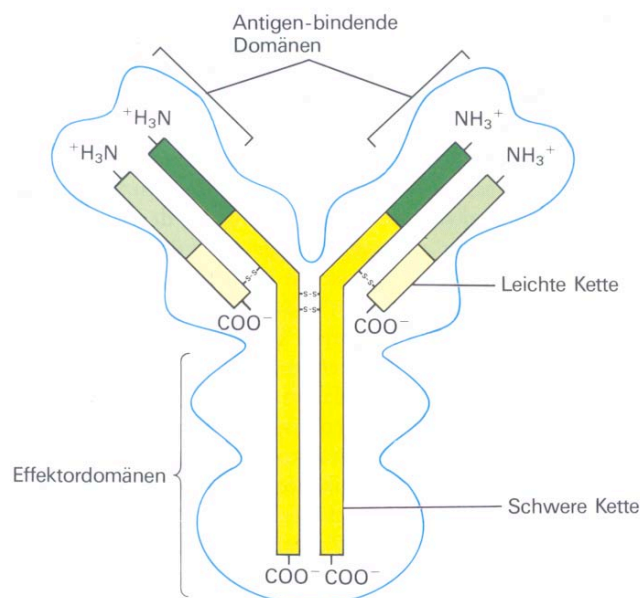


Abb 1 Schematische Darstellung eines IgG Moleküls (nach Lodish et al. 1996,).

Ein IgG-Molekül besteht aus zwei identischen leichten Ketten (L- Ketten) mit ca. 220 Aminosäurenresten und zwei identischen schweren (H-Ketten) Polypeptidketten mit ca. 450 bis 600 Aminosäuren, die durch Disulfidbrücken kovalent und über nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verknüpft sind (Lodish et al. 1996). An die H-Ketten ist jeweils eine Kohlenhydratkette kovalent gebunden. Die typische Y-Form des Moleküls kommt durch einen „Knick“ in der Mitte der schweren Kette zustande. Die Stelle des Antikörpers, an welcher das Antigen gebunden wird, heißt Paratop und ist komplementär zur antigenen Determinanten (Epitop) auf der Oberfläche des Antigens (Janeway & Travers 2009). Ein IgG-Molekül besitzt zwei identische Paratope (bivalent), wobei ein Antigen ein (monovalent), mehrere (multivalent) gleiche oder auch mehrere unterschiedliche Epitope besitzen kann. Die Paratope werden von variablen Domänen (V) am N-terminalen Ende der L- und der H-Ketten gebildet. In jeder V-Region gibt es drei Bereiche mit hypervariabler Aminosäuresequenz, die als „complementary determining regions“ (CDR) bezeichnet werden. Jede dieser sechs CDRs besteht aus ca. 50 Aminosäuren.

1.4 Autoantikörper

Im menschlichen Blut finden sich ständig Bruchstücke von abgestorbenen oder nicht mehr funktionstüchtigen Zellen. Normalerweise werden sie vom Immunsystem als körpereigene Stoffe erkannt und aus dem Blutkreislauf entfernt. Anders als bei fremden, eingedrungenen bakteriellen oder viralen Erregern werden sie toleriert und lösen keine Immunreaktion aus.

Aus bisher unbekannter Ursache können körpereigene Stoffe (Zellreste, Bruchstücke) aber trotzdem Auslöser für eine Immunreaktion sein. Man bezeichnet sie als Autoantigene. Sie werden vom Immunsystem behandelt wie fremde Erreger, und es werden Antikörper gegen sie gebildet.

Unser Immunsystem benutzt hierfür die gleichen Mechanismen wie für die übliche Antikörperproduktion. B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen nehmen die Autoantigene auf und treten miteinander in Kontakt. Über direkte Zell-Zell-

Kontakte und freigesetzte Botenstoffe wird die B-Zelle dann zur Produktion von Autoantikörpern angeregt. Im Fall der Autoimmunreaktion werden Autoantikörper gegen Bestandteile der Zellwand abgestorbener Zellen, gegen DNA-Fragmente oder gegen körpereigene Proteine gebildet.

An bestimmten Stellen des Körpers transplantierte Gewebe lösen keine Immunreaktionen aus. Solche immunologisch privilegierten Regionen sind zum Beispiel die vordere Augenkammer, der Hoden oder das Gehirn (Alison J et al., 1997). Ursprünglich glaubte man, diese Sonderstellung resultiere daraus, dass Antigene den betreffenden Bereich nicht verlassen und somit keine Antworten induzieren können. Spätere Untersuchungen zeigten, dass Antigene sehr wohl aus immunologisch privilegierten Regionen hinausgelangen und auch mit T-Zellen interagieren, aber statt eine zertörende Immunantwort auszulösen, induzierten sie eine Toleranz oder eine Reaktion, die das Gewebe nicht schädigt (Streilian JW 1997).

Immunologisch privilegierte Regionen sind in dreierlei Hinsicht ungewöhnlich. Erstens verläuft die Kommunikation zwischen ihnen und dem Rest des Körpers atypisch, da die extrazelluläre Flüssigkeit in diesen Regionen nicht durch konventionelle Lymphbahnen fließt. Dennoch können an privilegierten Stellen vorhandene Proteine diese Regionen verlassen und immunologische Wirkungen entfalten. Zweitens werden lösliche Faktoren, wahrscheinlich Cytokine, die den Verlauf einer Immunantwort beeinflussen, in den privilegierten Regionen gebildet und verlassen diese zusammen mit Antigenen. Drittens steht wahrscheinlich durch die Expression des Fas-Liganden in den Geweben der immunologisch privilegierten Regionen ein weiterer Schutzmechanismus zur Verfügung, da Fas-tragende Lymphozyten abgetötet werden wenn sie in diese Bereiche eindringen. Dieser letzte Schutzmechanismus ist noch nicht vollständig entschüsselt, da offensichtlich unter bestimmten Bedingungen die Expression des Fas-Liganden im Gewebe eine Entzündungsreaktion durch neutrophile Zellen hervorruft (Janeway 2009).

1.4.1 Nachweismethoden von Autoantikörper

Der Nachweis von Autoantikörpern im Blut ist für die Diagnose einer Autoimmunerkrankung oft entscheidend. Mit Hilfe von indirekten Immunfluoreszenztests (IIF) auf Gewebsschnitten oder fixierten Zellen kann eine große Vielfalt unterschiedlichster Autoantikörper erfasst werden. Daneben kommen immer häufiger Immunoassays (RIAs und ELISAs etc.) zum Einsatz, mit denen sich gezielt Antikörper gegen definierte Antigene nachweisen lassen (Vincent et al. 2004).

1.5 Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kalium-Kanäle (Kv-Kanäle) bilden die Ionenkanalgruppe mit den meisten bekannten Vertretern. Erstmals phänotypisch postuliert wurden sie im Riesenaxon des Tintenfischs (Hodgkin und Huxley, 1952), die erste Klonierung eines Kv-Gens hingegen gelang 1987 aus der Drosophila Mutante Shaker (Tempel et al., 1987). Heute sind über 40 verschiedene Gene für Kv-Kanäle bekannt. Diese Gene werden in vier Subfamilien untergliedert, entsprechend sechs Drosophila-Genen für spannungssensitive Kalium-Kanäle. Untereinander stimmen die Proteine in ca. 40 % ihrer Aminosäuresequenz überein. Die Säugergene sind den homologen Genen von Drosophila melanogaster zugeordnet worden (Aidley and Stanfield, 1996):

(1) Shaker: Kv 1.1- Kv 1.7

(2) Shab: Kv 2.1- Kv 2.2

(3) Shaw: Kv 3.1- Kv 3.4

(4) Shal: Kv 4.1- Kv 4.3

1.5.1 Struktur und Funktionsmechanismus

K⁺-Kanäle öffnen sich durch eine Änderung des Membranpotentials (Aktivierungsschwelle bei ca. -40 mV).

Die spannungsgesteuerte Kaliumkanäle setzen sich aus vier Untereinheiten (alpha-Untereinheiten) die jedoch nicht, wie bei anderen oligomeren Membranproteinen, über kovalente Bindungen gekoppelt sind. Die Zusammensetzung der alpha-Untereinheiten zu Tetrameren wird von der T1-Domäne, einem zwischen N-Terminus und S1-Segment im Zytoplasma lokalisierten Abschnitt der Polypeptidkette, determiniert.

Die T1-Domäne bestimmen sowohl die Bildung der Tetrameren als auch die Zusammensetzung im Falle von Heteromultimeren (Aidley and Stanfield, 1996, Sheng et al., 1997). Die alpha-Untereinheit der spannungsabhängigen Kv-Kanäle besteht aus sechs helikalen Transmembrandomänen (1-6) mit intrazellulären Carboxyl (C-) und Amino (N-) Termini und besitzt eine Porendomäne zwischen 5 und 6 (1-6, bzw. S1-S6), (Abb. 2).

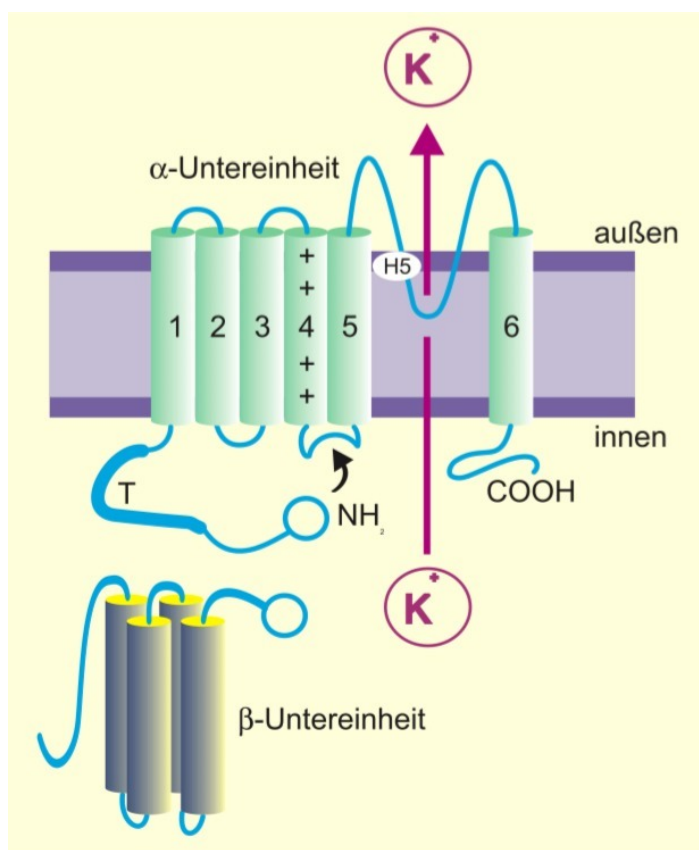


Abb. 2 Strukturelle Elemente der Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle: N-Terminus als Inaktivierungseinheit; 4-Region als Teil des Spannungssensor; 4-5 Loop, der mit dem Inaktivierungspartikel interagiert und die H5-6-Segmente, welche die Kanalpore mit dem Selektivität formen.

Sowohl das COOH, als auch das N-terminale Ende des Kanalproteins befinden sich intrazellulär. Der Abschnitt zwischen 5 und 6, auch SS1-SS2-Loop, H5, oder P-Region genannt, bildet den inneren Anteil der Kanalpore und dient somit als Selektivitätsfilter. Peptidtoxine auf der extrazellulären Membranseite interagieren mit der Porenregion. Die S4 Domäne enthält positiv geladene Aminosäuren, insbesondere Lysin und Arginin (Papazian et al., 1991) und dient als Spannungssensor (Catterall, 1992).

Die Öffnungsphase wird durch N- und C-Typ-Inaktivierung beendet. Bei der N-Typ-Inaktivierung handelt es sich um eine „schnelle“ Inaktivierung. Man spricht hier auch vom „ball-and-chain“-Prinzip, bei dem ein Teil des N-Terminus einem Ball gleich die Pore von innen verschließt. Diese Art der Inaktivierung lässt sich daher durch Blockade der inneren Pore, beispielsweise durch interne Tetraethylammoniumionen (TEA), unterdrücken (Choi et al., 1991).

Hiervon völlig unabhängig läuft die langsame C-Typ-Inaktivierung ab. Sie betrifft die extrazelluläre Seite der Kanalpore und beruht auf einer Konformationsänderung im Bereich des S6-Segments und der Porenregion, welche die Pore von außen verschließt (Rasmusson et al., 1998).

1.5.2 Akzessorische beta-Untereinheiten

Mit den alpha-Untereinheiten sind bis zu vier weitere Proteine, beta-Untereinheiten genannt, auf der zytoplasmatischen Membranseite assoziiert. Diese enthalten im Gegensatz zu den alpha-Untereinheiten keine Transmembranären Segmente. Bislang sind vier verschiedene beta-Untereinheiten bei den Säugern bekannt: Kv-β1.1, Kv-β1.2, Kv-β1.3 und Kv-β2.1. Sie sind wahrscheinlich an der Modulation der Kanalexpression beteiligt und nehmen zusätzlich Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der Kv-Kanäle (Aidley and Stanfield, 1996). Auch die beta-Untereinheiten besitzen eine „ball-and-chain“-Struktur zur Inaktivierung der integralen alpha-Membranproteine (McCormack et al., 1999).

1.5.3 Bildung von Heteromultimeren

Die Möglichkeit zur Bildung von Heteromultimeren, d.h. Kanälen, zusammengesetzt aus vier differenten alpha-Untereinheiten, vergrößert die Vielfältigkeit der Kaliumkanalfunktion noch einmal erheblich. Es existieren jedoch nur Hybridkanäle mit alpha-Einheiten aus derselben Unterfamilie, eine Kombination aus verschiedenen Subgruppen ist nicht möglich (Aidley and Stanfield, 1996). Heteromultimere sind zum Beispiel nachgewiesen in Neuronen von Mäusen (mKv 1.1 und mKv 1.2) und bei Ratten (rKv 1.1 und rKv 1.4) (Sheng et al., 1997, Wang et al., 1997). Durch die Bildung von Heteromultimeren lässt sich die Kaliumleitfähigkeit der einzelnen Zelle noch individueller modulieren und somit auf die verschiedenen Aufgaben der Zelle in den Organsystem abstimmen.

1.5.4 Der spannungsgesteuerte Kaliumkanal Kv 1.3

Dieser Kaliumkanal kommt wie die anderen Kv-Kanäle nur in relativ wenigen Zellarten vor. Kv1.3 wird hauptsächlich in Lymphozyten exprimiert und daneben noch in Milz, Thymus, Niere, Lunge, Gehirn und in Fibroblasten (Grissmer et al., 1990; Chandy und Gutman, 1995). Eine weitere Besonderheit des Kv1.3-Kanals ist die Tatsache, dass er in Lymphozyten als Homotetramer vorliegt (Grissmer et al., 1990), während er in den anderen Zellen in Heterotetramere eingebunden wird. Ein Angriff auf die Kv1.3-Struktur wird daher Lymphozyten deutlich mehr beeinflussen als andere Gewebe.

1.5.5 Regulation des Kv 1.3

Expression und Funktion der spannungssensitiven Kaliumkanäle werden durch eine Vielzahl an Mechanismen reguliert. Die posttranslationale Modulation des Kv 1.3 durch Proteinkinasen hat Einfluss auf die Stromamplitude, die Spannungsabhängigkeit oder die kinetischen Eigenschaften des Kanals). So enthält die Aminosäuresequenz des Kv 1.3 mehrere potentielle Loci zur Phosphorylierung durch Proteinkinasen wie die Serin-Threonin-Kinasen, die Proteinkinase A (PKA), die Proteinkinase C (PKC) oder die Calmodulin-ab-

hängige Kinase II (CaMK II) (Holmes et al., 1995; Chung and Schlichter, 1997).

Die Phosphorylierung des Kanalproteins führt zu einer Erhöhung der Maximalleitfähigkeit G_{max} . Außerdem findet eine Verschiebung der Aktivierungs- und Inaktivierungsschwelle zu positiven Membranpotentialen statt. Hauptsächlich verantwortlich für die Aktivierung eines normal funktionierenden Kanals ist die Proteinkinase C. Die Proteinkinasen sind hierbei in ein komplexes Regulationsnetzwerk eingebunden. So zeigt die konkurrierende Phosphorylierung zwischen PKA und PKC keine additive Wirkung, man beobachtet statt dessen eine inhibitorische Wechselwirkung, bei der sich die Wirkungen von PKA und PKC gegenseitig aufheben (Chung and Schlichter, 1997).

Es hat sich gezeigt, dass der Kanal in vivo bereits in phosphoryliertem Zustand vorliegt und dass die Phosphorylierung durch die PKC zum Beispiel Voraussetzung für eine normale T-Zell-Funktion ist (Chung and Schlichter 1997).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

LE und RE sind beides Autoimmunerkrankungen des ZNS, die mit der Bildung von Autoantikörpern gegen neuronale Strukturen verbunden sind. So vielfältig wie die verschiedenen Antikörper sind auch die damit assoziierten Symptome. Dieser Antikörperbefund wirft noch eine Reihe offener Fragen auf:

- Gegen welche Antigene sind die Antikörper gerichtet?
- Wo, wann und in welchen Mengen werden sie gebildet?
- Sind sie überhaupt pathogen und wenn ja wodurch?
- Wie tragen sie zu Entstehung, Verlauf und Schwere der Erkrankung bei?

Innerhalb dieses Fragenkomplexes bewegt sich die vorliegende Arbeit. Wir haben Autoantikörper eines Patienten mit LE und einer Patientin mit RE verwendet.

Der experimentelle Ansatz zur Analyse der Aktion der Autoantikörper besteht im Einsatz geeigneter Zellkulturen.

Mit diesem Ansatz können gleich drei wichtige Aspekte der Antikörperwirkung untersucht werden:

- Immunfluoreszenz zum Nachweis eventueller Antikörperbindung- bzw. Identifizierung von Antigenen.
- Untersuchung der Zellphysiologie zum Nachweis eventueller pathogener Funktionsveränderung durch Antikörper.
- Cytotoxizitätstest durch Inkubation mit Antikörpern aus Patientenserum.

1.7 Patientengeschichten

1.7.1 Patient LE (aus der Krankenakte der behandelnden Klinik)

Das Serum, das in dieser Studie verwendet worden ist, stammt von einem 52-jährigen Patienten.

Der zuvor neurologisch und psychisch gesunde Patient erkrankte an einer progredienten Apathie, wechselnd mit Phasen einer vermehrten Aggressivität und Reizbarkeit.

Optische und akustische Halluzinationen, fluktuierende Verwirrheitszustände, amnestische Defizite, ausgeprägte Vigilanzschwankungen, sowie eine Polydipsie mit konsekutiver Hyponatriämie treten im weiteren Verlauf hinzu. Seine Frau beobachtete auffällige Verhaltensstörungen während des Schlafes, wie z.B. Aufschreien, Schlagen und exzessives Strampeln der Beine. Der Patient war sich seines Verhaltens nicht bewusst, aber er berichtete nach dem Erwachen über unangenehme Träume. Über einen kurzen Zeitraum entwickelte er Desorientierung und komplexe, partielle und generalisierte Anfälle, die gelegentlich von Hyperhidrosis und/oder von Piloarrection begleitet wurden. Es gab keine klinische Zeichen von Neuromyotonie.

Die Routinenblutuntersuchungen deckten eine Hyponatriämie auf (niedrigster Wert 118 mmol/l), die durch Polydipsie (bis 10 L pro Tag, normale ADH-Werte, niedrige Serumosmolarität) veranlasst wurde und unter der Beschränkung der Flüssigkeitszufuhr teilweise reversibel war. MRT-Scans des Gehirns zeigten wenige Mikrogefäßverletzungen, es konnte keine Signalveränderung im Mesialschläfenlappen wahrgenommen werden.

Polymerase-Kettenreaktion für Herpes Simplex-DNA, Tests für HIV, Vasculitis, Schilddrüse-Antikörper, Tumormarkierungen und onconeuronale Antikörper waren negativ. Es konnte trotz der vollständigen Untersuchung kein Malignom gefunden werden.

Die Diagnose einer mit VGKC-Antikörpern assoziierten limbischen Enzephalitis konnte anhand des charakteristischen klinischen Verlaufs und mit Hilfe des Nachweises von Antikörpern gegen VGKC gestellt werden. Durch die spezielle Untersuchung der Serumproben, welche eine hohe Konzentration

von Antikörpern gegen VGKC hatten, konnte die Spezifität der Autoantikörper auf drei Kaliumkanaltypen (Kv 1.1, 1.2, 1.6), der so genannten Shaker-Kanal-familie eingeschränkt werden.

Bei der Diagnosenstellung war der Titer der VGKC-AB 2667pM (normal-100pM) im Serum nachweisbar. Sechs Wochen nach Therapiebeginn war eine Konzentration von 694 pM feststellbar. Unter einer immunsuppressiven Therapie (1000mg Prednisolone und Imurek für eine Woche mit absteigendem Schema bis zu einer Erhaltungsdosis von zunächst 40 mg) besserte sich der klinische Zustand innerhalb weniger Tage drastisch. Parallel mit der klinischen Besserung fiel der Titer des Serums VGKC-AB ab. Sechs Monate nach Anfang der Therapie waren keine Antikörper mehr nachweisbar. Zwei Jahre nach initialer Behandlung fühlte sich der Patient gut. Er wurde immer noch immunsuppressiv mit Imurek behandelt, aber er nahm keine Steroide mehr. Er litt immer noch an milden amnestischen Defiziten und manisch depressiven Episoden, die sein Alltagsleben jedoch nicht störten.

Für die Teilnahme an dieser Studie liegt eine schriftliche Zustimmung des Patienten und seiner Frau vor.

1.7.2 Patient RE

(aus: Thilo B, et. al. (2009))

Das Eluat und Serum, das in dieser Studie verwendet worden ist, stammt von einer 20-jährige Patientin.

Die Patientin wurde von einem regionalen Epilepsiezentrum auf die Intensivstation der Klinik für Neurologie UK-SH Campus Kiel mit fokalem motorischem Status Epilepticus verlagert.

Innerhalb von 3 Wochen erlebte sie alle 1-2 min. klonische und tonische Anfälle, der linke Arm und die linke Seite ihres Gesichts wurden auch betroffen, manchmal begleitet durch eine Störung der Aufmerksamkeit und Reaktionsfähigkeit. Die Anfälle äußerten sich meist durch hartnäckige komplex-fokale Anfälle und selten durch generalisierte tonisch-klonische Anfälle. Die ers-

ten Anfälle begannen bei der Patientin im Alter von 13 Jahren, als sie einzelne klonische Zuckungen in ihrem linken Bein erlebte, die sich schnell zu einem fokalen motorischen Status epilepticus mit Beteiligung des linken Arms und der linken Gesichtshälfte entwickelten.

Die MRT Ergebnisse zeigten nach ca. 1 Jahr eine kortikale Schwellung mit erhöhtem Volumen und T2 (FLAIR)-Signal im rechten praezentralen Bereich ihres Gehirns. Eine offene Hirn-Biopsie bestätigte T-Zell-dominierte Enzephalitis mit aktivierten Mikrogliazellen in Knötchen und reaktive Astroglie. Die Diagnose Rasmussen-Enzephalitis wurde gestellt. Während der ersten 5 Jahre ab dem Beginn der Anfälle wurden zahlreiche Therapien mit Antiepileptika versucht.

Ca. 1 Jahr vor der Vorstellung in der Klinik für Neurologie UK-SH, erlebte die Patientin eine Verschlimmerung des fokalen Status epilepticus und generalisierte Anfälle, welche nicht mehr mit Antiepileptika kontrolliert werden konnten. Intermittierende Stabilisierung wurde jedoch mit monatlicher Verabreichung intravenöser Immunglobuline erreicht. 3 Monate vor der Vorstellung in der UK-SH verschlimmerten sich die Anfälle, die nur durch Immunadsorptionstherapie gesteuert werden konnten. Diese neue Therapie führte zu einem anfallsfreien Zeitraum von 7 Wochen, der erste seit der Diagnose. Am Ende dieser Periode verschlechterte sich die Situation innerhalb von Tagen, und führte zum Neuauftreten eines fokalen motorischen Status epilepticus.

Die weitere Behandlung erfolgte in der Klinik für Neurologie UK-SH.

Aufgrund der vorherigen, allerdings kurzanhaltenden, Wirkung der Immunadsorption wurde ein weiterer Zyklus der Immunadsorption über einen Zeitraum von 6 Tagen angeordnet. Nach einer anfänglichen Abnahme der epileptischen Aktivität, tauchte ein fokaler motorischer Status epilepticus innerhalb weniger Tage wieder auf. Ein zweiter Zyklus der Immunadsorption nach 1 Woche wurde durchgeführt, gefolgt von einer Behandlung mit i.v. IG, die zu einer Verringerung der Anfallsaktivität geführt hat. Ein dritter Zyklus der Immunadsorption nach einer weiteren Woche führte schließlich zur Anfallsfreiheit. Um diesen Zustand zu stabilisieren, wurde Rituximab unmittelbar

nach dem dritten Zyklus der Immunadsorption mit 375 mg/m² Rituximab intravenös einmal wöchentlich für 4 Wochen verabreicht. Durchflusszytometrie Kontrolluntersuchungen zeigten eine nachhaltige Reduktion der CD19+ B-Zellen, mit vollständiger Unterdrückung bis Ende der Therapie.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturen

2.1.1 Glioma Zelllinien

Die Zelllinien: A172, T98G, U373 wurden aus einem Glioblastom gewonnen und wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) bezogen. Die Zellen wachsen als Monolayer unter Zugabe von E-MEM.

2.1.2 Fibroblasten Zelllinien

2.1.2.1 L929

Die L929-Zellen (im Text als L929 bezeichnet) sind adhärent wachsende Mausfibroblasten die stabil mit dem Gen für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 der Maus, mKv1.3, transfiziert wurden. Die L929-Zellen wurden als Wirtszellen ausgewählt, weil sie scheinbar selbst keine spannungsabhängigen Kaliumkanäle besitzen (Grissmer et al., 1994), die Messungen an den transfizierten Kv1.3-Kanälen verfälschen könnten.

Alle Zelllinien wurden in einem Zellkultur-Inkubator (Kendro Laboratory Products, Heraeus, Typ: HERA cell) bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte Atmosphäre in Kulturflaschen (Plexiglasflaschen, Sarstedt) mit einer Grundfläche von 25 cm² kultiviert. Für die Kultivierung wurde Fertigmedium (Modified Eagle Medium) mit 10% fötale Kälbeserum (Biochrom AG, 10000U/1000 g/ml, Cat.No. A2213) verwendet. Die Medien wurden im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Das Wechseln des Zellkulturmediums erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag, bis der Boden der Petrischalen (ø 94 mm, Greiner GmbH, Nürtingen) dicht mit Zellen bewachsen war. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml phosphatgepufferter Lösung (PBS=phosphate buffered saline ; [in mM] : 170 NaCl, 3,4 KCl , 10,1 NaH₂PO₄, 2,2 K₂HPO₄, pH 7,4) gespült. Da die Zellen relativ stark am Petrischalenboden hafteten, wurde der konfluente Zellrasen anschließend mit 1 ml Trypsinhaltiger (0,05 % w/v) PBS-

Lösung behandelt, bis eine beginnende Ablösung der Zellen vom Petrischalenboden beobachtet werden konnte. Die Trypsin-PBS-Lösung wurde dann abgesaugt. Die nur noch schwach ädherenten Zellen wurden durch kräftiges Abspülen mit frischem Zellkulturmedium (10 ml) und wiederholtes Aufziehen in eine 1 ml Pipette vereinzelt. Anschließend wurden der gewünschten Verdünnung entsprechende Mengen der entstandenen Zellsuspension aufgenommen und auf neue Petrischalen, in die frisches Zellkulturmedium vorgelegt war, ausplattiert. Dazu wurde 1 Tropfen der entstandenen Zellsuspension in 7 ml vorgelegtes neues Zellkulturmedium pipettiert und anschließend durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturschale gut verteilt.

Für die Patch-clamp-Experimente wurden einige Tropfen der Zellsuspension in 2 ml Medium in Petrischalen ausgesät. Diese Petrischalen mussten vor Beginn der Versuche mindestens vier Stunden im Brutschrank lagern, damit sich die Zellen wieder am Boden anheften konnten. Danach waren die Zellen maximal drei Tage lang für Messungen einsetzbar.

Bei gutem Wachstum und guten Eigenschaften in den Patch-clamp-Experimenten, wurde ein Teil der Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen in Medium mit 10 % DMSO in ein Gefrierröhrchen überführt und dieses in einen speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter gebracht, der auf Eis vorgekühlt war. Dieses Behältnis wurde für mindestens vier Stunden in einer Kühltruhe bei -80°C gelagert, wobei die Zellsuspension bei einer Kühlrate von 1°C pro Minute abkühlte. Anschließend wurden die Gefrierröhrchen in geeigneten Haltern in flüssigen Stickstoff überführt. Auf diese Weise war eine langfristige Lagerung der Zellen möglich.

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt. Alle Materialien und Geräte wurden, bevor sie zum Einsatz kamen, gereinigt bzw. desinfiziert, sterilisiert oder autoklaviert. Das Zellkulturlabor wurde während Ruhezeiten mittels UV-Lampen bestrahlt.

2.1.3 Kontrollserum

Im Rahmen dieser Arbeit wurde humanes Blut von zwei gesunden Personen verwendet. Nach der Blutentnahme wurden die EDTA-Blut Röhrrchen für 3-4 Stunden stehen gelassen und anschließend für drei Minuten zentrifugiert (1500U/min). Das so gewonnene Serum diente als Kontrollserum und wurde bei -21° C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Für die Versuchsreihe wurde das Serum auf 37° C aufgewärmt und die Restmenge wieder eingefroren.

2.1.4 Patientenserum Limbische Enzephalitis

Von der neurologischen Klinik der Universität Kiel wurden 30 ml Serum mit dem Einverständnis des Patienten für unsere Arbeit zur Verfügung gestellt.

Das Serum wurde nach Oxford zu Frau Prof. Dr. Angela Vincent geschickt und auf VGKC-AG untersucht. Es wurden Antikörper gegen Kv1.x (Shaker-Typ) Kaliumkanäle diagnostiziert mit einer Konzentration von 2667 pM.

Für den Test werden aus Kaninchen-Hirngewebe isolierte und mit ¹²⁵I-alpha-Dendrotoxin, das mit den VGKC Subtypen Kv 1.1, Kv 1.2 und Kv 1.6 reagiert, radioaktiv markierte VGKCs verwendet. Das so markierte Protein wird mit Patientenserum inkubiert. Dabei binden die vorhandenen Antikörper an das Protein. Im zweiten Schritt werden die Immunkomplexe mit Hilfe eines antihuman IgG ausgefällt. Die Radioaktivität im Niederschlag ist direkt proportional zur Menge an Antikörpern im Patientenserum.

Die Konzentrationen der Proben werden mit Hilfe der bekannten spezifischen Aktivität des alpha-Dendrotoxins unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung der individuellen Patientenprobe berechnet und in pmol/l angegeben. (Vincent et al 2004.; Tan et al., 2008).

Das Serum wurde in 2 ml Röhrrchen umgefüllt und bei -21°C im Kühlschrank gelagert. Kurz vor dem Versuch wurde die benötigte Menge an Serum auf Zimmertemperatur aufgetaut und anschliessend auf 37°C erwärmt. Die Restmenge wurde wieder bei -21° C im Kühlschrank gelagert.

2.1.5 Eluat Patientin RE

Das Eluat, das in dieser Studie verwendet wurde, ist durch ein Immunadsorptionsverfahren in der Klinik für Neurologie an UKSH gewonnen worden.

Unter Immunadsorption (IA) wird eine Entfernung von Autoantikörpern mittels Adsorption an fixierte Liganden wie Aminosäuren (Phenylalanin oder Tryptophan), Protein A oder antihumanes Immunglobulin verstanden.

IA wird seit 1985 in Deutschland bei Myasthenia gravis angewandt (Hohlfeld et al., 1985) und im Vergleich zur klassischen Plasmapherese als gleich wirksam betrachtet (Yeh und Chiu, 2000). Hierbei werden selektiv Immunglobuline der IgG Unterklassen entfernt. Folglich besteht keine Notwendigkeit zur Substitution von Plasmaproteinen wie Humanalbumin oder FFP; die Gerinnungsverhältnisse werden praktisch nicht gestört. Außerdem kommt es zu deutlich geringeren Volumenschwankungen, was eine längerfristige intensive Reinigung des Plasmas ermöglicht (Koll et al., 2000).

2.2 Patch clamp

Ionenkanäle sind für die Aufrechterhaltung und Veränderung von Membranpotentialen zuständig. Die Untersuchung von Leitfähigkeit, Kinetik und Pharmakologie von spannungs- und ligandengesteuerten membranständigen Ionenkanälen wird durch die Patch-Clamp Technik ermöglicht. Dabei wird mit der Spitze einer sehr fein ausgezogenen Glaspipette entweder eine ganze Zelle (sogenannte Whole-cell Patch) oder nur ein kleines Membranstück (patch = "Flicken") aufgenommen (Hamill et al., 1981). Dabei wird die Pipettenöffnung durch die Zelle bzw. durch das jeweilige Membranstück verschlossen und bildet dort eine elektrische Barriere. Die mit der Pipette verbundene Verstärker-Apparatur registriert den Ionenfluss, der die membranständigen Ionenkanäle passiert.

Diese Methode wurde erst in den 70er Jahren von Erwin Neher und Bert Sackman am Max-Planck-Institut in München entwickelt und stellt ein spezielles Voltage-Clamp-Verfahren (Spannungsklemme) dar. Mit dieser Apparatur

werden Veränderungen des Membranpotenzials ausgeglichen, indem an der Spannungsklemme ein Kompensationsstrom erzeugt wird, der dem transmembranären Strom entgegengerichtet ist. Dabei wird das Membranpotenzial gemessen, mit einer Sollspannung verglichen und bei Abweichungen der entsprechende Kompensationsstrom in die Zelle injiziert. Durch Messung dieses Stroms mit einem speziellen Verstärker kann man den Ionenfluss durch die Kanäle beobachten (Numberger & Draguhn, 1996).

Die Unterdrückung und Filterung von Stör- und Rausch-Signalen stellt die eigentliche technische Schwierigkeit der Patch-Clamp-Technik dar. Wichtig ist, dass zwischen Zellmembran und Pipettenspitze ein hoher elektrischer Abdichtwiderstand besteht. Durch Anlegen eines Unterdrucks im Pipetteninneren kann ein Abdichtwiderstand im G Ω -Bereich („Giga-seal“) erzeugt werden. So kann man bei ausreichender Reduzierung des Rausch-Signals Ionenströme im pico-Ampere-Bereich registrieren (Numberger & Draguhn, 1996).

2.2.1 Patchpipetten

Die Pipetten wurden aus feinen Röhrchen aus Borosilikatglas hergestellt (Vitrex GB150T- 8P, Science Products GmbH). Mit einem vollautomatischen Pipettenziehgerät (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente GmbH) wurden polierte Pipetten hergestellt, die beim Eintauchen in die Badlösung Widerstände zwischen 2 und 5 M Ω aufwiesen; dies entspricht einer Öffnung von etwa 1 μ m. Jede Pipette wurde nur einmal verwendet und jeweils am Tag der Herstellung verbraucht.

2.2.2 Versuchsaufbau

Als Messelektrode wird ein ausgezogenes dünnes Glasröhrchen verwendet: die Patchpipette. Die Pipette wird mit einer definierten Lösung gefüllt und an dem Vorverstärker der Messeinrichtung befestigt. Es wird ein Überdruck angelegt, um die Pipettenspitze vor Verunreinigung zu schützen. Die Zellen befinden sich in der Messlösung in einer kleinen Petrischale auf dem Mikro-

skoptisch. Bei Kontakt der Pipette mit der Messlösung schließt sich der Stromkreis, der Pipettenwiderstand wird bestimmt, und das Offset-Potential, das an den Grenzflächen der Silber/Silberchlorid-Messelektrode entsteht, sowie die Pipettenkapazität müssen kompensiert werden. Durch vorsichtige Annäherung an die ausgewählte Zelle, Lösen des Überdrucks und gegebenenfalls leichtes Ansaugen erhält man eine mechanische Verbindung zwischen Zellmembran und Pipette, die einen sehr hohen elektrischen Widerstand besitzt (mindestens $1\text{ G}\Omega$), den Gigaseal. Man befindet sich nun in der Cell-attached-Konfiguration.

Ausgehend von diesem Punkt lassen sich verschiedene Messkonfigurationen herstellen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden in der Whole-cell-Konfiguration durchgeführt. Diese erhält man, indem man nach erfolgreicher Herstellung des Gigaseals vorsichtig einen Unterdruck an der auf der Zellmembran sitzenden Pipette anlegt und damit das darunterliegende Membranstück zerreißt, so dass ein Zugang zum Zytoplasma entsteht. Zur Darstellung kommen dann die elektrischen Ereignisse auf der gesamten übrigen Membranfläche. Die Lösung in der Pipette ist bei dieser Konfiguration direkt mit dem Zytoplasma der Zelle verbunden, so dass nach kurzer Zeit das Innere der Zelle mit der Pipettenlösung angefüllt ist. Die Pipette enthält daher in der Regel eine standardisierte intrazelluläre Lösung.

2.2.3 Lösungen für die Patch clamp Versuche

Die Badlösung entspricht in ihrer Elektrolytzusammensetzung dem extrazellulären Milieu (Extrazellulärlösung). Die Lösung in der Patchpipette imitiert hingegen das Intrazellulär-Milieu (Intrazellulärlösung). Die Patchpipetten werden mittels eines dünn ausgezogenen Polyethylen-Filamentes mit der Intrazellulärlösung gefüllt. Alle Lösungen wurden mit Aqua bidest. hergestellt und vor ihrer Verwendung mit entsprechenden handelsüblichen Filtern steril filtriert. Es wurden zum Teil Stammlösungen (NaCl : 5M ; KCl : 1M ; CaCl_2 : 1M ; MgCl_2 : 1M ; HEPES : $0,5\text{M}$) verwendet. Beide Lösungen werden auf eine Osmolalität von 285 mosmol eingestellt. Die intra- und extrazellulären Lösungen

wurden bei 2°C bis 8°C gelagert und bis zu 4 Wochen lang verwendet. Ihre genaue Ionenkonzentration ist in Tab.1 angegeben.

Tab.1 Zusammensetzung der intra- und extrazelluläre Lösungen für die Patch clamp Versuche

	Externe Lösung (mM)	Interne Lösung (mM)
NaCl	160,0	-----
KCl	4,5	20,0
KF	----	120
CaCl ₂	2,0	-----
MgCl ₂	1,0	-----
HEPES	5,0	10,0
EGTA	----	10,0
KOH (1N)	----	pH 7,2
NaOH (2N)	pH 7,4	-----
Glucose	----	-----

2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie nutzt die Spezifität von Antikörpern um Antigene sichtbar zu machen, die nach Möglichkeit für ein Gewebe oder einen Zelltyp charakteristisch sein sollten. Die gängigsten Verfahren, um zelluläre Antigene nachzuweisen, umfassen die direkte und die indirekte Methode.

2.3.1 Versuchsaufbau Immunhistochemie

Für jede immunhistochemische Untersuchung wurden die Kv1.3 Zellen, wie unten beschrieben, 4 Tage vorbereitet und am Tag 5 die Ergebnisse fotografiert und dokumentiert. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Reinraumwerkbank durchgeführt.

Am ersten Tag wurde die benötigte Zahl von Petrischalen eingesetzt. 20 Mikroliter Zellsuspension wurden auf Deckgläser (22 mm Firma Fischer Scientific) in der Petrischale verteilt und anschließend mit 2ml Zellkulturmedium

für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. An Tag 3 wurde der Überstand abgezogen und die Deckgläser in der Kulturschale kurz mit PBS gespült. Anschließend wurde mit 0,2Mol Triton X-100 in PBS (Merck), für 15Minuten , permeabilisiert.

Nach einem vorherigen Spülschritt mit reinem Medium wurden die Deckgläser, in eine mit Parafilm ausgelegten Petrischale, gelegt. Nun konnten die Deckgläser mit Kontroll- oder Patientenserum in unterschiedlichen Konzentrationen überschichtet werden, wobei das Parafilm ein Ablauf der Flüssigkeit verhinderte.

Nach einer Inkubationszeit von 24Std im Brutschrank, wurde zunächst wieder mit PBS gespült, bevor eine Fixierung mit 2% Paraformaldehyd (in PBS) für 20 Minuten folgte. Überschüssige Fixierlösung wurde mit spülen einer 0,1Mol Glycin (PBS) Lösung für 5 Minuten, entfernt.

Nach einem weiteren PBS Spülschritt, folgte die Zugabe des 2.AK (Alexa Fluor 488 goat anti-human IgG (H+L) Firma Invitrogen) mit der Verdünnung von 1:1000 in 1% BSA (PBS) für eine Stunde, abgedunkelt und bei Zimmertemperatur (18-22°C).

Nach einem abschließenden PBS Spülschritt der Deckgläser, wurden diese mit einem Einschlussmedium auf Objektträger, mit Merckoglas (Merck) versiegelt. Die Trockenzeit bis zur mikroskopischen Auswertung erfolgte im Kühlschrank (4°C).

2.3.4 Versuchsaufbau Zytotoxizitätstests RE

Am ersten Tag wurden die benötigte Zahl von Petrischalen eingesetzt. 20 Mikroliter Zellsuspension wurden auf Deckgläser (22mm Firma Fischer Scientific) in der Petrischale verteilt und anschließend mit 2ml Zellkulturmedium für 48 Stunden in Brutschrank inkubiert. An Tag 3 wurden die Zellen für 30 min. bei Raumtemperatur mit 150µl 1%, 2%, 5% oder 10% Testserum im Medium verdünnt inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 150µl Complement (15min vorher in 1ml Aqua dest gelöst) dazu pipettiert und für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die so entstandene Suspension

wurde vorsichtig abgezogen und die am Boden der Petrischale haftenden Zellen wurden mit Trypanblau für ca. 30 sec. überschichtet. Nach mehrmaliger Spülung mit PBS wurden die Zellen auf einen Objektträger übertragen und unter dem Mikroskop ausgewertet. Die Ergebnisse wurden direkt am Mikroskop dokumentiert und fotografiert.

3 Ergebnisse

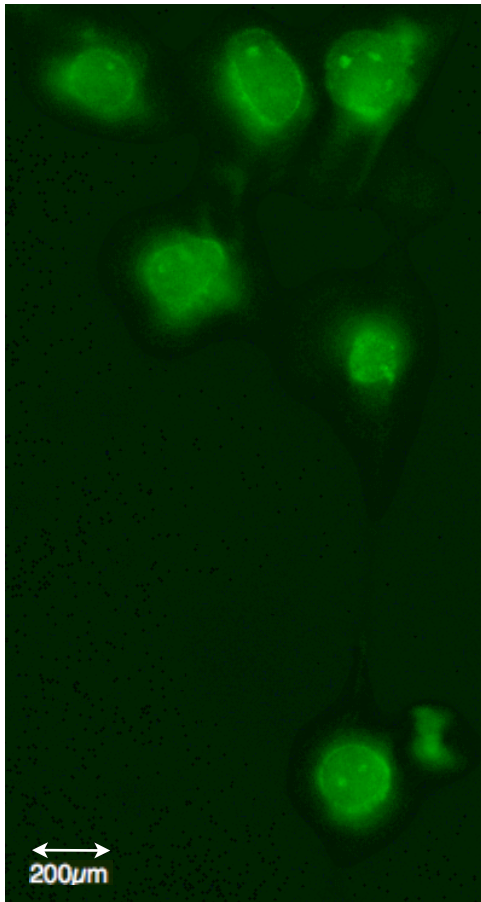
3.1 Limbische Enzephalitis

Im Serum des LE – Patienten wurde durch eine Untersuchung im Labor von A. Vincent in Oxford eine sehr hohe Konzentration an VGKC – Antikörper festgestellt (2667 pM, normal < 100 pM). Diese Antikörper richten sich gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle des Shaker – Typs (Kv1.1 – Kv1.7). Ein positiver Nachweis von Autoantikörpern mit der von Frau Vincent verwendeten Methode (Vincent et al 2004), die eine Dendrotoxin – Bindungsfähigkeit des jeweiligen Kaliumkanals voraussetzt, gelang nur für die Kanaltypen Kv 1.1, Kv1.2 und Kv1.6. Unter den Kanaltypen, die mit dieser Nachweismethode nicht erfasst werden können, befindet sich mit Kv 1.3 ein für das Immunsystem sehr wichtiger Kaliumkanal. Ein Ausschalten dieses Kanaltyps würde zu Einschränkungen von Immunreaktionen (T- und B – Zellaktivierung) führen.

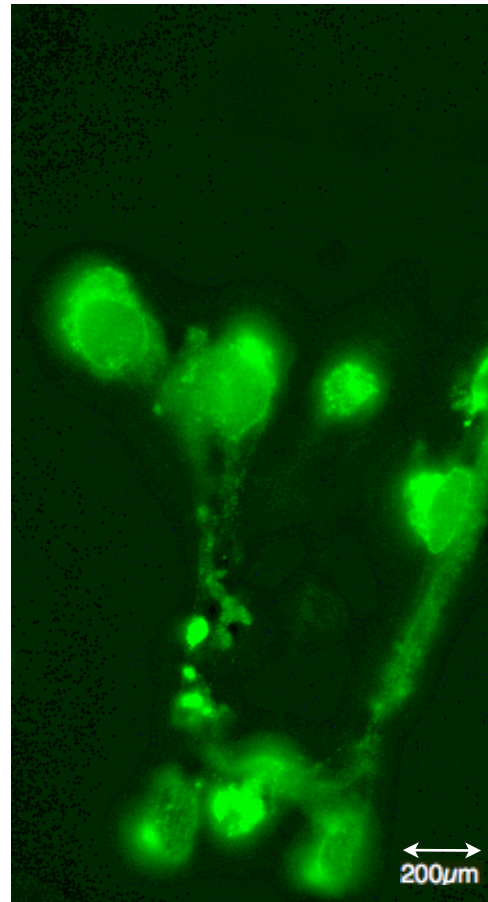
Im folgenden experimentellen Teil wird mit stabil transfizierten Fibroblastenzelllinien gearbeitet, die entweder den Kanaltyp Kv 1.2, oder Kv 1.3 in homotetramerer Form exprimieren.

3.1.1 Immunhistochemieergebnisse

Da Antikörper gegen Kv 1.3 Kaliumkanäle im Patientenserum mit den auf Dendrotoxinbindung basierenden Testsystemen nicht nachgewiesen werden können, soll im folgenden Abschnitt ein monospezifischer Nachweis durch indirekte Immunofluoreszenz unter Verwendung von Kv 1.3 exprimierenden Fibroblasten (Kv 1.3 Zellen) erbracht werden. Als Vergleich („Positivprobe“) werden Kv 1.2 Zellen eingesetzt, da nach Voruntersuchungen das Vorhandensein von Kv 1.2 Antikörpern im Patientenserum als gesichert angenommen werden kann.



a



b

Abb. 3 Kv 1.2 Links (a)Kontrolle, rechts(b) Patienten Serum

Nachdem die Zellen, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, vorbereitet wurden, wurden sie für 24 Stunden mit Kontroll- bzw. Patientenserum (Verdünnung 1:100) inkubiert. Durch einen anti-human Zweitantikörper (Verdünnung 1:1000) wird die Bindung der AK aus den Seren an die Testzellen durch Fluoreszenzfärbung sichtbar.

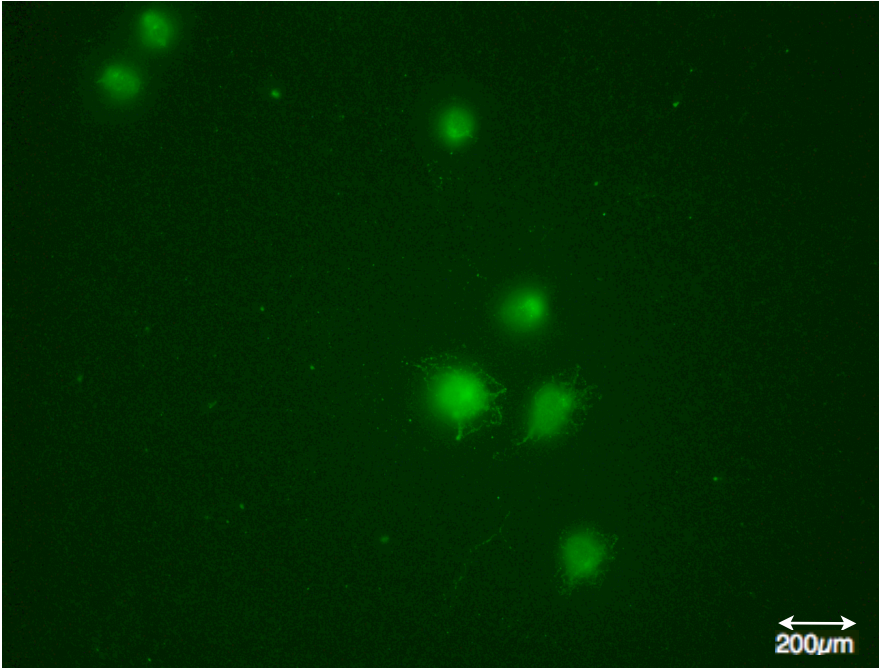


Abb.4 Kv 1.3 Kontrolle

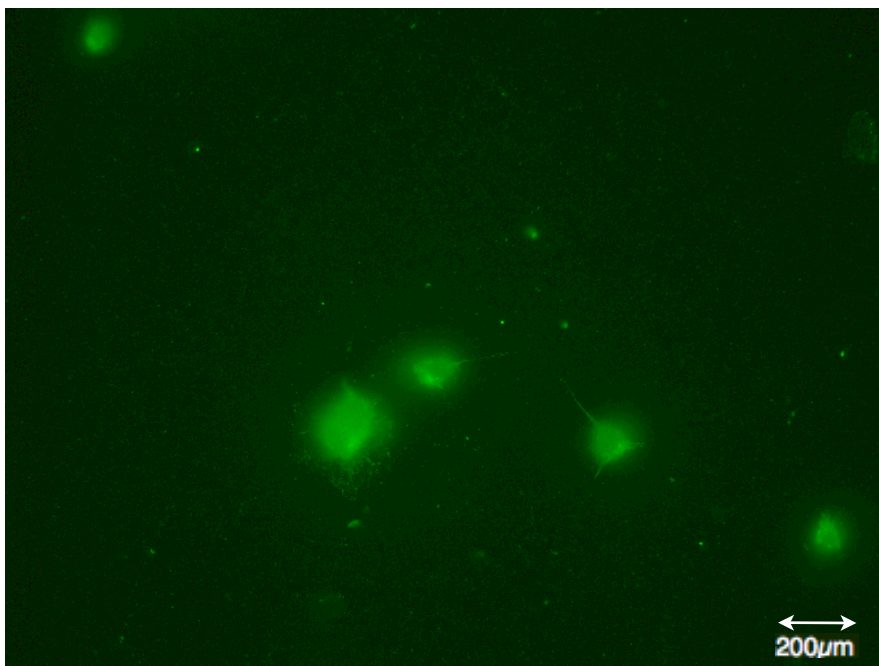


Abb.5 Kv 1.3 Serum

Abb. 3a und 4 zeigen Kv 1.2 und Kv 1.3 Zellen nach Inkubation mit Kontrollserum. Die deutliche Fluoreszenz der Zellen zeigt, dass AK aus dem Serum einer gesunden Person Bindungsstellen an beiden Zelltypen finden. Das ist bei einem Zusammentreffen von tierischen Zellen und humanem Serum zu erwarten, bedeutet jedoch, dass es bei diesem Versuchsansatz keine biologische Nullkontrolle geben kann. Das Vorhandensein zusätzlicher Autoantikör-

per gegen Kaliumkanäle im Patientenserum ist also nur durch eine Intensitätserhöhung der Fluoreszenz nachzuweisen. Dies ist bei den Kv1.2 Zellen der Fall (Vergleich Abb. 3a und 3b); bei den Kv1.3 Zellen nicht (Vergleich Abb. 4 und 5). Eine genauere Lokalisation der zusätzlichen Bindungsstellen an den Kv1.2 Zellen ist hier jedoch nicht möglich.

Obwohl dieser Versuchsansatz wegen der fehlenden biologischen Nullkontrolle nur von eingeschränkter Aussagekraft ist, so deutet nach den Ergebnissen vieles darauf hin, dass sich im Patientenserum, wie erwartet, relevante Mengen von Autoantikörpern gegen Kv1.2 Kaliumkanäle befinden, für Kv1.3 Kanäle jedoch nicht.

3.1.2 Pathogenes Potential der VGKC-Autoantikörper

Gegen Oberflächenantigene neuronaler Zellen gerichtete Autoantikörper können auf zwei verschiedene Arten pathogen wirken; sie können durch Markierung der Zellen zu deren Zerstörung beitragen (Zytotoxizität), oder sie können eine Funktionsänderung oder einen Funktionsverlust der Zellen verursachen. In den folgenden Abschnitten sollen mögliche pathogene Effekte der Autoantikörper aus dem Patientenserum untersucht werden. Hierzu werden wieder die beiden Zelllinien (Kv1.2 und Kv1.3) in einer vergleichenden Untersuchung gegenübergestellt.

3.1.3 Zytotoxizität

Fibroblasten eignen sich sehr gut für Zytotoxizitätstests. Die Zelllinien zeichnen sich durch eine hohe Teilungs- und Ausbreitungsrate aus. Das Wachstum der Fibroblasten wurde 3 Tage unter einem Lichtmikroskop (motic professional, Micro-Optik Industrial Group Co., Ltd.) beobachtet und dokumentiert. Zur quantitativen Beschreibung des Proliferationsprofils wurden die Anzahl und die Ausbreitung der am Petrischalenboden angewachsenen Zellen herangezogen. Hierfür wurde ein Rechenprogramm eingesetzt, das den Prozentsatz der mit Zellen bedeckten Fläche berechnen konnte.

In geringer Dichte (ca. 200 000 Zellen/ml) als Einzelzellen in einer Petrischale ausgesetzt, beginnen die Fibroblasten unter normalen Kulturbedingungen sehr schnell ein Netzwerk zu bilden. Innerhalb weniger Tage (max. 4 Tage) bildet sich eine konfluente Zellschicht am Grunde der Petrischale. Setzt man den Fibroblastenkulturen in einem frühen Stadium humanes Serum zu, so kommt es sofort zu einem erheblichen Zellverlust (Bedeckungsgrad <10%). Das weitere Wachstum der Kulturen ist so stark behindert, dass auch nach längerer Zeit (> 1 Woche) keine Konfluenz erreicht wird. Erst durch eine Verdünnung des Kontrollserums auf 10% konnte der zytotoxische Effekt verhindert werden. Mit diesen Serumkonzentrationen konnte nun untersucht

werden, ob sich im LE – Patientenserum zusätzliche Autoantikörper befinden, die auf Kv1.2 und Kv1.3 Zellen zytotoxische Effekte ausüben können.

Das Erreichen einer konfluenten Zellschicht (Bedeckungsgrad 100 %) wurde als Kriterium einer nicht beeinträchtigten Wachstumsrate verwendet. Diesen Zustand erreichten Kv1.2 – und Kv1.3 – Zellen in Anwesenheit von 10% Kontrollserum innerhalb von 3 – 5 Tagen. Unter dem Einfluss von 10% Patientenserum war ein zytotoxischer Effekt bei den Kv1.2 Zellen deutlich zu erkennen. Bereits nach einem Tag waren viele der eingesetzten Zellen abgestorben. Die Wachstumsrate der übrigen Zellen war stark reduziert und die Kultur erreichte auch nach 6 Tagen nur einen Bedeckungsgrad von < 40%. (Ziaiean, 2008).

Ein derartiger Effekt war bei den Kv1.3 Zellen nicht zu erkennen. Die Zellen erreichten sowohl unter Kontrollserum als auch unter Patientenserum einen Bedeckungsgrad von 100 % (Abb.6 und 7).

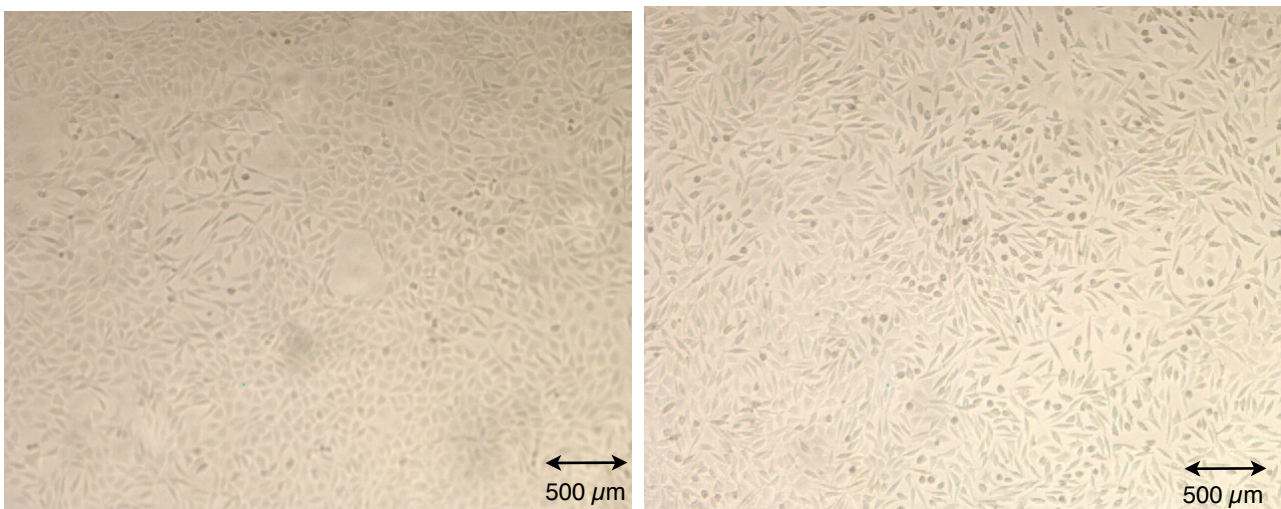


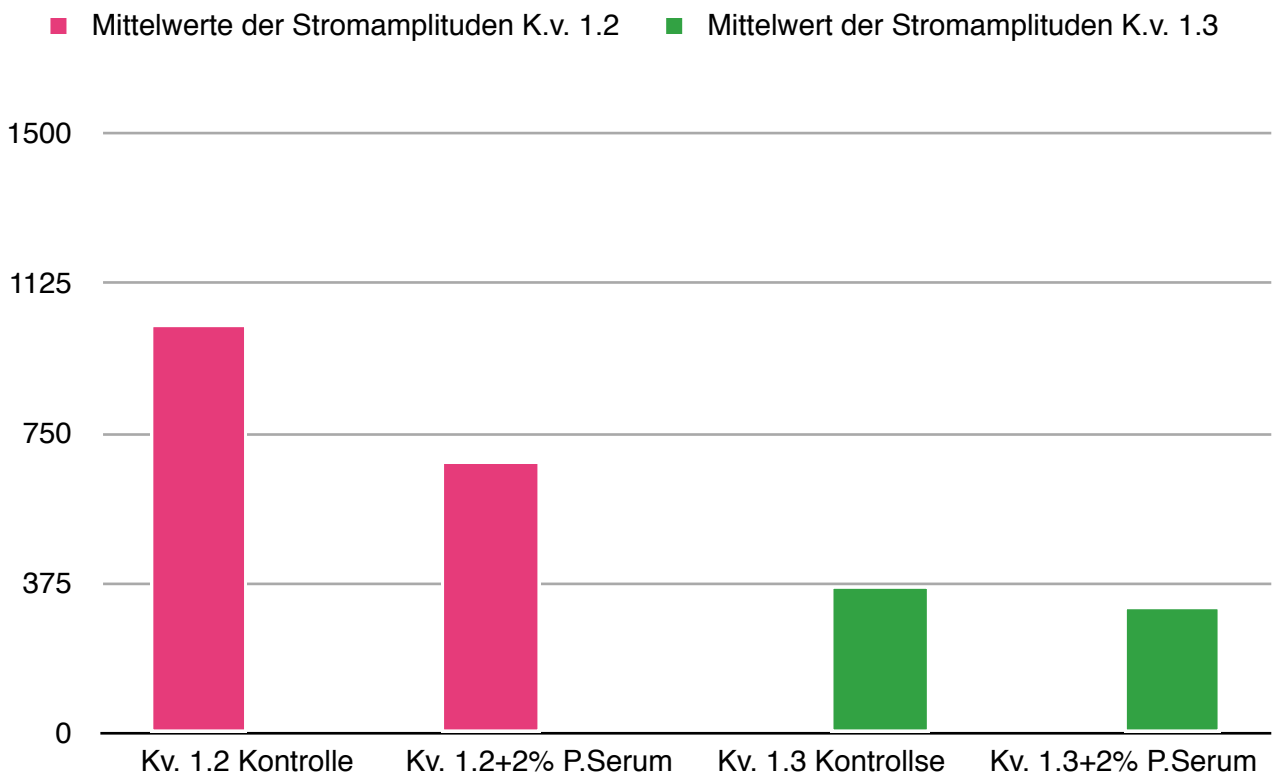
Abb 6 (Links) K.v. 1.3 Tag 6 Inkubation mit Kontrollserum 10%,
Abb.7 (Rechts) Tag 6 Inkubation mit Patientenserum 10%,

3.2 Auswirkung auf die Zellfunktion

Unterhalb der Schwelle zur Zytotoxizität und zum Zelltod können neuronale Autoantikörper durch Bindung an Oberflächenantigene zu Funktionsänderungen oder zum Funktionsverlust der betroffenen Zellen führen. Das würde sich im Falle der VGKC-AutoAK als messbare Änderung der Kaliumleitfähigkeit der Zellmembran auswirken. Eine geeignete Methode um derartige Effekte zu messen, ist die Patch-clamp Technik. Durch sog. Ganzzellaufnahmen kann der gesamte Ionenstrom durch die Zellmembran dargestellt werden. Im Falle der Kv1.2 und Kv1.3 Zellen, die ausschließlich Kaliumkanäle exprimieren, handelt es sich demnach um einen Kaliumstrom, dessen Amplitude repräsentativ ist für die Gesamtzahl aller funktionsfähigen Kaliumkanäle.

Um derartige Messungen ohne vorherige Zellschädigungen auch in Anwesenheit von Patientenserum durchführen zu können, muss die Serumkonzentration erneut herabgesetzt werden. Bei einer Reduktion der Konzentration auf 2% überleben auch Kv1.2 Zellen in Patientenserum ohne sichtbare Schäden für mehrere Tage.

Die funktionsverändernde Wirkung von VGKC-AutoAK soll im Folgenden wieder als Vergleich zwischen Kv1.2 und Kv1.3 Zellen untersucht werden. Die Zellen werden dazu 3 Tage lang mit 2% Kontroll- bzw Patientenserum inkubiert. Nach dieser Zeit wird unter Standardbedingungen die Kaliumstromamplitude der Zellen gemessen. Die Zellen werden dazu bei einem Potential von -80 mV gehalten. Mit einem depolarisierenden Impuls auf 20 mV werden die Kaliumkanäle geöffnet. Die Amplitude des resultierenden Auswärtsstroms wird am Ende des Impulses gemessen (Tab.2).



Tab.2

Kv 1.2 Kontrolle ohne Serum (N=26 1022 pA +/- 72)

Kv 1.2 +2% Patientenserum Tag 3 (N=24 680 pA +/- 76)

Kv 1.3 Kontrolle ohne Serum (N=11 368 pA +/- 128)

Kv 1.3 +2% Patientenserum Tag 3 (N=10 317 pA +/- 112)

Für Kv1.2 Zellen gibt es bereits Befunde aus unserem Labor (Ziaiean, 2008). Eine Inkubation dieser Zellen mit Patientenserum bewirkte eine Abnahme der Stromamplitude auf 55% des Kontrollwertes (Tab.2, rote Balken). Wenn man diese Messungen an Kv1.3 Zellen unter den gleichen Bedingungen durchführt, stellt man fest, dass die mittlere Kaliumstromamplitude unter Kontrollbedingungen kleiner ist als bei den Kv1.2 Zellen. Das bedeutet, dass die Kv1.3 Zellen weniger Kanäle exprimieren, die Kanaldichte bei gleicher Zellgröße also kleiner ist. Eine deutliche Abnahme der Kaliumströme nach dreitägiger Einwirkung von Patientenserum, wie bei den Kv1.2 Zellen, ist jedoch nicht festzustellen. Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde aus den Untersuchungen zur AK-Bindung und zur Zytotoxizität aus den vorhergehenden Abschnitten.

3.3 Rasmussen Enzephalitis

Die RE Antigene sind im Gegensatz zu den LE Antigenen, bei der mit den VGKC-Komplex Antikörpern eine charakteristische Gruppe von Autoantikörpern vorliegt, weitgehend unbekannt. Zum Nachweis von RE-Autoantikörpern ist also die Verwendung eines spezifischen Autoantigens nicht möglich. Das hat uns dazu gebracht, für den zweiten Teil dieser Arbeit einen anderen experimentellen Ansatz zu wählen. Den RE-Autoantikörpern wurden nicht Zelllinien mit spezifischen Antigenen, sondern spezielle Zellen mit ihrem natürlichen Spektrum an potentiellen Antigenen als Ziele angeboten. Als Zielzellen kommen sowohl Neurone, als auch Astrozyten in Frage, da beide Zellgruppen während einer Autoimmunreaktion bei RE-Patienten angegriffen und zerstört werden. Bei der Vielfalt an funktionellen und lokalen Differenzierungen von Nervenzellen erschien es sinnvoll Astrozyten als einheitliche Zellgruppe für die folgenden Experimente zu verwenden.

Antikörper der RE-Patientin standen für unsere Untersuchungen in zwei verschiedenen Lösungen zur Verfügung:

- als Serum, entnommen während verschiedener Klinikaufenthalte der Patientin

- als Eluat eines Immunadsorptionsverfahrens, das während einer akuten Krankheitsphase der Patientin durchgeführt wurde.

Beide AK enthaltende Lösungen haben für die durchzuführenden Untersuchungen verschiedene Vor- und Nachteile.

Der Vorteil des Eluats ist, dass es im akuten Krankheitsstadium entnommen werden konnte. Es enthält vermutlich Autoantikörper in maximaler Konzentration und in großen Mengen. Der Nachteil des Eluats ist, dass kein Kontrolleluat zur Verfügung steht.

Der Vorteil des Patientenserums ist, dass es Komplement enthält und somit sehr gut geeignet ist für die Zyotoxizitätstests. Eine geeignete Negativkontrolle ist das Serum von gesunden Patienten. Der Nachteil des Patientenserums ist, dass kleine Mengen des Serums zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden und diese wahrscheinlich unterschiedliche Autoantikörper

per-Konzentrationen haben. Dadurch ist kein Vergleich der Konzentration möglich.

3.3.1 Antikörperbindung an Astrozyten

Für die Untersuchungen zur AK-Bindung wurden Primärkulturen von Astrozyten der Ratte verwendet, die uns Prof. Lucius (Anatomisches Institut) zur Verfügung gestellt hatte. Der technische Ablauf entsprach dem der Experimente mit Fibroblasten aus Kap. 3.3. Die Astrozyten wurden für 24 Stunden mit dem Eluat der RE-Patientin (Verdünnung 1:100) inkubiert. Da Eluat einer gesunden Person nicht zur Verfügung stand, wurde humanes Serum (1:100) als Kontrolle verwendet. Eine biologische Negativkontrolle ist auch hier wegen der Verwendung von Zellen und Serum der unterschiedlichen Spezies nicht möglich.

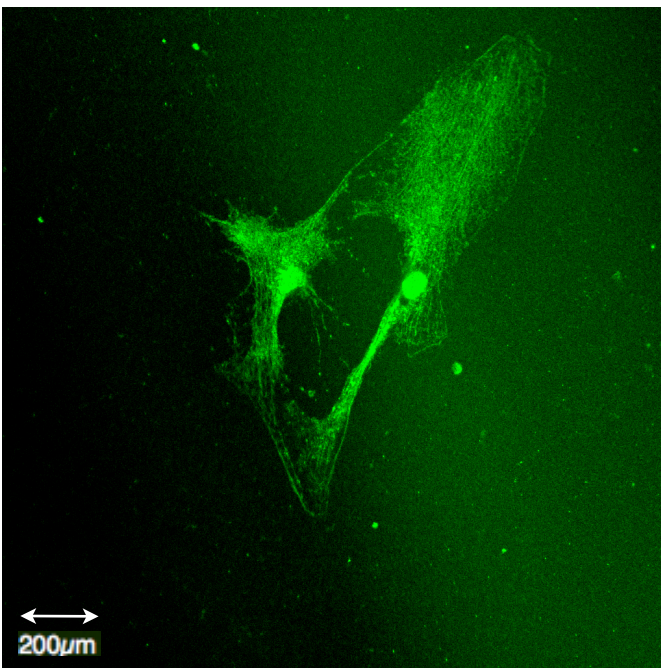


Abb.8 Astrozyt Kontrolle

Abb. 8 zeigt einen Astrozyten inkubiert mit humanem Kontrollserum. Im Gegensatz zu den Anfärbungen bei Fibroblasten, sind bei den großen flach auswachsenden Astrozyten die angefärbten Zellstrukturen (interspezifische Antigene) deutlich zu erkennen.

Durch humane Antikörper werden in Rattenastrozyten angefärbt: Kerne (schwach), Endoplasmatisches Retikulum (schwach), saures Gliafaserprotein (stark), keine randständigen Strukturen. Zellgrenzen sind praktisch nicht zu erkennen.

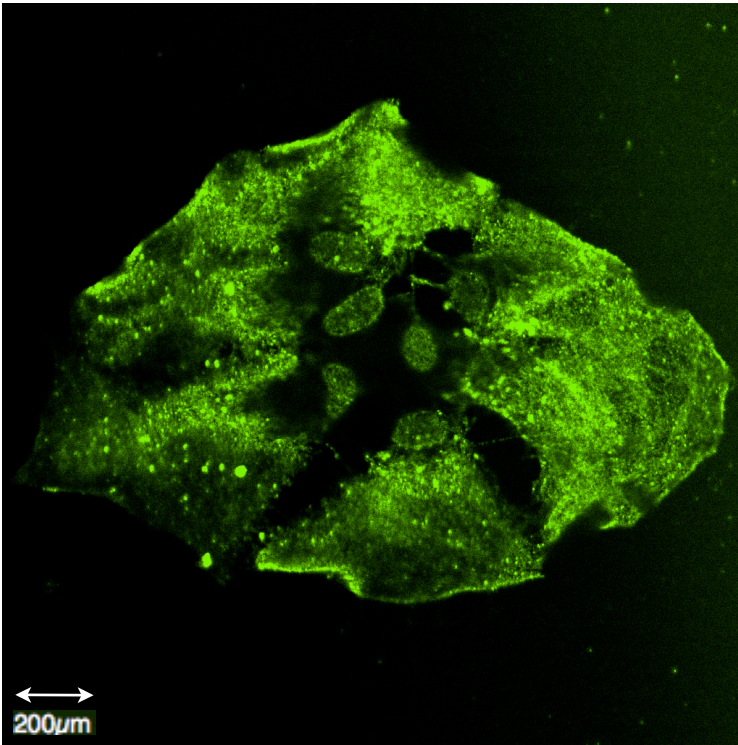


Abb. 9 Astrozyten RE-Eluat

Abb.9 zeigt eine Gruppe von Astrozyten nach Inkubation mit dem Eluat der RE-Patientin. Die Anfärbung durch die Antihumanzweitantikörper ist um Größenordnungen stärker als beim Kontrollserum. Im Vergleich zum Kontrollbild ist die Intensität des Bildes um das dreifache verringert (exp.time Eluat 126 ms, Kontrollserum 398 ms). Dieser Befund hat jedoch wegen der unsicheren AK-Konzentrationen in Eluat und Serum keine große Aussagekraft. Wichtig ist vielmehr das Auftauchen zusätzlicher AK-Bindungsstellen und deren Lokalisation innerhalb der Zellen. So sind wesentlich mehr intrazelluläre Strukturen angefärbt als bei dem Kontrollserum. Die deutliche Anfärbung der Zellränder zeigt uns, dass die zusätzlichen Antigene membranständig oder unmittelbar unterhalb der Zellmembran liegen.

3.3.2 Antikörperbindung an Gliomazellen

Zwischen Antikörpern aus dem Eluat der RE-Patientin und Rattenastrozyten haben wir eine Interaktion feststellen können. Um die Aussagekraft der Versuche zu steigern haben wir beschlossen, den Versuchsansatz in zwei Punkten zu verändern:

- Keine tierischen Zellen mehr in den Versuchen zu verwenden, um zusätzliche unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden
- Ein geeignetes Kontrolleluat zu finden, um nicht Eluat und Serum vergleichen zu müssen.

Da Primärkulturen aus humanen Astrozyten nicht zu bekommen waren, haben wir uns entschlossen, die weiteren Versuche mit Gliomazellen durchzuführen. Frau Prof. Held-Feindt (Neurochirurgie UKSH) hat uns drei humane Gliomazelllinien (A172, U373 und T98G) zur Verfügung gestellt, in der Hoffnung, dass diese Zellen noch wesentliche Astrozytengeschaften haben, um uns als Astrozyten-Ersatz zu dienen.

Als Kontrolleluat haben wir Eluat eines Patienten aus der Nephrologie (UKSH) verwendet. Wir hatten die berechtigte Hoffnung, dass dieser Patient keine neurologischen Autoantikörper entwickelt hat. Im Eluat dieses Patienten haben wir jedoch eine sehr hohe Konzentration von Autoantikörpern gegen das endoplasmatische Retikulum der Zellen gefunden. Dies hängt sicher mit der Erkrankung des Patienten (Gasbrand) zusammen. Durch sie wurde eine große Anzahl von Körperzellen zerstört, was zur Entstehung von ER-Autoantikörpern führt.

In Abb.10 ist eine große und mehrere kleine Zellen der Linie U373 zu sehen, die mit dem Kontrolleulat inkubiert worden sind. Die ER-Anfärbung ist auffällig, als leuchtende körnige Fläche um den etwas dunkleren Kern. Zellgrenzen, bzw. die Zellmembran ist jedoch nicht zu erkennen.

In Abb. 11 wurden die Zellen mit RE-Eluat inkubiert. Der Unterschied ist augenscheinlich. Es zieht sich ein leuchtender Saum um den ganzen Zellkörper. Hier wurden Strukturen angefärbt, die entweder membranständig sind oder sich direkt unter der Membran befinden.

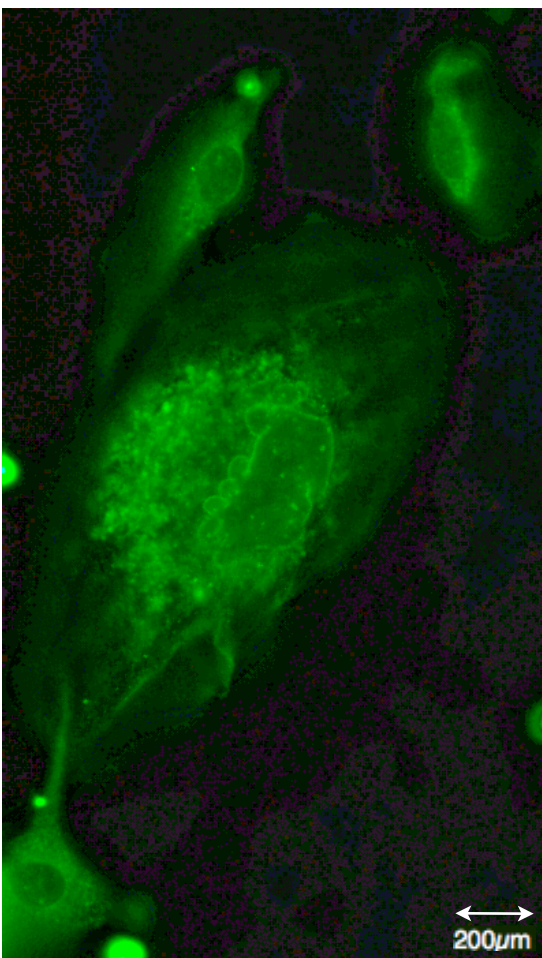


Abb. 10 U373 Zelllinie inkubiert mit Kontrolleulat

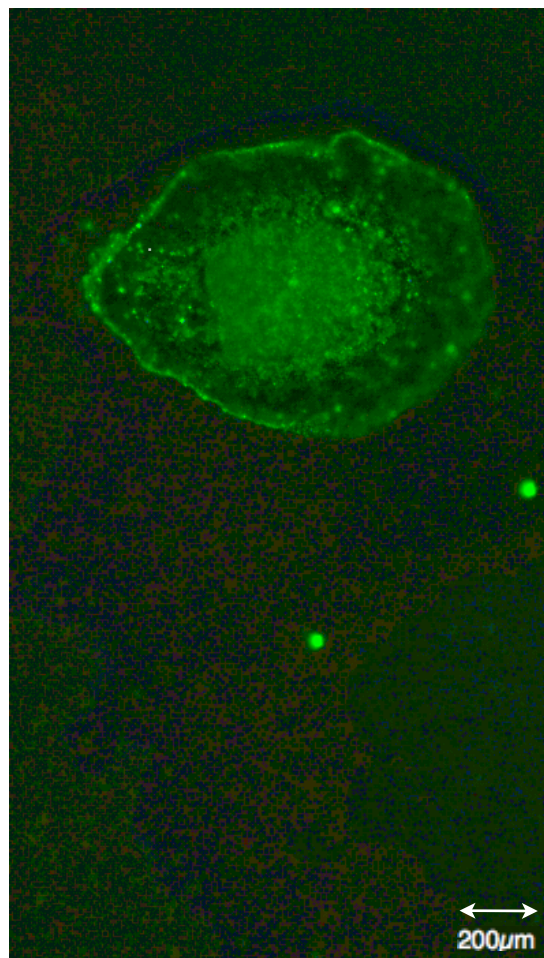


Abb.11 Zelllinie U373 inkubiert mit RE-Eulat

Wir konnten feststellen, dass die Gliomazelllinien schnell wachsen, in der Reihenfolge:

- A172 wachsen am langsamsten,
- die Wachstumsrate der U373 Zelllinie lag zwischen A172 und T98G, ! -T98G wächst am schnellsten.

Die Intensität der Anfärbung und die damit verbundene Dichte der antigenen Strukturen in der Zellmembran verhält sich proportional zu der Wachstumsgeschwindigkeit: Die Immunfärbung zeigte, dass die A172 Zellen nur sehr schwach angefärbt wurden, die U373 etwas stärker als die A172 und die T98G Zellen das stärkste Farbbild hinterließen (Abb.12).

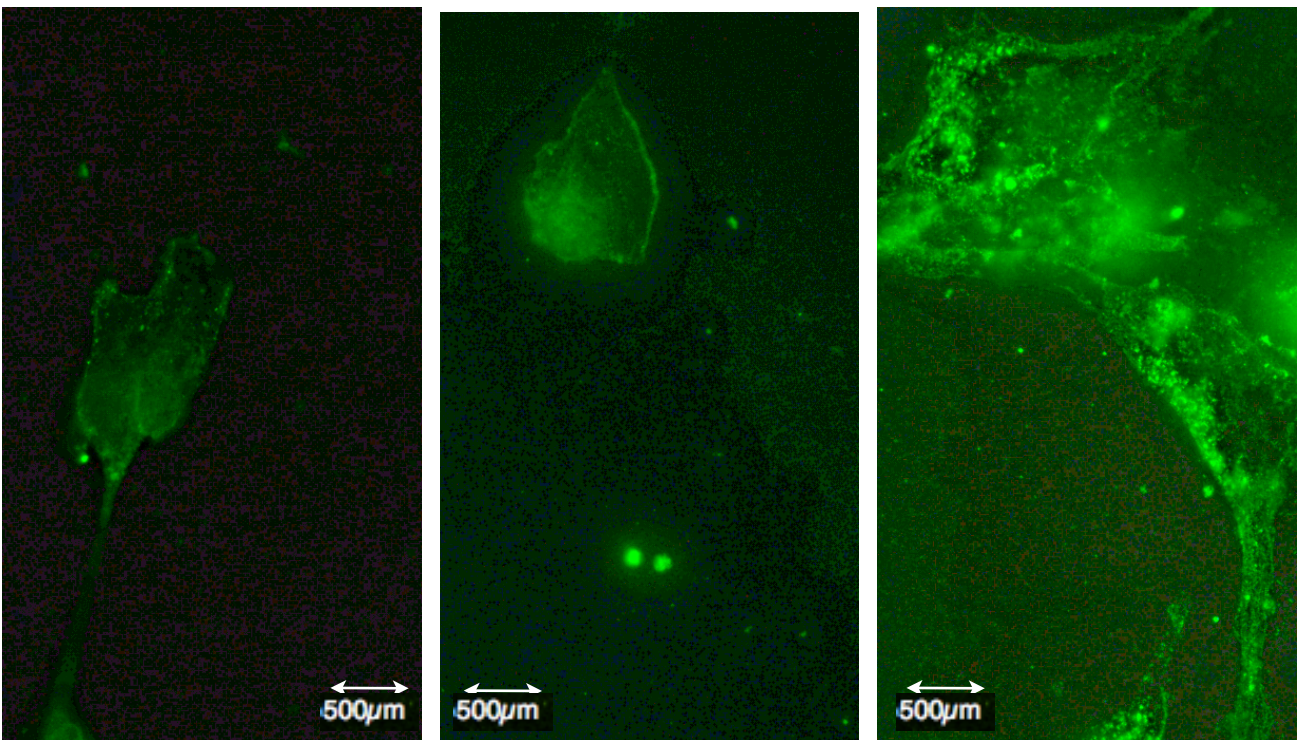


Abb. 12 Zelllinien: links A172, mitte U373, rechts T98G

Die Lage der Epitope ist bei den T98G Zellen deutlich zu erkennen. Diese Zellkultur wächst sehr schnell. Bereits nach drei Tagen sind in der Petrischale kaum Einzelzellen zu finden, da sich die Zellen paarweise oder in kleinen Gruppen zusammenschließen. Vielfach bilden sie auch große nahe zu konfluente Flächen. Bei den spindelförmigen Einzelzellen sind die angefärbten Stellen meist in dem vom Kern am weitesten entfernten Membranbereich zu finden (Abb.13). Schon bei zwei eng zusammenliegenden Zellen kann man

erkennen, dass die angefärbten Membranbereiche eine Art gemeinsame „Ausengrenze“ bilden (Abb. 13).

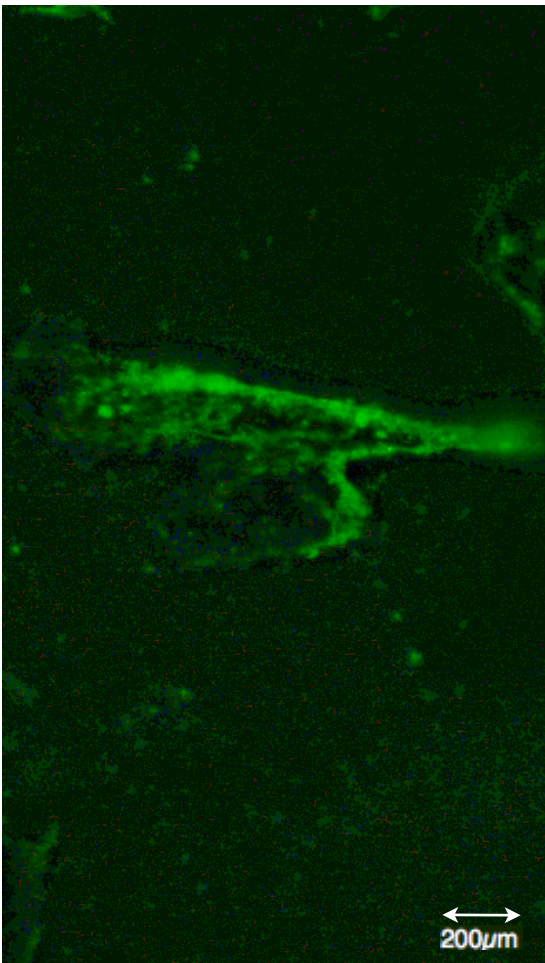


Abb. 13 T98G Zelllinie inkubiert mit Eulat

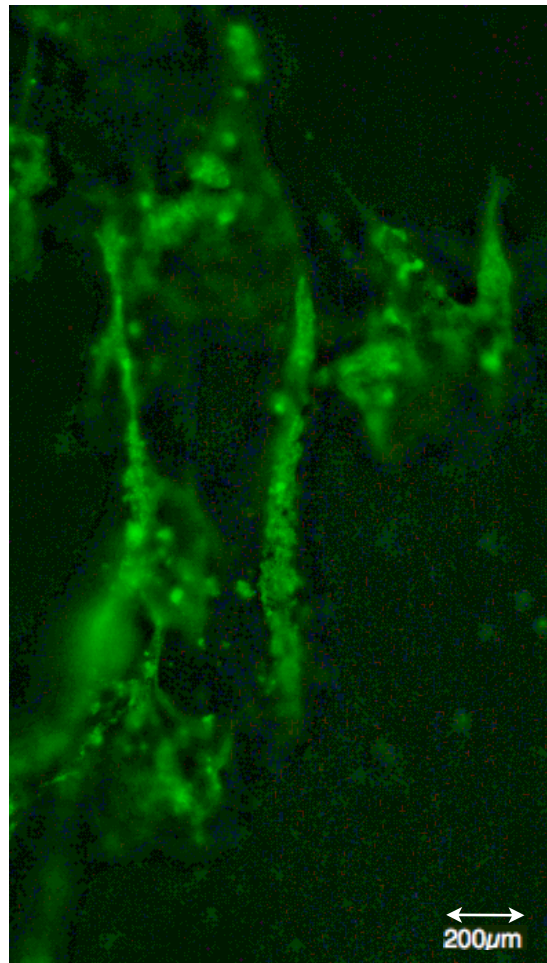


Abb. 14 T98G Zelllinie inkubiert mit Eulat

Besonders deutlich ist dieser Effekt bei konfluenten Zellflächen. Hier sind eigentlich nur noch die sehr stark angefärbten Außengrenzen zu sehen (Abb.14). Abgrenzungen der Zellen innerhalb der Fläche sind nicht angefärbt.

Nach Inkubation mit Patienteneulauat waren die Zellränder bei allen Glioma-Zelllinien sichtbar angefärbt, insofern eine Bestätigung unserer Ergebnisse an Ratten-Astrozyten.

3.3.3 Zytotoxizitätsversuche

Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von RE-Autoantikörpern auf Gliomazellen wurde die Zelllinie T98G ausgewählt, weil sie einerseits eine sehr hohe Wachstumsrate aufweist und andererseits die Intensität der Anfärbung bei den Immunfluoreszenzversuchen am deutlichsten war.

In einer ersten Versuchsserie wurden evtl. Auswirkungen auf das Wachstum der Zellkulturen untersucht. Eine Störung des Zellwachstums konnte jedoch nicht festgestellt werden. Selbst bei Kultivierung der T98G Zellen in unverdünntem Patienten- und Kontrollserum war nach drei Tagen kein Unterschied in der Zelldichte erkennbar. Ein massenhaftes Absterben der Gliomazellen durch RE-Antikörper war damit ausgeschlossen.

In einer weiteren Versuchsserie wurde zu den Seren aktiviertes Kaninchen-Komplement hinzugefügt. Dadurch sollten kurzfristige oder nur geringfügige AK-bedingte Zellschäden, die die langfristige Wachstumsrate der Gliomazellen nicht beeinflussen, aufgezeigt werden.

Zu diesem Zweck wurden Gliomazellen 3 Tage in Petrischalen kultiviert. Nach dieser Zeit wurden sie für zwei Stunden mit Test- bzw Patientenserum (unverdünnt) plus 180 µl Komplement inkubiert. Die Anzahl der abgestorbenen Zellen wurde anschließend mit Trypanblau bestimmt. Sie sind deutlich an der Kernfärbung zu erkennen (Abb. 16a). Ein Vergleich von Abb. 15 und 16 zeigt, dass in Anwesenheit von Patientenserum nur wenige Zellen (< 10%) abgestorben sind. Da vor der Inkubationszeit aber durch gründliches Spülen alle bereits toten Zellen abgelöst und entfernt wurden, kann man davon ausgehen, dass die wenigen Zellen tatsächlich als Folge der Autoantikörpereinwirkung zerstört wurden.

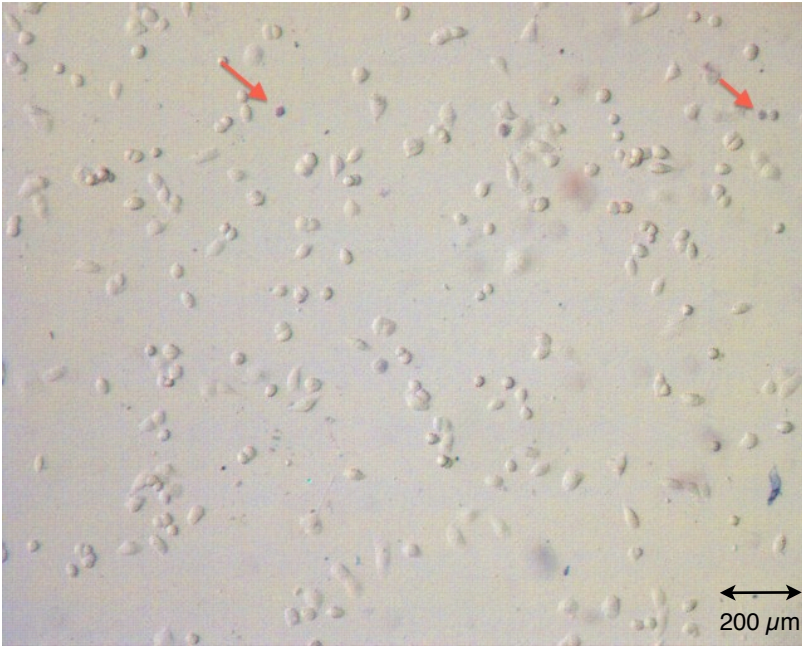


Abb. 15 Zelllinie T98G Kontrolle

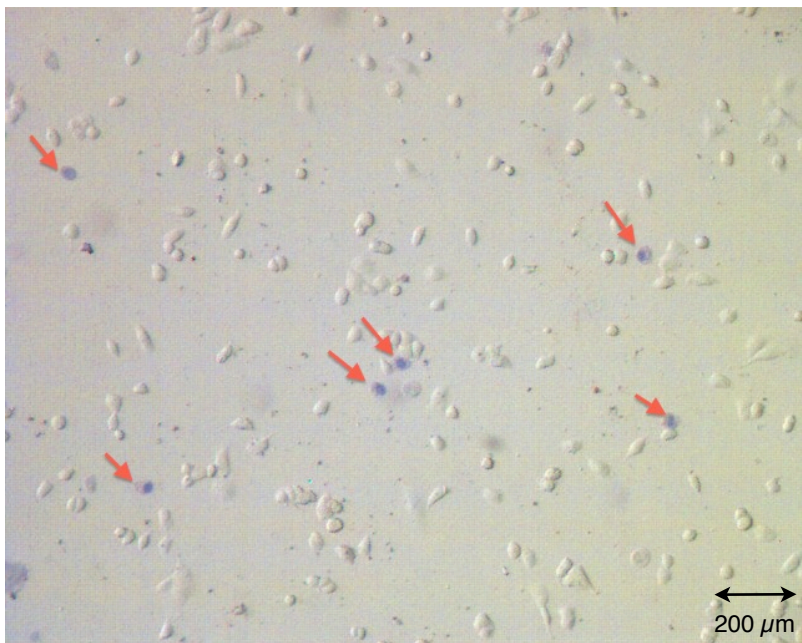
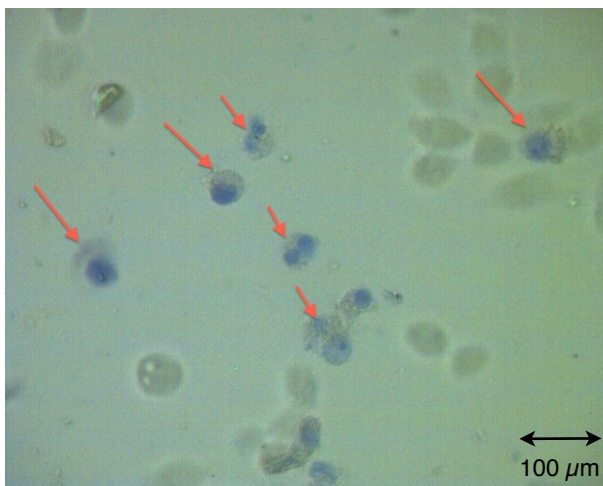


Abb.16 Zelllinie T98G inkubiert mit RE-Serum,



(Ausschnitt Abb. 16a)

Dieser geringe zytotoxische Effekt der RE-Autoantikörper auf Gliomazellen brachte uns dazu denselben Versuchsansatz mit Pirmärkulturen von Rattenastrozyten zu wiederholen.

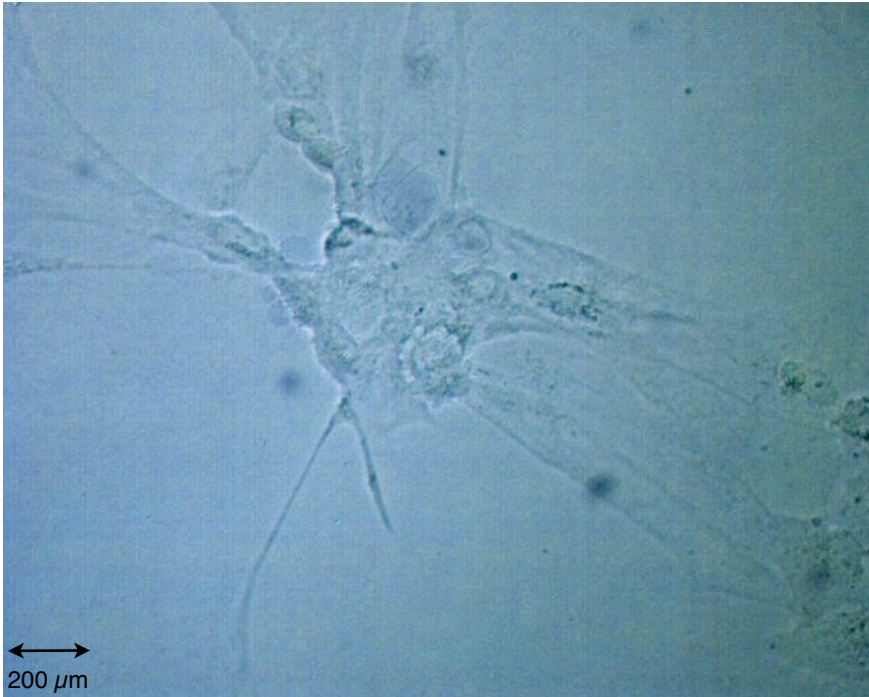


Abb. 17 Gruppe von Astrozyten inkubiert mit 1% Kontrollserum,

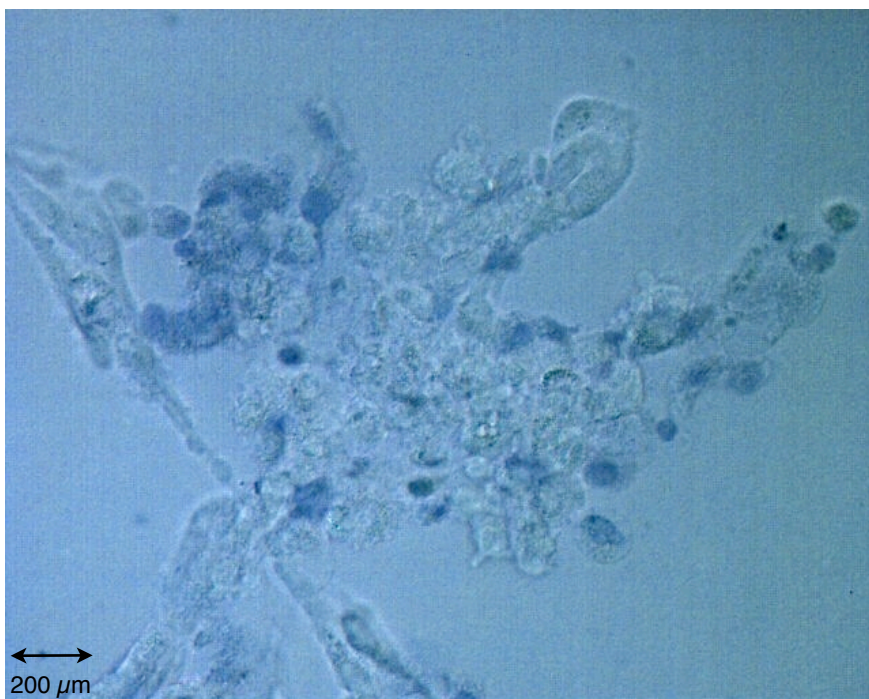


Abb. 18 Gruppe von Astrozyten inkubiert mit 1% Patientenserum,

Hier bestand aber wieder das Problem, dass humanes Serum auf tierische Zellen trifft, was zur Folge hatte, dass in unverdünnten Seren (Patient wie Kontrolle) die Astrozytenkulturen komplett zerstört wurden. Ein Arbeiten mit unverdünnten Seren war also nicht möglich. Durch eine Verdünnungsreihe wurde nach einer Serumkonzentration gesucht, bei der im Kontrollserum ein Überleben aller Zellen gewährleistet war, sodass zusätzliche zytotoxische Effekte der AK im Patientenserum aufgedeckt werden können. Bei einer Verdünnung der Serumkonzentration auf 1% wurden nach Inkubation mit Kontrollserum keine abgestorbenen Zelle gefunden (Abb. 17 und 18). Nach Inkubation mit Patientenserum waren vor allem an den Rändern konfluenter Zellgruppen größere Mengen beschädigter Zellen zu sehen. Diese Lokalisation der Zellschäden deckt sich mit den Ergebnissen der AK-Bindungsstudie.

4 Diskussion

Die Bildung von Antikörpern im spezifischen Teil des Immunsystems folgt einem vorgegebenen Weg über Antigen präsentierende Zellen, B-Zell Aktivierung in Kooperation mit TH2-Zellen, B-Zell Proliferation, Differenzierung zu Plasmazellen und schließlich Antikörper (AK) Produktion. In der Regel werden AK nur gegen körperfremde Antigene gebildet, da während der Reifung des Immunsystems alle immunkompetenten Zellen mit Antigenrezeptoren gegen körpereigene Molekülstrukturen durch negative Selektion eliminiert werden. Dieser Schutzmechanismus gegen Autoimmunreaktionen versagt immer dann, wenn körpereigene Strukturen plötzlich für das Immunsystem erreichbar werden, die vorher physiologisch nicht zugänglich waren, also auch für eine negative Selektion nicht präsentiert werden konnten. Dies ist u.a. der Fall, wenn größere Mengen von Gewebszellen zerstört werden. Hier können sich Autoantikörper gegen nun frei werdende intrazelluläre Strukturen bilden.

Die Bildung neuronaler Autoantikörper, also Autoantikörper gegen Strukturen und Zellen des ZNS, ist darüber hinaus noch dadurch erschwert, dass das Gehirn ein „immunprivilegiertes“ Organ darstellt. Es besitzt kein lymphatisches System, die Blut-Hirn-Schranke bildet eine Barriere für größere Moleküle, Proteine und Immunzellen und es werden fast keine MHC Moleküle exprimiert (Wekerle, 2002). Die Entstehung neuronaler Autoantikörper setzt also ein Versagen dieser natürlichen Barriere voraus, entweder lokal durch Verletzung oder großflächig durch eine Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke. Dies würde zu einer Infiltration von Immunzellen und proinflammatorischer Zytokine führen. Wie es unter diesen Umständen zur Bildung von neuronalen Autoantikörpern kommt ist noch weitgehend ungeklärt und vermutlich auch von Fall zu Fall unterschiedlich.

Sicherlich steht die Bildung von AK am Ende einer Autoimmunreaktion, an deren Anfang die Zerstörung von Zellen des ZNS steht. Dadurch werden Strukturen freigesetzt, die aufgrund einer fehlenden negativen Selektion vom

Immunsystem als „Antigene“ erkannt werden. Für den Beginn dieser Kausalkette, der Zerstörung von Zellen des ZNS (Neurone, Gliazellen, Astrozyten), werden verschiedene Zellen des Immunsystems diskutiert, die nach Infiltration ins ZNS dazu in der Lage wären. Natürliche Killerzellen (NK) werden häufig in einem sehr frühen Stadium einer Immunreaktion nach Verletzung oder Infektion im ZNS gefunden (Hao et al. 2010). NK, die darauf spezialisiert sind MHC-negative Zellen anzugreifen, würden in einem solchen Umfeld reichlich Zielzellen finden. Eindringende Lymphozyten sollten zunächst kein größeres Problem darstellen, da die Zellen des ZNS durch die fehlende Ausprägung von MHC-Molekülen vor deren Angriffen geschützt sein sollten. Allerdings ist auch bekannt, dass MHC-negative Zellen des ZNS unter bestimmten Umständen (z.B. als Folge eines entzündlichen Prozesses) zu MHC-positiven Zellen und damit angreifbar für CD8+T-Killerzellen werden können (Chevalier, et al. 2010). So zeigten histopathologische Befunde an RE-Patienten Bereiche im ZNS, in denen sich CD8-T-Zellen in unmittelbarer Nähe zu MHC-positiven Neuronen befanden (Schwab, et al. 2009). Nach Ablauf dieser beiden Prozesse (Dysfunktion der Blut- Hirn-Schranke, Zerstörung von Zellen) ist es fast zwangsläufig, dass Bruchstücke der zerstörten Zellen das periphere lymphatische Gewebe erreichen. Dort werden sie als mögliche Antigene präsentiert. Dies führt im Rahmen der normalen spezifischen Immunabwehr zur Bildung von Anti-ZNS-Autoantikörpern, die dann im Serum von Patienten nachgewiesen werden können.

Inwieweit die im Serum zirkulierenden Autoantikörper den klinischen Phänotyp einer neuronalen Autoimmunerkrankung bestimmen, ist noch unklar. Von allen Autoantikörpern, die den Weg über die Blut-Hirn-Schranke zurück ins ZNS finden, besitzen nur diejenigen ein pathogenes Potential, die gegen Oberflächenstrukturen der Zellen im ZNS gerichtet sind, denn nur sie wären in der Lage gesunde Zellen anzugreifen. Sie könnten durch Markierung dieser Zellen zu deren Zerstörung beitragen. Sollten die Oberflächenautoantigene allerdings funktionell wichtige Membranproteine (Ionenkanäle, Rezeptoren etc.) sein, so könnten die AK allein durch ihre Bindung zur Funkti-

onsänderung oder zum Funktionsverlust dieser Zellen führen (Zhou et al, 1998).

Innerhalb dieses Problemkreises bewegte sich die vergleichende experimentelle Untersuchung dieser Arbeit. Uns standen Antikörper von zwei Patienten mit einer neuronalen Autoimmunerkrankung zur Verfügung. In einem Fall handelte es sich um einen Patienten mit limbischer Enzephalitis (LE), im anderen Fall um eine Patientin mit Rasmussen Enzephalitis (RE).

Im Falle der LE sind einige der Oberflächenantigene bekannt, gegen die die Autoantikörper gerichtet sind. Es handelt sich dabei um Glutamat-Rezeptoren, Gaba-Rezeptoren und Kaliumkanalkomplexe.(Vincent et al. 2011). Unter einem Kaliumkanalkomplex ist der spannungsabhängige Kaliumkanal sowie die damit assoziierten Proteine LGI1 und CASPR2 zu verstehen. Unter diesen Voraussetzungen ist eine Analyse der Antigen-Antikörper Interaktion möglich unter Verwendung transfizierter Zellen, die jeweils nur ein spezifisches Antigen exprimieren. Im Falle des LE-Patienten wurde im Labor von Frau Dr. Vincent (Oxford) festgestellt, dass sein Serum Autoantikörper gegen die Kaliumkanalvarianten Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.6 in hoher Konzentration enthielt. Für eine vergleichende Untersuchung wurden von uns stabil transfizierte Fibroblasten verwendet, die Kv1.2 exprimieren, sowie zusätzlich eine Zelllinie, die den Kanaltyp Kv1.3 exprimiert. Die Einbeziehung des Kanaltyps Kv1.3 in die Studie hatte mehrere Gründe. Dieser Kanal ist mit den beiden anderen Kanälen (Kv1.1 und Kv1.2) sehr eng verwandt und strukturell auch sehr ähnlich. Dennoch konnte er mit dem Verfahren von Fr. Dr. Vincent als Autoantigen nicht nachgewiesen werden, da dieses Verfahren auf der Dendrotoxin-Bindungsfähigkeit beruht, welche dem Kanal Kv1.3 fehlt. Außerdem ist Kv1.3 ein funktionell wichtiger spannungsgesteuerter Kaliumkanal für das Immunsystem. Er ist essentiell für die Steuerung von Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. Eine ähnlich funktionelle Bedeutung für B-Zellen wird vermutet (Wulff et al. 2004). Eine Schädigung dieses Kanals durch Autoantikörper würde einer Immunsuppression gleichkommen und wäre mit dem Krankheitsbild LE nicht vereinbar.

In einem ersten Versuchsansatz wurde im Vergleich zwischen Patientenserum und dem Serum einer gesunden Person (Kontrollserum) die Bindung von Autoantikörpern an Kv1.1, Kv1.2 und Kv1.3 exprimierenden Fibroblasten (Ratte) untersucht. Diese immunzytochemische Untersuchung besitzt allerdings nur eingeschränkte Aussagekraft. Durch die Verwendung von tierischen Zellen und humanem Serum ist eine biologische Nullkontrolle nicht möglich, d.h. auch bei Inkubation mit dem Kontrollserum gibt es eine Anfärbung der Zellen. Der Intensitätsunterschied in der Anfärbung zwischen Kontrollserum und Patientenserum ist jedoch deutlich genug, um zu erkennen, dass bei den Kv1.1 und Kv1.2 Zellen eine zusätzliche Anfärbung nach Inkubation mit Patientenserum stattgefunden hat, bei den Kv1.3-Zellen jedoch nicht. Um Ak-bindende Strukturen (membranständig?, intrazellulär?) zu erkennen, ist diese Versuchsserie jedoch nicht geeignet.

In weiteren Experimenten mit den Kv1.1 und Kv1.2 exprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass die Autoantikörper gegen diese Kaliumkanäle konzentrationsabhängig zwei unterschiedliche pathogene Effekte verursachen können. Bei geringer Konzentration kommt es zu Funktionveränderungen der betroffenen Zellen, bei höheren Konzentrationen zu massiven Zellschädigungen bzw. zum Absterben der Zellen.

Zur Untersuchung dieses zytotoxischen Effekts sind die verwendeten Fibroblastenkulturen sehr gut geeignet, denn sie besitzen eine hohe Teilungs- und Wachstumsrate. Zunächst wurde die Serumkonzentration in den Versuchsansätzen herabgesetzt, um zu verhindern, dass bereits das Kontrollserum Zellschäden verursacht. Bei einer Inkubation von Fibroblastenzellkulturen (Kv 1.2) mit 10% Kontrollserum zeigen die Zellen eine normale Wachstumsrate. Sie bilden, mit einer Konzentration von 200000 Zellen/ml in Petrischalen ausgesät, nach drei Tagen eine konfluente Zellschicht. In Gegenwart von 10% Patientenserum kam es bereits nach einem Tag zu erheblichem Zellverlust, eine konfluente Zellschicht wurde auch nach drei Tagen nicht erreicht. Bei den Fibroblasten, die den Kanal Kv1.3 exprimieren, war ein solcher zytotoxischer Effekt durch das Patientenserum nicht zu beobachten.

Durch eine weitere Reduktion der Konzentration von Kontroll- und Patientenserum auf 2% konnten auch bei den Kv1.1 und Kv1.2 exprimierenden Fibroblasten Zellschäden vermieden werden. Eine dreitägige Inkubation mit Patientenserum dieser Konzentration führte jedoch zu einer signifikanten Funktionsänderung der Zellen, nämlich zu einer Reduktion der Kaliumströme auf etwa 50%. Dies wurde mit der Patch-Clamp-Methode im sog. Whole-cell-mode gemessen. Der so gemessene Gesamt-Kaliumstrom ist repräsentativ für die Anzahl der funktionsfähigen Kaliumkanäle einer Zelle. Eine Abnahme des Kaliumstroms um 50% würde demnach bedeuten, dass etwa die Hälfte der Kaliumkanäle (Kv1.1 und Kv1.2) in Anwesenheit von VGKC-Autoantikörpern ihre Leitfähigkeit verloren hätten.

Aus den vorliegenden Befunden lässt sich schließen, dass die Konzentration der Autoantikörper bestimmt, welcher von zwei möglichen pathogenen Effekten im Vordergrund steht. Eine hohe Konzentration führt zur Zerstörung von Zellen, aber auch bei geringerer Konzentration kann es zu Zellschädigungen in Form von Funktionsänderung oder Funktionsverlust kommen.

Von den hier beschriebenen pathogenen Effekten waren die Kv1.3 exprimierenden Zellen ausgeschlossen, obwohl diese Kaliumkanal-Untereinheiten auch von Zellen des ZNS exprimiert werden und bei deren Zerstörung im Rahmen einer Autoimmunreaktion als potentielle Autoantigene in Frage kämen. Dass sich im LE-Patientenserum keine Kv1.3 Autoantikörper befanden, kann nur damit erklärt werden, dass während der negativen Selektion alle entsprechenden Antigen-Rezeptoren eliminiert wurden. Das hängt sicher damit zusammen, dass Kv1.3 Kanäle eine wichtige Rolle bei Aktivierung und Proliferation von T- und B-Zellen spielen. Eine Schädigung dieser Kanäle würde eine erhebliche immunsuppressive Wirkung nach sich ziehen (Wulff et al. 2004).

Im Gegensatz zur LE, bei der mit den VGKC-Komplex Antikörpern eine charakteristische Gruppe von Autoantikörpern vorliegt, die bei der Mehrzahl aller LE-Patienten gefunden wird und deshalb diagnostisch von großer Bedeutung ist, ist das Autoantikörper-Profil bei RE-Patienten unübersichtlich.

Autoantikörper gegen verschiedene Antigene wie GluR3 (Watson et al. 2005), nAChR und Munc18-1 (Alvarez-Baron et al. 2008) findet man nur bei einem Teil der RE-Patienten oder nur in einem bestimmten Stadium der Krankheit. Zum Nachweis von RE-Autoantikörpern war also die Verwendung eines spezifischen Autoantigens nicht praktikabel. Deshalb wurde für den zweiten Teil dieser Arbeit ein anderer experimenteller Ansatz gewählt. Nicht spezielle Antigene, exprimiert in einer Zelllinie, sondern spezielle Zellen mit ihrem natürlichen Spektrum an potentiellen Antigenen werden den RE-Autoantikörpern als Ziele angeboten. Aus histopathologischen Befunden ist klar, dass es bei RE-Patienten zum Verlust sowohl von Neuronen als auch von Astrozyten kommt (Schwab et al. 2009). Bei der Vielfalt von Funktion und Lokalisation von Nervenzellen erschien es sinnvoll Astrozyten als „Zielzellen“ zu verwenden, eine einheitliche Zellgruppe, die nur im ZNS vorkommt.

In einer ersten Versuchsserie wurden Primärkulturen aus Rattenastrozyten verwendet. Sie wurden mit dem Eluat einer RE-Patientin inkubiert, das mit einem Immunadsorptionsverfahren während einer sehr akuten Phase der Erkrankung gewonnen wurde. Da Kontrolleluat nicht zur Verfügung stand, wurde als Kontrolle das Serum einer gesunden Person eingesetzt. Die Ergebnisse der immunzytochemischen Experimente sind also mit einigen Einschränkungen in der Aussagekraft zu interpretieren. Eine biologische Nullkontrolle ist auch bei diesen Experimenten (tierische Zellen, humanes Serum) nicht möglich. Ein Intensitätsvergleich in der Anfärbung gebundener AK wäre nicht aussagekräftig, da weder bei dem Eluat, noch bei dem Kontrollserum von definierten AK-Konzentrationen ausgegangen werden kann. Somit kommt der Analyse der angefärbten (also von AK als Antigen markierten) Zellstrukturen eine große Bedeutung zu. Die Aussagekraft der Experimente liegt also eher in einem qualitativen als einem quantitativen Vergleich zwischen Astrozyten, die mit Patienten-AK oder Kontroll-AK behandelt wurden. Dieser qualitative Vergleich ist allerdings mit den hier verwendeten Astrozyten sehr gut möglich, da bei diesen flach auswachsenden Zellen die angefärbten intrazellulären oder membranständigen Strukturen sehr gut zu erkennen sind.

In Rattenastrozyten werden durch humane AK im Kontrollserum hauptsächlich intrazelluläre Strukturen markiert. Kerne und endoplasmatisches Retikulum (ER) sind schwach angefärbt, saures Gliafaserprotein ist als filigraner Fächer deutlich zu erkennen. Wichtig ist vor allem, dass keine randständigen Strukturen markiert sind, die Zellgrenzen sind praktisch nicht zu erkennen. Ein deutlicher qualitativer Unterschied zeigt sich nach Inkubation der Astrozyten mit Patientenuelat. Es wurden wesentlich mehr intrazelluläre Strukturen angefärbt als durch das Kontrollserum. Außerdem ist eine deutliche Anfärbung der Zellränder zu erkennen, d.h. es wurden zusätzliche Antigene markiert, die membranständig sind oder unmittelbar unterhalb der Zellmembran liegen. Die Tatsache, dass noch zusätzlich intrazelluläre Strukturen durch AK aus dem Patientenuelat markiert wurden, stützt die These, dass der Autoantikörperbildung eine Zerstörung von Astrozyten im ZNS vorangegangen sein muss (s.o.).

In einer weiteren Serie zum Nachweis von Autoantikörpern im Patientenuelat wurde der Versuchsansatz in zwei Punkten verändert. Um zusätzliche unspezifische AK-Bindung zu verhindern, wurden Ratten-Astrozyten durch humane Glioma-Zelllinien ersetzt, in der Hoffnung, dass diese Zellen noch genügend Astrozyteneigenschaften besitzen, um als Astrozytenersatz zu dienen. Außerdem sollte als Kontrolle ebenfalls Eluat verwendet werden, nämlich das Eluat eines Patienten aus der Nephrologie, in der Hoffnung, dass dieser Patient keine neuronalen AK entwickelt hat.

Im Laufe der Untersuchungen wurde im Eluat dieses Patienten eine hohe Konzentration von Autoantikörpern gegen das endoplasmatische Retikulum der Zellen gefunden. Das mag mit der Erkrankung des Patienten (Gasbrand) zusammenhängen, denn ER-AK entstehen vor allem dann, wenn eine große Anzahl von Zellen zerstört wird. Die Anfärbung durch die Antihumanzweitantikörper war um Größenordnungen stärker als bei Eluat der RE-Patientin (gleiche Konzentration). Ein Intensitätsvergleich machte also keinen Sinn. Wenn man aber die mit RE-Eluat behandelten Zellen phototechnisch auf dieselbe Helligkeit bringt, wie die mit Kontrolleluat behandelten, so kann man doch

faszinierende Unterschiede erkennen. Die ER-AK im Kontrolleluat führen zwar zu einer deutlichen ER-Anfärbung. Was man aber überhaupt nicht sieht, sind die Zellgrenzen bzw. die Zellmembran. Nach Inkubation mit Patientenuelat war bei allen Glioma-Zelllinien eine Anfärbung der Zellränder erkennbar. Insofern eine Bestätigung unserer Ergebnisse an Ratten-Astrozyten.

Da die Suche nach funktionellen Veränderungen der Zellen bei ungewissen Autoantigenen sinnlos wäre, beschränkt sich die Untersuchung des pathogenen Potentials der RE-Autoantikörper auf mögliche zytotoxische Effekte. In dieser Versuchsserie kam Patientenserum zum Einsatz. Ein Einfluss der RE-Autoantikörper auf die Wachstumsrate der Glioma-Zelllinien konnte nicht festgestellt werden. Selbst nach Inkubation mit unverdünntem Patienten- bzw. Kontrollserum war nach 48 Stunden kein Unterschied in der Zelldichte zu erkennen. Ein AK bedingtes Absterben einer größeren Anzahl von Gliomazellen kann damit ausgeschlossen werden. In einem weiterem Versuchsansatz wurde zusätzlich aktiviertes Komplement (Kaninchen) verwendet. Dieser Ansatz sollte dazu dienen, AK-bedingte Zellschäden, die nur kurzfristig auftreten oder zu geringfügig sind, um die langfristigen Wachstumsraten der Gliomazellen zu beeinflussen, aufzuzeigen. Tatsächlich findet man nach Inkubation mit unverdünntem Patientenserum einige wenige (< 10%) Zellen, die durch Kernfärbung als abgestorben zu erkennen sind. Da unmittelbar vor den Versuchen durch mehrfaches Spülen bereits tote Zellen abgelöst und ausgespült wurden, kann man davon ausgehen, dass diese markierten Zellen während der 2 Std. Inkubationszeit abgestorben sind.

Dieser geringe Effekt mag daran liegen, dass Gliomazellen als Tumorzellen für Zytotoxizitätstests nicht unbedingt geeignet sind. Derselbe Versuchsansatz wurde deshalb noch einmal mit Primärkulturen von Rattenastrozyten durchgeführt. Bei diesem Ansatz treffen wieder tierische Zellen auf humanes Serum, was zur Folge hatte, dass in unverdünnten Seren (Patient wie Kontrolle) die Astrozytenkulturen komplett zerstört wurden. Durch eine Verdünnungsreihe wurde ermittelt, dass nach einer Verdünnung auf 1% in Kontroll- und Patientenserum alle Zellen am Boden der Kulturschalen haften blieben.

Eine Kernfärbung zeigte jedoch, dass im Patientenserum eine größere Menge von Zellen abgestorben war, insbesondere an den Rändern konfluenter Zellhaufen. Dieser Befund deckt sich sehr schön mit den Ergebnissen der AK-Bindungsstudie.

In der hier vorliegenden Studie zum Nachweis und zur Bedeutung von Autoantikörpern bei zwei verschiedenen Formen der Autoimmunenzephalitis hat sich die Verwendung von Zellkulturen als geeignete Methode erwiesen. Bei bekannten Autoantigenen (wie bei der LE) sind transfizierte Zelllinien bestens zum monospezifischen Nachweis der entsprechenden Autoantikörper im Serum von Patienten geeignet. Zellkulturen dieser Art werden von verschiedenen Firmen inzwischen auch als serologische Marker zur Differentialdiagnose der Autoimmun-Enzephalitis angeboten. Mit diesen transfizierten Zellen lassen sich auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, konkrete Aussagen über das pathogene Potential der Autoantikörper machen.

Auch bei anderen Formen der Autoimmun-Enzephalitis, bei denen es keine eindeutige Identifizierung von Autoantigenen gibt, bei denen das AK-Profil von Patient zu Patient unterschiedlich oder vom Stadium der Erkrankung abhängig sein kann (wie bei der RE), erwies sich der Ansatz mit Zellkulturen zu arbeiten als tauglich. Hier konnten an potentiellen Zielzellen, auch in Ermangelung einer echten biologischen Null-Kontrolle, zusätzliche Bindungsstellen von Autoantikörpern aus Patientenserum hinreichend sicher aufgezeigt werden. Dass in unseren Experimenten nur eine geringe zytotoxische Wirkung nachgewiesen werden konnte, mag am AK-Profil der Patientin oder an den verwendeten Zellkulturen liegen. Dieser Nachweis ist mit spezifischen Autoantigenen transfizierten Zellen sicher überzeugender zu führen.

5 Zusammenfassung

Limbische Enzephalitis (LE) und Rasmussen Enzephalitis (RE) sind Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), bei denen Autoantikörper gegen Strukturen des ZNS entstehen, die im Serum der Patienten nachzuweisen sind. Für die vorliegende Studie stand uns Serum von zwei Patienten zur Verfügung, die an LE bzw. RE erkrankt waren. Der Nachweis von Autoantikörpern in diesen Seren wurde mit Methoden der Immunzytochemie durchgeführt. Die Bedeutung (pathogenes Potential) dieser Antikörper wurde durch die Untersuchung funktioneller Veränderungen der betroffenen Zellen und durch Zytotoxizitätstests ermittelt. Bei der LE ist mit dem VGKC-Komplex ein Oberflächenantigen bereits bekannt. Unter VGKC-Komplex versteht man spannungsabhängige Kaliumkanäle und die damit assoziierten Proteine. So konnte ein monospezifischer Nachweis für eine Antikörperinteraktion durchgeführt werden. Zum Einsatz kamen dabei stabil transfizierte Zelllinien (Fibroblasten), die jeweils einen speziellen Kaliumkanal (Kv1.2 bzw. Kv1.3) exprimieren.

Der Kaliumkanal Kv1.2, der eine wichtige Rolle bei der Erregungssteuerung von Nervenzellen spielt, war in früheren Arbeiten bereits als potentieller Oberflächenantigen bei der LE identifiziert worden. Entsprechend gab es bei unseren Untersuchungen positive Befunde bei den immunzytochemischen und bei den zytotoxischen Experimenten. Auch nach Herabsetzen der Serumkonzentration bis zur Vermeidung von Zellschädigungen waren noch funktionelle Änderungen der betroffenen Zellen messbar. Der Kaliumstrom der Kv1.2 exprimierenden Zellen war nach Inkubation mit Patientenserum auf etwa die Hälfte der Kontrollwerte (Serum einer gesunden Person) reduziert.

Für den Kaliumkanal Kv1.3, der eine wichtige Rolle bei der Steuerung von Aktivierung und Proliferation einiger Zellen des Immunsystems spielt, wurden im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen bisher keine Untersuchungen angestellt. Kv1.3 exprimierende Zellen zeigten bei unseren Experimenten nach Inkubation mit Patientenserum keine Unterschiede in Immunfluor-

reszenztests zu Zellen, die mit dem Serum einer gesunden Person behandelt wurden. Auch konnten keine Anzeichen von Zellschädigung oder einer signifikanten Störung der Zellfunktion durch das Patientenserum beobachtet werden. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass LE-Patienten keine Autoantikörper gegen Kv1.3 Kaliumkanäle entwickeln, obwohl diese Kaliumkanal-Untereinheiten auch von Zellen des ZNS exprimiert werden und somit als potentielle Antigene in Frage kämen.

Bei der RE ist das Antikörperprofil der Patienten unklar, was einen monospezifischen Nachweis von Autoantikörpern verhindert. Aus histopathologischen Befunden ist bekannt, dass bei RE-Patienten sowohl Nervenzellen, als auch Astrozyten vom Immunsystem angegriffen und zerstört werden. Aus diesem Grund wurden als Substrat für den immunzytochemischen Nachweis von Autoantikörpern Primärkulturen von Astrozyten (Ratte) und humane Gliomazellen eingesetzt. In beiden Versuchsreihen wurden nach Behandlung der Zellen mit Patientenserum zusätzliche AK-Bindungsstellen an der Zellmembran sichtbar, die bei Vorbehandlung mit Kontrollserum nicht zu sehen waren. Das pathogene Potential der Autoantikörper wurde mit Zytotoxizitätstests untersucht. Der zytotoxische Effekt war bei Gliomazellen nur gering ausgeprägt, aber vorhanden. Etwa 10% aller Zellen war nach Behandlung mit Patientenserum an der Kernfärbung als geschädigt zu erkennen. Bei Rattenastrozyten musste das Serum, um interspezifische Immunreaktionen zu vermeiden, auf 1% verdünnt werden. Trotzdem konnte auch hier ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden.

Die hier vorgelegten Ergebnisse könnten den Weg für ein serologisches Testsystem zur Erkennung neurologischer Autoimmunerkrankungen aufzeigen.

6 Literaturverzeichnis

- Aidley, D.J. and Stanfield,P.R. (1996) Ion Channels: Molecules in Action Cambridge University Press
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1995) Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Alison J, Georgiou HM,Strasser A, Vaux DL (1997) Transgenic expression of CD95 ligand on islet P cells induces a granulocytic infiltration but does not confer immune privilege upon islet allografts. Proc Natl Acad Sci USA 94:3943-3947
- Alvarez-Baron, E. Et al. Autoantibodies to Munc18, cerebral plasma cells and B-lymphocytes in Rasmussen encephalitis. Epilepsy Res. 80, 93-97 (2008)
- Anderson NE, Rosenblum MK, Graus F, Wiley RG, Posner JB(1988) Autoantibodies in paraneoplastic syndromes associated with small--cell lung cancer. Neurology. 38: 1391--1398
- Antoine JC, Absi L, Honnorat J, Boulesteix JM, DeBrouker T, Vial C, Butler M, De Camilli P, Michel D.(1999) Antiampiphysin antibodies are associated with various paraneoplastic neurological syndromes and tumors. Arch Neurol.56: 172--177
- Archelos, J. J., S. C. Previtali and H. P. Hartung (1999). The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. Trends Neurosci 22: 30-38.
- Arstila TP, Casrouge A, Baron V, et al., A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity, Science 1999, 286: 958-61
- Avrameas, S 1988, Immunological techniques based on non-radioactive markers: past, present and future in: Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie , Vol. 330 (4/5. 1988),
- Avrameas, S. 1991. Natural autoantibodies: From 'horro autotoxicus' to 'gnothi seauton'. Immunol. Today 12:154-159.
- Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD.(1996) Passage of cytokines across the blood- brain barrier. Neuroimmunomodulation 2(4):241-8.

- Bechmann I.(2005) Failed central nervous system regeneration: a downside of immune privilege? *Neuromolecular Med*;7(3):217-228.
- Besedovsky HO, del Rey A.(1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17(1):64-102.
- Bien C, Elger C (2003). Neue Daten zur Pathogenese und neue Therapiekonzepte bei der Rasmussen -Enzephalitis. *Neuropädiatrie in Klinik und Praxis* 2003; 34-5
- Bien CG, Bauer J, Deckwert TL et al (2002) Destruktion of neurons by cytotoxic T cells: a new pathogenic mechanism in Rasmussen`s encephalitis. *Ann Neurol* 51:311-318
- Bien CG, Granata T, Antozzi C et al. (2005) Pathogenesis, diagnosis und treatment of Rasmussen encephalitis: a European consensus statement *Brain* 128: 454-471
- Bien CG, Schulze--Bonhage A, Deckert M, Urbach H, Helmstaedter C, Grunwald T, Schaller C, Elger CE(2000) Limbic encephalitis not associated with neoplasm as a cause of temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 55: 1823--1828
- Bien CG.(2008) Limbische Enzephalitis: Diagnostik und Management. *Nervenheilkunde*. 27: 413--420
- Billingham RE, Boswell T.(1953) Studies on the problem of corneal homografts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*;141(904): 392-406.
- Blom, B; Spits, H.(2006) "Development of human lymphoid cells." *Annu Rev Immunol*; 24: 287-320
- Brierley JB, Corsellis JAN, Hierons R, Nevin S.(1960) Subacute encephalitis of later adult life mainly affecting the limbic areas. *Brain* 83: 357--368
- Buckley, C., Oger, J., Clover, L., Tuzun, E., Carpenter K., Jackson. And Vincent A (2001) Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann. Neurol.*, 50: 73-78
- Casali, P. and Notkins, A. L. (1989). CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol. Today* 10, 364-368.

- Catterall W., Epstein PN. (1992) Ion channels. *Diabetologia* 35 Suppl. 2: S23-33.
- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean M-C, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A (2000): Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 22:345- 369.
- Chandy, K. G., Gutman, G. A.(1995): Voltage-gated K⁺ channel genes; Handbook of receptors and channels : Ligand and Voltage-gated Ion channels, CRC Press Boca Raton, 1 - 71
- Chevalier, Grégoire, et al. "Neurons are MHC class I-dependent targets for CD8 T cells upon neurotropic viral infection." *PLoS pathogens* 7.11 (2011): e1002393.
- Choi, K. L., Aldrich, R. W., Yellen, G.(1991)Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 88 (12): 5092 - 5095
- Chung I and Schlichter L. C. (1997) Regulation of native Kv 1.3 Channels by cAMP-dependent protein phosphorylation *Am. J. Physiol.* 273(Cell Physiol. 42): C622-C633
- Cooper T.G., (1987) *Biochemische Arbeitsmethoden*. 1. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin
- Corsellis JA, Goldberg GJ, Norton AR.(1968) "Limbic encephalitis" and its association with carcinoma. *Brain* 91: 481--496
- Dalmau J, Graus F, Villarejo A, Posner JB, Blumenthal D, Thiessen B, Saiz A, Meneses P, Rosenfeld MR(2004) Clinical analysis of anti--Ma2--associated encephalitis. *Brain* 127: 1831--1844
- Dalmau J, Gultekin SH, Voltz R, Hoard R, DesChamps T, Balmaceda C, Batchelor T, Gerner E, Eichen J, Frennier J, Posner JB, Rosenfeld MR(1999) Ma1, a novel neuron-- and testis--specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain* 122: 27--39
- de Vries HE, Hoogendoorn KH, van Dijk J, Zijlstra FJ, van Dam AM, Breimer DD et al.(1995) Eicosanoid production by rat cerebral endothelial cells: stimulation by lipopolysaccharide, interleukin-1 and interleukin-6. *J Neuroimmunol* 59(1- 2):1-8.

- del Rey A, Voigt K, Besedovsky HO.(2007) Bidirektionale Kommunikation zwischen den Hormonachsen und dem Immunsystem. In: Straub RH, (Hrsg.). Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht;
- Dighiero G, Lymberi P, Mazié JC, Rouyre S, Butler-Browne GS, Whalen RG, Avrameas S (1983b). Murine hybridomas secreting natural monoclonal antibodies reacting with self antigens. *J Immunol.* 134: 765-771
- Dropcho EJ.(1996) Antiampiphysin antibodies with small--cell lung carcinoma and paraneoplastic encephalomyelitis. *Ann Neurol* 39: 659--667
- Engelhardt B, Ransohoff RM.(2005) The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*;26:485-495.
- Filippi, M., T. Yousry, A. Campi, C. Kandziora, B. Colombo, R. Voltz, V. Martinelli, S. Spuler, S. Bressi, G. Scotti and G. Comi (1996). Comparison of triple dose versus standard dose gadolinium-DTPA for detection of MRI enhancing lesions in patients with MS. *Neurology* 46: 379-384.
- Gasque, P., Fontaine, M., and Morgan, B.P. (1995) Complement expression in human brain. *J. Immunol.* 154, 4726-4733
- Gasque, P., Ischenko, A., Legoedec, J., Mauger, C., Schouft, M.-T., and Fontaine, M. (1993) Expression of the complement pathway by human glioma in culture. A model for complement expression by nerve cells. *J. Biol. Chem.* 268, 25068-25074
- Gasque, P., Jones, J., Singhrao, S.K., and Morgan, B.P. (1998) Identification of an astrocyte population from human brain that expresses perforin, a cytotoxic protein implicated in immune defense. *J. Exp. Med.* 187, 451-460
- Geisberger, R; Lamers, M; Achatz, G.(2006) "The riddle of the dual expression of IgM and IgD." *Immunology*; 118: 429-37
- Graus F, Cordon--Cardo C, Posner JB.(1985) Neuronal antinuclear antibody in sensory neuropathy from lung cancer. *Neurology.* 35: 538--543

- Gray F, Serdaru M , Baron H et al (1987) Chroniklocalised enzephalitis (Rasmussen`s) in an adult with epilepsia partialis continua. J Neurol Neurosurg Psychiatry 50:747-751
- Grissmer, S., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., Goldin, A. L., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., Chandy, K. G.(1990): Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (23): 9411 - 9415
- Grissmer, S., Nguyen, A. N., Aiyar, J., Hanson, D. C., Mather, R. J., Gutman, G. A., Karmilowicz, M. J., Auperin, D. D., Chandy, K. G.(1994): Pharmacological Characterization of Five Cloned Voltage-Gated K⁺ Channels, Types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, Stably Expressed in Mammalian Cell Lines; Mol. Pharmacol., 45 (6): 1227 – 1234
- Grissmer, S., Nguyen, A. N., Aiyar, J., Hanson, D. C., Mather, R. J., Gutman, G. A., Karmilowicz, M. J., Auperin, D. D., Chandy, K. G.: Pharmacological Characterization of Five Cloned Voltage-Gated K⁺ Channels, Types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, Stably Expressed in Mammalian Cell Lines; Mol. Pharmacol. (1994), 45 (6): 1227 – 1234
- Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B. & Sigworth F.J. (1981) Improved patch clamp techniques for high- resolution current recording from cells and cell- free membrane patches. Pflügers Arch. 391: 85-100
- Han, S; Zhang, X; Xu, R; Finkelmann, FD; Brombacher, F; Zheng, B. "IgD+IgM- B cells mount immune response that exhibit altered antibody repertoire." J Immunol 2004; 34: 661-668
- Hao, Junwei, et al. "Central nervous system (CNS)–resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology." The Journal of experimental medicine 207.9 (2010): 1907-1921.
- Hart YM, Andermann F, Fish DR et al. (1997) Chronic encephalitis und epilepsy in adults and adolescents: a variant of Rasmussen`s syndrome? Neurology 48:418-424
- Hausmann R, Kaiser A, Lang C, Bohnert M, Betz P.(1999) A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. Int J Legal Med;112(4):227-232.
- Häusser G, Ludewig B, Gelderblom HR, Tsunetsugu-Yokota Y, Akagawa K, Meyerhans A

(1997): Monocyte-Derived Dendritic Cells Represent a Transient Stage of Differentiation in the Myeloid Lineage. *Immunobiol* 197:534-542.

Havran WL and Boismenu R, Activation and function of gamma delta T cells, *Curr Opin Immunol* 1994, 6: 442-6

Hickey WF, Hsu BL, Kimura H (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* ;28(2):254-260.

Hickey WF, Kimura H.(1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*;239(4837):290-292.

Hickey WF.(2001) Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia*;36(2):118-124.

Hille, B. (1992) Ionic channels in excitable membranes. Sinauer Associates inc. Publishers, Sunderland. Massachusetts.

Hodgkin AL. & Huxley AF. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116: 449-472.

Hohlfeld, R., Toyka, K. V., Besinger, U. A., Gerhold, B., & Heininger, K. (1985). Myasthenia gravis: Reactivation of clinical disease and of automimmune factors after discontinuation of long-term azathioprine. *Annals of neurology*, 17(3), 238-242.

Holmes, T. C., Fadool, D. A. And Levitan I. B.(1995) Tyrosine Phosphorylation of the Kv 1.3 Potassium Channel *Journal of Neuroscience*, 16 (5): 1581-1590

Honnorat J, Antoine JC, Belin MF (2001) Are the "newly discovered" paraneoplastic anticollapsin response--mediator protein 5 antibodies simply anti--CV2 antibodies? *Ann Neurol.* 50: 688--691

Honnorat J, Antoine JC, Derrington E, Aguera M, Belin MF(1996) Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;; 61: 270-- 278

Janeway C., Travers P., (2009) Immunologie. Spektrum Akad. Verlag, 7 Auflage Heidelberg.

- Yeh, J. H., & Chiu, H. C. (2000). Comparison between double-filtration plasmapheresis and immunoadsorption plasmapheresis in the treatment of patients with myasthenia gravis. *Journal of neurology*, 247(7), 510-513.
- Jumper, MD; Splawski, JB; Lipsky, PE; Meek, K.(1994) "Ligation of CD40 induces sterile transcripts of multiple Ig H chain isotypes in human B cells." *J Immunol*; 152: 438-45
- Kinirons P, Fulton A, Keoghan M, Brennan P, Farrell MA, Moroney JT (2003) Paraneoplastic limbic encephalitis (PLE) and chorea associated with CRMP--5 neuronal antibody. *Neurology*. 61: 1623--1624
- Koll RA. Prinzip und Leistung der Ig-Therasorb®-Immunoabsorption. In Brunkhorst R, Koch KM, Koll RA. *Klinische Immunadsorption: eine aktuelle Standortbestimmung*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 2000: 17-26
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S.(1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* ;48(2):405-415.
- Levi-Strauss, M., and Mallat, M. (1987) Primary cultures of murine astrocytes produce C3 and factor B. Two components of the alternative pathway of complement activation. *J. Immunol*. 139, 2361-2366
- Link H, Huang Y-M, Xiao B-G (1999): Dendritic cells in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 100(1-2) 102-110.
- Lodisch H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Darnell J., (1996) *Molekulare Zellbiologie*. 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin.
- Lymberi P, Avrameas S Autoimmunity induced by HgCl₂ in Brown-Norway rats. II. Monoclonal antibodies sharing specificities and idiotypes with mouse natural monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1986 May 1;136(9):3277-81.
- Maier SF.(2003) Bi-directional immune-brain communication: Implications for understanding stress, pain, and cognition. *Brain Behav Immun* 17(2):69-85.
- Maizels, N. (2005)"Immunoglobulin gene diversification." *Annu Rev Genet*; 39: 23- 46
- Mantegazza R, Bernasconi P, Baggi F et al (2002) Antibodies against GluR3 peptides are

not specific for Rasmussen`s encephalitis but are also present in epilepsy patients with severe,early onset disease and intractable seizures. J Neuroimmunol 131:179-185

McCormack, T., McCormack,K.,Nadal, M. S., Vieira, E, Ozaita, A and Rudy, B. (1999) The Effects of Shaker beta-Subunits in the Human Lymphocyte K⁺ Channel Kv 1.3 J.Biol. Chem.,274:20123-20126

Medawar PB.(1948) Immunity to homologous grafted skin: III. Fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. Br J Exp;29:58-69.

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. Acta Neuropathol 101: 249-255

Morgan, B.P., and Gasque, P. (1996) Expression of complement in the brain: role in health and disease. Immunol. Today 17, 461-466

Morteza Ziaeeian: Pathogene Wirkung von Autoantikörpern gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle Dissertation (Med. Fak.) 2008

Nagado, T., Arimura, K., Donoda, Y., Kurono, A., Horikii, Y., Kameyama, A., Kameyama, M., Pongs, O., Osame, M. (1999). Potassium current suppression in patients with peripheral nerve hyper excitability. Brain 122: 2057-2066

Neumann, H., A. Cavalie, D. E. Jenne and H. Wekerle (1995). Induction of MHC class I genes in neurons. Science 269: 549-552.

Neumann, H., J. Boucraut, C. Hahnel, T. Misgeld and H. Wekerle (1996). Neuronal control of MHC class II inducibility in rat astrocytes and microglia. Eur J Neurosci 8: 2582-2590 of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic cells in Vivo .Immunity 11:753-761.

Numberger M, Draguhn A (1996). Patch-Clamp-Technik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin Oxford.

Oguni H, Andermann F, Rasmussen TB (1991) The natural history of the syndrome of chronic encephalitis und epilepsy : a study of the MNI series of forty-eight cases Adv

Neurol 57:419-433

- Oguni H, Andermann F, Rasmussen TB (1992) The syndrome of chronic encephalitis and epilepsy. A study based on the MNI series of 48 cases. *Adv Neurol* 57:419-433
- Papazian DM., Timpe LC., Jan YN., Jan LY. (1991) Alteration of voltage dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 349: 305-310.
- Pashenkov M, Huang Y-M, Kostulas V, Haglund M, Söderström M, Link H (2001): Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 124 (Pt3):480-92
- Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H.(1997) Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res* 48(4):287-98.
- Priller J, Flügel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA., Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I., de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U.(2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med*;7(12):1356-1361.
- Qing Z, Sewell D, Sandor M, Fabry Z.(2000) Antigen-specific T cell trafficking into the central nervous system. *J Neuroimmunol*;105(2):169-178
- Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinmann RM, Muller WA (1999): Differentiation
- Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G(2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunology*;3(7):569-581
- Rasmussen T, Olaszewski J, Lloyd-Schmidt D (1958), Focal seizures due to chronic localized encephalitis. *Neurology* 8:435-445
- Rasmusson, R. L., Morales, M. J., Wang, S., Liu, S., Campbell, D. L., Brahmajothi, M. V., Strauss, H. C.:(1998) Inactivation of Voltage-Gated Cardiac K⁺ Channels; *Circ. Res.* 82 (7): 739 - 750
- Robitaille Y.(1991) Neuropathological aspects of chronic encephalitis. In:Andermann F (ed).Chronic Encephalitis und Epilepsy. Rasmussen`s Syndrome. Stoneham: Butterworth-Heinemann 1991; 79-110

- Rogers SW, Andrews PI, Gahring LC et al (1994) Autoantibodies to glutamate receptor GluR3 in Rasmussen`s encephalitis. *Science* 265:648-651
- Roitt I.M., Brosdorff J., Male D.K., (1995) *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schoenberger SP, van der Voort EI, Krietemeijer GM, et al., Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells, *J Immunol* 1998, 161: 3808-12
- Schwab N, Bien C, Waschbisch A et al. (2009) CD8+ T-cell clones dominate brain infiltrates in Rasmussen encephalitis und persist in the periphery , *Brain* 2009: 132; 1236-1246
- Schwartz JC, Zhang X, Nathenson SG, et al., Structural mechanisms of costimulation, *Nat Immunol* 2002, 3: 427-34
- Sheng, Z. F., Skach, W., Santarelli, V. And Deutsch, C. (1997) Evidence for Interaction between Transmembrane Segments in Assembly of Kv 1.3, *Biochemistry*. 36, 15501-15513
- Shillito, P., Molenaar, P.C., Vincent A., Leys, K., Zheng, W., Van den Berg, R.J., Plomp, J.J., van Kempen, G.T., Chauplannaz, G., Wintzen, A.R. (1995) Channels of peripheral nervs. *Ann. Neurol.*, 38:714-722
- Shrikant, P., and Benveniste, E.N. (1996) The central nervous system as an immunocompetent organ. *J. Immunol.* 1819-1822
- Soares HD, Hicks RR, Smith D, McIntosh TK.(1995) Inflammatory leukocytic recruitment and diffuse neuronal degeneration are separate pathological processes resulting from traumatic brain injury. *J Neurosci* ;15(12):8223-8233.
- Streilein JW, Ksander BR, Taylor AW(1997) Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J Immunol* 158: 3557-3560
- Streit WJ, Kincaid-Colton CA (1995) The brain's immune system. *Sci Am* 273: 54- 55, 58-61

- Tan et al. (2008) Clinical spectrum of voltage-gated potassium channel autoimmunity. *Neurology* 70(20):1883-90.
- Tempel BL., Papazian DM., Schwarz TL., Jan YN., Jan LY. (1987) Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of *Drosophila*. *Science* 237: 770-775
- Thilo, B., Stिंगele, R., Knudsen, K., Boor, R., Bien, C. G., Deuschl, G., & Lang, N. (2009). A case of Rasmussen encephalitis treated with rituximab. *Nature Reviews Neurology*, 5(8), 458-462.
- Vernino S, Tuite P, Adler CH, Meschia JF, Boeve BF, Boasberg P, Parisi JE, Lennon VA (2002) Paraneoplastic chorea associated with CRMP--5 neuronal antibody and lung carcinoma. *Ann Neurol.* 51: 625--630
- Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, Clover L, Parkinson A, Bien CG, Omer S, Lang B, Rossor MN, Palace J. (2004) Potassium channel antibody-- associated encephalopathy: a potentially immunotherapy--responsive form of limbic encephalitis. *Brain.* 127: 701--712
- Vincent, Angela, et al. "Autoantibodies associated with diseases of the CNS: new developments and future challenges." *The Lancet Neurology* 10.8 (2011): 759-772.
- Vollmar, A., Dingeremann, T., Zündorf, I. und Rickl, V. (2005). *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, Gerstner E, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. (1999) A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain--stem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Engl J Med.* 1999;; 340: 1788--1795
- Voltz R.(2002) Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis, and therapy. *Lancet Neurol.* 1: 294--305
- Wang, W., Hebert, S. C., Giebisch, G (1997) Renal K⁺ Channels: Structure and Funktion *Annu. Rev. Physiol.*; 59:413-436
- Watson, R. Et al. A7-Acetylcholine receptor antibodies in two patients with Rasmussen encephalitis. *Neurology* 65, 1802-1804 (2005)

- Wekerle H.(1993) Lymphocyte traffic to the brain. In: The blood-brain barrier. W.M. Partridge, ed., New York, Raven Press ;67-85.
- Wekerle, H. (2002). Immune protection of the brain--efficient and delicate. *J Infect Dis* 186: S140-144.
- Wingerchuk, D. M., C. F. Lucchinetti and J. H. Noseworthy (2001). Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest* 81: 263-281.
- Wulff, Heike, et al. "K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity." *The Journal of Immunology* 173.2 (2004): 776-786.
- Yu Z, Kryzer TJ, Griesmann GE, Kim K, Benarroch EE, Lennon VA (2001) CRMP--5 neuronal autoantibody: marker of lung cancer and thymoma--related autoimmunity. *Ann Neurol*. 49: 146--154
- Zhao, B., and Schwartz, J. (1998) Involvement of cytokines in normal CNS development and neurological disease: recent progress and perspectives. *J. Neurosci. Res.* 52, 7-16
- Zhou LJ, Tedder TF (1996): CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 93:2588-2592.
- Zhou, Ben-Yuan, Wei Ma, and Xin-Yun Huang. "Specific antibodies to the external vestibule of voltage-gated potassium channels block current." *The Journal of general physiology* 111.4 (1998): 555-563.
- Zinkernagel RM and Doherty PC, Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system, *Nature* 1974, 248: 701-2
- Zuberi SM, Mignot E, Ling L et al. Variable response to intravenous immunoglobulin therapy in childhood narcolepsy. *J Sleep Res* 2004; 13 (Suppl. 1): 828 7 Danksagung

7 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. J. Schmidtmayer bedanken, denn Sie brachten mir sehr viel Geduld entgegen und sorgten mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Kerstin Kronenbitter die mir mit ihre Erfahrungen immer tatkräftig zur Seite stand.

Mein Dank richtet sich auch an Prof. Dr. Ralph Lucius (Anatomisches Institut Uni Kiel) für die freundliche Einreichen von Astrozytenkulturen, für die Gliomazelllinien an Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Janka Held-Feindt (Klinik für Neurochirurgie UKSH), und für das Eulat und Serum an PD Dr. med. Nicolas Lang und Frau Dr. med. Barbara Schmalbach(Klinik für Neurologie UKSH).

Auch möchte ich mich bei meine Frau Yana Ivanov bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt hat, sondern mich stets aufbaute und für die erforderliche Abwechslung sorgte. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre. Ein großer Dank geht aber auch an meinen Kollegen, denn die Zusammenarbeit mit Ihnen war ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Sie gaben mir mit Ihrem fundierten Fachwissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit. Ohne Ihr Wissen, ohne Ihre Ideen und Ihre Kritik wäre mein Forschungsprojekt niemals soweit gekommen.

Danke

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stanislav Ivanov
Geburtsdatum: 21.12.1981
Geburtsort: Lovech, Bulgarien
Staatsbürgerschaft: deutsch, bulgarisch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulischer Werdegang:

1988-1995 Hristo Nikiforov, Grundschule
1995 - 2000 Eksarh Josiff I, Fremdsprachen-Gymnasium (Schwerpunkt Englisch)
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Okt. 2000-Okt. 2001 Universität Sofia, Studiengang Biologie, ohne Abschluss
Jan.-Juni 2002 Besuch von Sprachkurs (1442 Std., Deutsch)
Sept. 2002-Sept. 2004 Universität Osnabrück, Gasthörer, nach Bestehen der deutschen Sprachprüfung für den Hochschulzugang 30.03.2004 eingeschriebener Student, Studiengang Informatik
10.2004-12.2009 Studium der Zahnmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10.2008-heute Studium der Humanmedizin, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Abschlüsse

09.2005 Naturwissenschaftliche Vorprüfung Zahnmedizin
03.2007 Zahnärztliche Vorprüfung
12.2009 Zahnärztliche Prüfung (Abschlussprüfung)
08.2010 1 Ärztliche Prüfung (Mündlich)
03.2011 1 Ärztliche Prüfung (Schriftlich)