

Aus dem Institut für Klinische Chemie
(Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Junker)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die genetische Prädisposition der Anti-NMDA-Rezeptor
Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis**

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
vorgelegt von

Anna Katharina Färber, geb. Peuser aus Leipzig
Kiel 2019

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Frank Leypoldt, Institut für Klinische
Chemie

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Petra Bacher, Institut für Klinische
Molekularbiologie

Tag der mündlichen Prüfung: 11.08.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 28.02.2020

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Der Begriff Enzephalitis	1
1.2 Autoimmune Enzephalitis	1
1.3. Die Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Enzephalitis (anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis).....	4
1.3.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	4
1.3.2 Pathophysiologie	4
1.3.3 Klinik und Symptome	5
1.3.4 Diagnostik.....	6
1.4 Die Anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 Enzephalitis (Anti-Lgi1 Enzephalitis).....	7
1.4.1 Epidemiologie und Ätiologie.....	7
1.4.2 Pathophysiologie	8
1.4.3 Klinik und Symptome	9
1.4.4 Diagnostik.....	10
1.4.5 Therapie und Prognose.....	10
1.5 Prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer Enzephalitis	10
1.6 Der Major Histocompatibility Complex (MHC).....	11
1.6.1 MHC-Nomenklatur.....	12
1.7 GWAS – Genome-Wide Association Studies (deutsch: Genomweite Assoziationsstudien).....	12
1.8 Fragestellung der Arbeit	14
2. Methoden.....	15
2.1 Patientenrekrutierung.....	15
2.2 Sammlung von DNA-Proben.....	17
2.3 Kontrollgruppe	17
2.4 Angewandte Software.....	18

2.5 Berechnung der statistischen Trennschärfe (Power).....	18
2.6 Genotypisierung.....	19
2.7 Qualitätskontrolle der Genotypisierungsdaten.....	20
2.7.1 Qualitätskontrolle der Proben.....	21
2.7.2 Qualitätskontrolle der genotypisierten Marker.....	22
2.8 Imputation.....	24
2.9 Assoziationsanalyse.....	24
2.10 HLA-Imputation.....	27
2.11 HLA-Assoziationsanalyse.....	28
3. Ergebnisse.....	29
3.1 Patientenkohorte.....	29
3.2 Assoziationsanalyse der einzelnen Marker.....	31
3.2.1 Assoziationsanalyse in der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe.....	31
3.2.2 Assoziationsanalyse in der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitisgruppe...34	
3.3 Assoziationsanalyse der HLA-Region.....	35
3.3.1 HLA-Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis.....	36
3.3.2 Die Anti-Lgi1 Enzephalitis und assoziierte Haplotypen.....	36
3.3.3 HLA-Assoziation der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis.....	38
3.4 Zusammenfassung.....	39
4. Diskussion.....	40
4.1 Ergebnisdiskussion in Bezug auf die Anti-Lgi1 Enzephalitis.....	40
4.1.1 Markerbezogene Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis.....	40
4.1.2 HLA-Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis.....	42
4.1.3 Genetische Assoziationen in anderen Studien.....	43
4.2 Gegenüberstellung der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis.....	44
4.2.1 Der Unterschied zwischen Assoziation mit MHC-I und MHC-II Allelen...44	
4.3 Limitationen der Studie.....	45
4.4 Ausblick.....	46
4.5 Schlussfolgerungen.....	46
5. Zusammenfassung.....	48
6. Literaturverzeichnis.....	50
7. Anhang.....	59

Erklärung.....	64
Danksagung.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Antikörperwirkung auf verschiedene Zielantigene	3
Abbildung 2: Einfluss von Antikörpern auf Lgi1 in der Synapse	9
Abbildung 3: Linkage Disequilibrium.....	14
Abbildung 4: Genotypisierung auf dem Global Screening Array	20
Abbildung 5: Quantil-Quantil Diagramm.....	26
Abbildung 6: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe.	32
Abbildung 7: Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis mit Markern der HLA-Region.....	32
Abbildung 8: Weitere Assoziationen in der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe	33
Abbildung 9: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Anti-NMDAR Enzephalitisgruppe	35
Abbildung 10: Verteilung der heterozygoten und homozygoten Haplotypen	38
Abbildung 11: Berechnung der Power (statistische Trennschärfe).....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausschlusskriterien bei der Patientenrekrutierung.....	29
Tabelle 2: Klinische Informationen zu den 3 Studienkohorten	30
Tabelle 3: Ergebnisse der HLA-Assoziationstestung der Anti-Lgi1 Enzephalitis	36
Tabelle 4: Mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis assoziierte Haplotypen	37
Tabelle 5: Ergebnisse der HLA-Assoziationstestung in der Anti-NMDAR Enzephalitisgruppe	38
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ausschlusskriterien für genotypisierte Marker während der Qualitätskontrolle.	59
Tabelle 7: Hoch signifikant mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis assoziierte SNPs auf Chromosom 6	62

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein
ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor
CASPR	Contactin-associated protein
DCLK	Double Cortin Like Kinase
DNA	Deoxyribonucleic acid (DNS – Desoxyribonukleinsäure)
EEG	Elektroenzephalogramm
FBDS	Faciobrachial dystonic seizures
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
GAD 65	Glutamat-Decarboxylase 65
GWAS	Genome-wide Association Study/Genomweite Assoziationsstudie
HLA	Human Leucocyte Antigen
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
LD	Linkage Disequilibrium
Lgi1	Leucine-rich glioma-inactivated 1
MAF	Minor Allele Frequency
Mbp	Megabase pair
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomografie
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ZNF	Zinkfinger Gen

1. Einleitung

1.1 Der Begriff Enzephalitis

Enzephalitis ist die Bezeichnung für eine entzündliche Erkrankung des Gehirngewebes, die mit einer erheblichen Beeinträchtigung der Gehirnfunktionen einhergeht (Tunkel et al., 2008). Die Symptome können unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Häufig kommt es zu einem veränderten Bewusstseinszustand, epileptischen Anfällen und fokalen neurologischen Defiziten (Armangue et al., 2012).

Die Inzidenz von Enzephalitiden in England wurde auf 5,23/100000 Einwohner im Jahr geschätzt (Granerod et al., 2013) und eine von 1998 bis 2010 in den USA durchgeführte Studie ergab eine Hospitalisierungsrate von 6,9/100000 Einwohner im Jahr (Vora et al., 2014).

Die Ursachen für Enzephalitiden sind vielfältig. In einem Großteil der Fälle sind Enzephalitiden infektiöser Genese und können durch verschiedenste Erreger, vor allem Viren, ausgelöst werden. Im Rahmen einer Studie des California Encephalitis Project, einem Projekt zur Erforschung der Ätiologie und Epidemiologie von Enzephalitiden, blieb die Ätiologie in vielen Erkrankungsfällen trotz ausführlicher Diagnostik ungeklärt. Im Rahmen dieser Studie wurden die Patienten auf 16 verschiedene Erreger getestet. Bei 63% von 1570 Fällen konnte keine eindeutige Ursache festgestellt werden (Glaser et al., 2006).

Neuere Entdeckungen zeigen inzwischen jedoch, dass viele Formen von Enzephalitiden durch Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene ausgelöst werden, was in vielen zuvor ungeklärten Enzephalitisfällen eine Diagnose ermöglicht (Gable et al., 2012).

Wichtig ist dabei allerdings weiterhin ihre Abgrenzung zu infektiösen Enzephalitiden, deren klinisches Erscheinungsbild sehr ähnlich aussehen kann.

1.2 Autoimmune Enzephalitis

Der Begriff autoimmune Enzephalitis umfasst heute mehrere Krankheitsbilder mit jeweils eigener Pathophysiologie (Lancaster, 2016). Autoimmune Enzephalitiden zeigen überwiegend einen subakuten Beginn der Symptomatik über Tage und Wochen mit einer chronisch progredienten Verschlechterung von Gedächtnis und Bewusstsein bis

hin zum Koma. Häufig lassen sich Hinweise auf Entzündung im Liquor und gelegentlich im Schädel-MRT finden (Lewerenz et al., 2016).

Unterscheiden lassen sich autoimmune Enzephalitiden einerseits mit dem Nachweis von Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene, andererseits mit Antikörpern gegen Oberflächenstrukturen wie synaptische Rezeptoren, Ionenkanäle und andere Proteine auf der Oberfläche von Neuronen.

Enzephalitiden mit Antikörpern gegen nicht-synaptische intrazelluläre Proteine, wie zum Beispiel Hu-Antigen D oder Ma1 und 2, werden auch „klassisch“ paraneoplastische Enzephalitiden genannt. Diese Bezeichnung entstand, weil die meisten dieser Antikörper parallel zu einer Tumorerkrankung auftreten und die Zielantigene von Neuronen und Krebszellen exprimiert werden. Diese Antikörper scheinen aber selbst nicht direkt pathogen zu sein, sondern zu T-Zell-vermittelter Autoimmunität zu führen, welche Neurone angreift (Lancaster und Dalmau, 2012). Die Prognose dieser Enzephalitiden ist schlecht, da es oft zu irreversibler Schädigung und zum Absterben von Neuronen kommt (Lancaster, 2016).

Eine weitere Gruppe autoimmuner Enzephalitiden zeichnet sich durch Antikörper gegen synaptische intrazelluläre Proteine aus. Dazu zählen Glutamat-Decarboxylase 65 (GAD65) und Amphiphysin. Vor allem bei Amphiphysin besteht eine Assoziation zum Mammakarzinom. Es wird vermutet, dass auch hier T-Zell-vermittelte Mechanismen für die Ausprägung des Krankheitsbildes verantwortlich sind (Lancaster und Dalmau, 2012).

Bei Enzephalitiden mit Antikörpern gegen synaptische Oberflächenantigene, seien es Rezeptoren (z.B. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor, im Weiteren NMDA-Rezeptor) oder Proteine, die an der synaptischen Organisation beteiligt sind (z.B. Leucine-rich glioma-inactivated 1, auch Lgi1), handelt es sich um eine ganz anders zu charakterisierende Gruppe, die sich von den zuvor beschriebenen autoimmunen Enzephalitiden unterscheidet. Die Erforschung, Beobachtung und Beschreibung dieser Enzephalitiden zeigt, dass es sich bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis (Armangue et al., 2012) und der Anti-Lgi1 Enzephalitis (Irani et al., 2010) um die beiden häufigsten autoimmunen Enzephalitiden handelt.

Hervorzuheben ist, dass diese Antikörper direkt pathogen auf ihr Zielantigen wirken und es in seiner Funktion beeinträchtigen. Tatsächlich ähneln die klinischen Symptome den Auswirkungen, die auch eine genetische oder eine pharmakologische Modifikation des Zielantigens hervorrufen würde (Lancaster und Dalmau, 2012).

Somit ist die Entdeckung dieser Gruppe von Enzephalitiden nicht nur von klinischer Relevanz, sondern ermöglicht auch Einblicke in die Funktion der Neurotransmitter, deren Rezeptoren durch die Antikörper angegriffen werden (Moscatto et al., 2010). Ein weiterer Unterschied zu den klassischen paraneoplastischen Enzephalitiden ist, dass die Symptome durch adäquate Therapie, das heißt durch eine Immuntherapie, sowie durch eine Verminderung des Antikörpertiters gelindert werden können. Dies zeigt, dass der antikörper-vermittelte Effekt auf das Antigen reversibel ist (Dalmau et al., 2008).

Eine Assoziation zu Tumorerkrankungen ist nicht bei allen Unterformen dieser Gruppe zu beobachten. Liegt aber ein Tumor vor, wie es zum Beispiel bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis häufig der Fall ist, führt die Entfernung des Tumors zu einer Verbesserung der neurologischen Symptomatik (Lancaster und Dalmau, 2012).

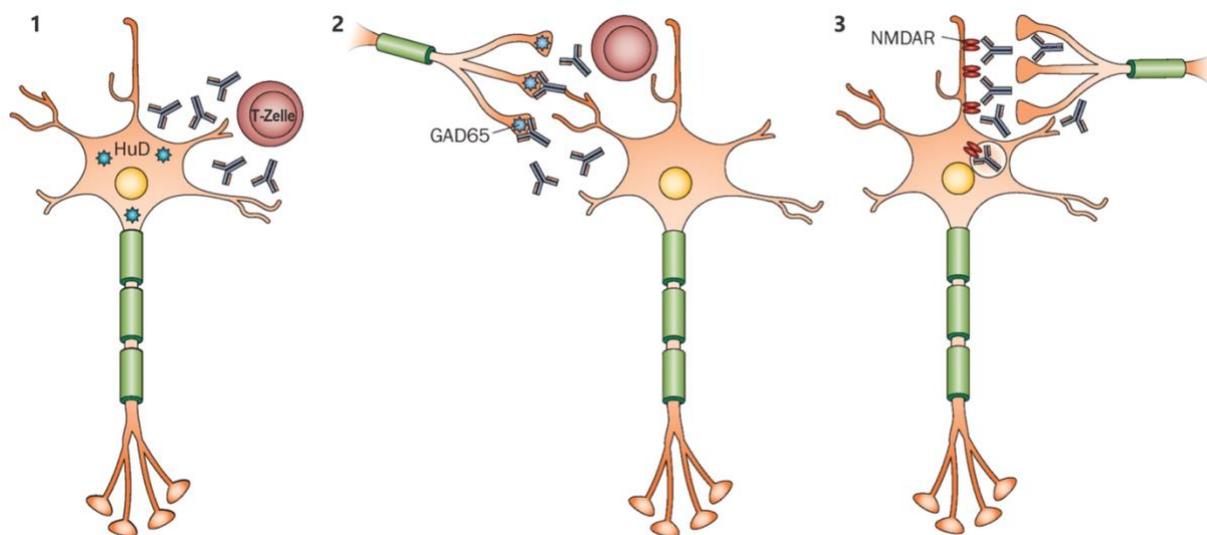


Abbildung 1: Antikörperwirkung auf verschiedene Zielantigene

Die Abbildung zeigt verschiedene Auswirkungen von Autoantikörpern entsprechend des betroffenen Zielantigens.

- 1) Autoantikörper gegen intrazelluläre Antigene, wie HuD, lösen eine T-Zell-vermittelte Reaktion aus.
- 2) Synaptische intrazelluläre Antigene, wie GAD65, werden von Antikörpern und von T-Zellen angegriffen.
- 3) Rezeptoren, wie der NMDAR, an der Zelloberfläche werden direkt von Autoantikörpern beeinträchtigt. Die Bindung der Antikörper führt zur Vernetzung und Internalisierung der Rezeptoren.

HuD=RNA-bindendes Protein

GAD65=65 kD Glutamic Acid Decarboxylase

NMDAR=N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor

(adaptiert aus Lancaster und Dalmau, 2012)

1.3. Die Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Enzephalitis (anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis)

1.3.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis gilt als häufigste antikörper-assoziierte, autoimmune Enzephalitis (Granerod et al., 2010). Im California Encephalitis Project übertraf die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis seit ihrer Entdeckung sogar alle viralen Infektionen als Auslöser für eine Enzephalitis (Gable et al., 2012). Die Erkrankung befällt vor allem junge Erwachsene und Kinder, wobei Frauen häufiger erkranken. Allerdings kann die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis Menschen jeden Alters betreffen.

In einer Untersuchung von 577 Patienten zeigte sich ein medianes Erkrankungsalter von 21 Jahren, wobei 37% der Patienten jünger als 18 Jahre waren und 5% älter als 45 Jahre. Bei 88% der Patienten handelte es sich zwar um Frauen, aber gerade bei den sehr jungen Patienten unter 12 Jahren waren überwiegend Jungen und im Altersbereich über 45 Jahre gehäuft Männer betroffen. Darüber hinaus fiel auf, dass 205 Frauen zwischen 12 und 45 Jahren ein ovarielles Teratom aufwiesen. Daraus lässt sich eine starke Assoziation dieses Tumors mit der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis ableiten. Für andere Tumoren konnte keine eindeutige Assoziation festgestellt werden (Titulaer et al., 2013).

Diese Studie bestätigte vorherige Beschreibungen des gemeinsamen Auftretens von ovariellen Teratomen und der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis, wobei in den untersuchten Tumoren Nervengewebe und NMDA-Rezeptoren nachgewiesen wurden (Dalmau et al., 2008). Somit lag die Vermutung nahe, dass der Tumor eine entscheidende Rolle dabei spielt, die autoimmune Reaktion gegen den NMDA-Rezeptor auszulösen (Tüzün et al., 2009).

1.3.2 Pathophysiologie

Die anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis ist die Folge einer hochspezifischen autoantikörper-vermittelten Immunreaktion gegen die N-terminale extrazelluläre Domäne der NR1-Untereinheit des glutamatergen NMDA-Rezeptors. Bei diesen Antikörpern handelt es sich um Immunglobulin G Autoantikörper, die sich im Serum und im Liquor der Patienten nachweisen lassen, wobei eine intrathekale Synthese der Antikörper vorliegt (Dalmau et al., 2008).

Die Antikörper verursachen eine selektive und reversible Internalisierung von NMDA-Rezeptoren und führen so zu einer verminderten Rezeptordichte an der Synapse. Ursächlich für diese Internalisierung ist die Bindung der Antikörper an den Rezeptor und dessen Crosslinking (Vernetzung) mit anderen Rezeptoren. Die verminderte Rezeptordichte an der Synapse führt zu einem Verlust der Glutamat-vermittelten Effekte. Bemerkenswert ist zudem, dass die Antikörper keinen Einfluss auf andere Rezeptoren der Synapse nehmen und keine grundlegenden strukturellen Veränderungen an der Synapse verursachen oder gar die Anzahl der Synapsen mindern (Hughes et al., 2010).

Das Ausmaß der Antikörperwirkung ist abhängig von der Antikörperkonzentration. So finden sich bei Patienten mit besonders schwerwiegendem Krankheitsbild höhere Antikörpertiter im Liquor als bei Patienten mit weniger stark ausgeprägten Symptomen. Weiterhin zeigt sich mit Verbesserung des klinischen Bildes auch ein Abfall der Antikörperkonzentration (Dalmau et al., 2008). Diese Beobachtungen passen zu der Feststellung, dass die Entfernung der Antikörper zu einer erneuten und normalen Expression der NMDA-Rezeptoren an der synaptischen Oberfläche führen (Hughes et al., 2010).

1.3.3 Klinik und Symptome

Das mit NMDA-Rezeptor-Antikörpern assoziierte Syndrom beginnt häufig mit prodromalen Erscheinungen wie Kopfschmerzen, Fieber und anderen Symptomen, die an einen viralen Infekt denken lassen. Innerhalb von zwei Wochen entwickeln die Patienten dann dominante psychiatrische Symptome und Verhaltensänderungen, weshalb viele Patienten zu Anfang eine psychiatrische Behandlung erfahren. Schließlich kommen weitere Symptome hinzu, die eine umfassende neurologische und gegebenenfalls intensivmedizinische Betreuung notwendig machen (Dalmau et al., 2011).

Zu den vorherrschenden psychiatrischen Symptomen gehören Angstzustände, Agitiertheit, wahnhafte paranoide Gedanken, visuelle und akustische Halluzinationen. Diesen psychiatrischen Störungen folgen üblicherweise verschiedene andere Symptome wie abnormale Bewegungen mit orofazialen Dyskinesien, Bewusstseinsverminderungen

bis hin zum Koma, epileptische Anfälle und autonome Dysregulation. Epileptische Anfälle können während des gesamten Krankheitsverlaufs auftreten, enden aber zumeist mit Abklingen der Enzephalitis, so dass keine dauerhafte antiepileptische Medikation notwendig wird. Die autonome Dysregulation mit Herzrhythmusstörungen, Hyperthermie und Hypoventilation kann bisweilen so schwerwiegende Ausmaße annehmen, dass eine intensivmedizinische Überwachung und gegebenenfalls eine Herzschrittmacherimplantation notwendig werden (Dalmau et al., 2008).

1.3.4 Diagnostik

In der Bildgebung mittels MRT lassen sich nur bei ungefähr 35% der Patienten (Titulaer et al., 2013) Auffälligkeiten nachweisen. Dabei handelt es sich um eher unspezifische kortikale oder subkortikale Signalanhebungen in FLAIR-(Fluid Attenuated Inversion Recovery) und T2-Sequenzen (Leypoldt et al., 2015).

Untersuchungen des Elektroenzephalogramms (EEG) dagegen ergeben in bis zu 90% der Fälle pathologische Veränderungen, wobei meist eine generalisierte oder fokal betont verlangsamte Aktivität vorliegt (Gable et al., 2012; Titulaer et al., 2013).

Die Analyse von Liquor ergibt bei ungefähr 80% der Patienten oft schon zu Beginn der Erkrankung oder im weiteren Verlauf einen auffälligen Befund, wie eine lymphozytäre Pleozytose, leicht erhöhte Eiweißwerte und oligoklonale Bande in der Liquorelektrophorese (Dalmau et al., 2011; Titulaer et al., 2013).

Neben diesen herkömmlichen Untersuchungen spielt insbesondere der Nachweis von Antikörpern in Liquor und Serum eine wichtige Rolle bei der Diagnostik der anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis.

Zur sicheren und spezifischen Diagnosestellung einer anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis wird empfohlen, nicht ausschließlich Serum zu testen, sondern immer auch Liquor auf Autoantikörper zu untersuchen. Die Begründung dafür liegt in der Feststellung, dass bei 14% der Patienten trotz vorliegender Enzephalitis Serum-Testergebnisse negativ ausfielen (Gresa-Arribas et al., 2014). Darüber hinaus kann die alleinige Analyse von Serum zu falsch-positiven Ergebnissen führen (Lancaster und Dalmau, 2012).

1.3.5 Therapie und Prognose

Wurde die Diagnose einer anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis gestellt, ist ein zügiger Beginn der Immuntherapie anzustreben. In der Regel kommt als Primärtherapie eine intravenöse, hochdosierte Methylprednisolonstoßtherapie zum Einsatz. Diese wird häufig mit intravenöser Immunglobulingabe, Plasmapherese oder Immunadsorption kombiniert. Etwa 50% der Patienten sprechen in den ersten 14 Tagen gut auf diese Therapie an. Die anderen 50% sollten eine Zweitlinientherapie mit Rituximab oder Cyclophosphamid erhalten. Bei Vorliegen eines Teratoms ist in erster Linie die Tumoresektion anzustreben. Allein die Entfernung des Tumors kann in vielen Fällen zur vollständigen Genesung der Patienten führen. So begründet sich auch die Wichtigkeit einer umfassenden Tumorsuche bei jedem Patienten mit einer anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis (Titulaer et al., 2013).

Ein schnellstmöglicher Therapiebeginn sowie eine frühzeitige Tumorentfernung sind letztendlich entscheidend für eine bessere Prognose. Auch haben weniger schwere Krankheitsverläufe ohne intensivmedizinische Behandlungsnotwendigkeit einen günstigeren Ausgang. Schließlich erholen sich bis zu 81% der Patienten so gut, dass sie wieder ohne Hilfe ihren Alltag bestreiten können (Titulaer et al., 2013).

1.4 Die Anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 Enzephalitis (Anti-Lgi1 Enzephalitis)

1.4.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Lgi1-Antikörper Enzephalitis, beziehungsweise deren ursächliche Autoantikörper wurden 2010 entdeckt. Bevor die Antikörper als gegen Lgi1 gerichtet identifiziert waren, wurden sie als Antikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle beschrieben, da eine funktionelle Verbindung zwischen beiden besteht (Lai et al., 2010). In den Niederlanden wurde die jährliche Inzidenz mit 0,83/1.000.000 angegeben (Sonderen et al., 2016). Im Gegensatz zur Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis erkranken an der Anti-Lgi1 Enzephalitis mehr Männer als Frauen im Verhältnis 2:1. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei etwa 63 Jahren (Irani et al., 2010; Lai et al., 2010; Sonderen et al., 2016). Eine Tumorassoziation für Anti-Lgi1-Antikörper wurde bisher nur für das Thymom angenommen (Irani et al., 2010).

1.4.2 Pathophysiologie

Bei Lgi1 handelt es sich um ein in den synaptischen Spalt sekretiertes Protein, das maßgeblich daran beteiligt ist, die physiologische Erregbarkeit von Neuronen zu regulieren. Mutationen im Lgi1-Gen führen zu einer autosomal dominanten Temporallappenepilepsie und auch bei der Anti-Lgi1 Enzephalitis treten regelmäßig epileptische Anfälle auf (Fukata et al., 2010).

Lgi1 wird vor allem im Hippocampus und im temporalen Cortex exprimiert. Dort ist Lgi1 Teil des inhibitorischen Signalweges zwischen präsynaptischen spannungsabhängigen Kaliumkanälen und postsynaptischen AMPA-Rezeptoren (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure-Rezeptor) (Sonderen et al., 2016). Entscheidend für seine regulierenden Effekte ist dabei die Interaktion zwischen Lgi1 und den Proteinen ADAM22 und ADAM23 (Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein), die ebenfalls an diesem Signalweg beteiligt sind. Insbesondere die Störung der Lgi1-ADAM22-Bindung an der postsynaptischen Seite reduziert die Anzahl von AMPA-Rezeptoren. Die Beeinträchtigung dieses Glutamat-Rezeptors führt zu einer gesteigerten Erregbarkeit der Neurone (Ohkawa et al., 2013).

Die gegen Lgi1 gerichteten Autoantikörper gehören hauptsächlich zum Immunglobulin G4 Typ (IgG4). Aus diesem Grund wird die Anti-Lgi1 Enzephalitis auch zur Gruppe IgG4-vermittelter neurologischer Autoimmunerkrankungen gezählt. IgG4-Antikörper gelten als nicht-inflammatorische Antikörper, die nicht an der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt sind. Es wird vermutet, dass sie ihre Wirkung über eine direkte Antikörper-Antigen-Bindung entfalten. Auf diese Weise verhindern sie die Bindung zwischen dem Protein, welches ihr Zielantigen ist und einem anderen Protein (Huijbers et al., 2015).

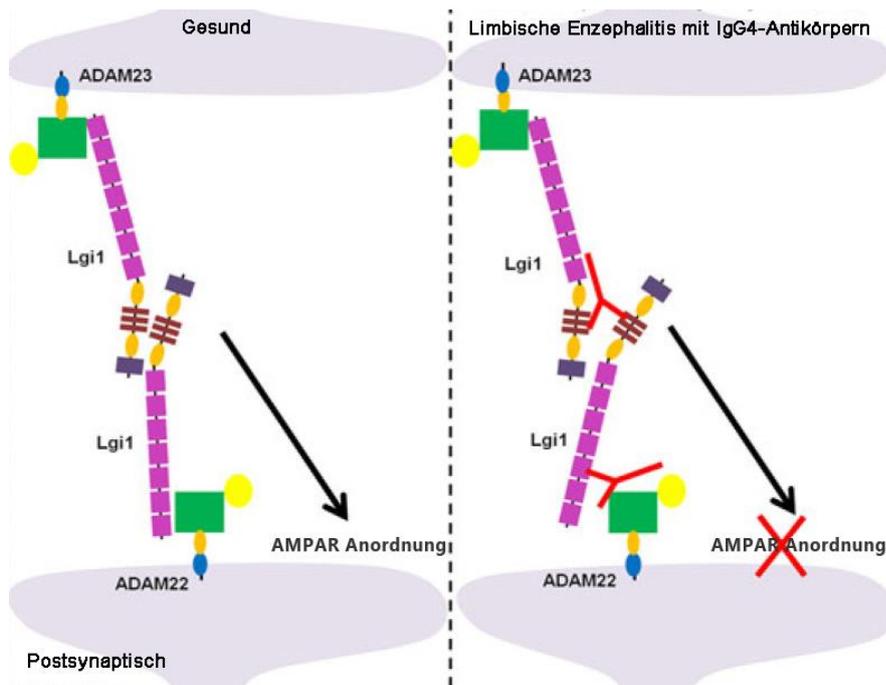


Abbildung 2: Einfluss von Antikörpern auf Lgi1 in der Synapse

Darstellung der physiologischen Protein-Protein-Interaktion, ohne Antikörper, im Vergleich zur gestörten Protein-Protein-Bindung durch Autoantikörper. Die rot dargestellten IgG4-Antikörper beeinträchtigen die Funktion von Lgi1 und somit die synaptische Anordnung von AMPA-Rezeptoren.

AMPA=α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptor

Lgi1= Leucine-rich Glioma-inactivated 1

ADAM 22 und 23= Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 22 und 23 (adaptiert aus Huijbers et al., 2015)

1.4.3 Klinik und Symptome

Das typische klinische Bild der Anti-Lgi1 Enzephalitis wird mit dem Syndrom der limbischen Enzephalitis beschrieben. Kennzeichnend hierfür sind ein subakuter Beginn mit prominenten Störungen des Kurzzeitgedächtnisses, Verhaltensänderungen und epileptische Anfälle. Ein mögliches Erstsymptom sind Faziobrachial dystone Anfälle (FBDS, Faciobrachial dystonic seizures). Dabei handelt es sich um kurze Anfälle mit schnellen Zuckungen des Gesichts und/oder des ipsilateralen Armes, die viele Male am Tag stattfinden. Diese Form der Anfälle ist sehr charakteristisch für die Anti-Lgi1 Enzephalitis und kann allen anderen Symptomen vorausgehen (Irani et al., 2011). Im weiteren Verlauf der Erkrankung werden bei fast allen Patienten unterschiedliche Formen epileptischer Anfälle beobachtet. Verhaltensauffälligkeiten äußern sich durch Apathie, Enthemmung und Zwangshandlungen. Gedächtnisstörungen sowie Desorientierung sind ebenfalls dominante Symptome. Weiterhin kann es zu

Schlaflosigkeit und autonomer Dysfunktion kommen und bei bis zu 65% der Patienten findet sich eine Hyponatriämie (Sonderen et al., 2016).

1.4.4 Diagnostik

Auch bei der Anti-Lgi1 Enzephalitis spielt der Nachweis von Antikörpern in Liquor und Serum eine entscheidende Rolle und führt zur eindeutigen Diagnosestellung (Graus et al., 2016). Im MRT-Bild lässt sich bei bis zu 80% der Patienten eine Signalanhebung in T2-oder FLAIR-Aufnahmen im medialen Temporallappen feststellen (Irani et al., 2010; Lai et al., 2010; Sonderen et al., 2016). Diese Veränderung kann sowohl einseitig als auch beidseitig auftreten (Lai et al., 2010). Das EEG kann verschiedene Auffälligkeiten zeigen. Dazu gehören epilepsietypische Potenziale und generalisierte oder fokale Verlangsamung. Die Suche nach einer lymphozytären Pleozytose oder nach erhöhten Eiweißwerten im Liquor ergibt nur bei etwa einem Drittel der Patienten pathologische Befunde (Lai et al., 2010; Sonderen et al., 2016). Eine intrathekale Antikörpersynthese ist eher selten (Graus et al., 2016).

1.4.5 Therapie und Prognose

In der Therapie der Anti-Lgi1 Enzephalitis erfolgt in der Regel das gleiche therapeutische Vorgehen wie bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis (Lancaster, 2016). Insbesondere die FBDS und anderen epileptischen Anfälle sprechen besser auf Immuntherapie als auf klassische Antiepileptika an (Irani et al., 2011).

Die meisten Patienten erholen sich durch adäquate Therapie sehr gut. Bis zu 67% der Patienten können in ihren normalen Alltag zurückkehren (Sonderen et al., 2016). Bei etwa einem Drittel der Patienten ist allerdings ein Rückfall möglich, bei welchem eine erneute Immuntherapie notwendig wird (Irani et al., 2010; Lai et al., 2010; Sonderen et al., 2016).

1.5 Prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer Enzephalitis

Es gibt verschiedene Faktoren, die offensichtlich prädisponierend für das Auftreten einer autoimmunen Enzephalitis mit neuronalen Oberflächenantikörpern sind. Vor allem für die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis wurden einige dieser Faktoren schon

genauer beschrieben. Wie oben bereits erwähnt, zählt zuallererst das Vorliegen eines ovariellen Teratoms bei jungen Frauen dazu. Allerdings erkranken auch Frauen, bei denen kein Tumor vorliegt, sowie Männer und Kinder. Somit stellt sich die Frage nach anderen Auslösern für eine Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis.

Ein weiterer bekannter Auslöser sind virale Erkrankungen. Nach einer Herpes-Simplex-Virus Enzephalitis kann es zur Bildung von Anti-NMDA-Rezeptor Antikörpern kommen (Armangue et al., 2014). Ähnliches wurde auch für das Varizella-Zoster-Virus beschrieben (Schäbitz et al., 2014).

Darüber hinaus gibt es die Beobachtung, dass es insbesondere bei Kindern, die nicht an einem Tumor leiden, zu einer saisonalen Häufung bei Erstmanifestation einer Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis kommt. Die Erkrankung beginnt vor allem während der warmen Monate April bis September (Adang et al., 2014).

Ein weiterer Ansatz ist, dass bei manchen der Patienten eine generelle Neigung zu Autoimmunerkrankungen besteht. So fanden sich beispielsweise bei einigen der Patienten auch Antinukleäre Antikörper oder Thyreoperoxidase-Antikörper (Florance et al., 2009).

Bei vielen Autoimmunerkrankungen ist die sogenannte HLA-Assoziation ein wichtiger Faktor für die individuelle Suszeptibilität zu erkranken, so zum Beispiel auch für Erkrankungen mit Anti-Hu Antikörpern (de Graaf et al., 2010).

1.6 Der Major Histocompatibility Complex (MHC)

Eine Neigung zu autoimmunen Prozessen wird oft in Zusammenhang mit dem Major Histocompatibility Complex (MHC) gebracht. Der MHC ist eine Region des menschlichen Genoms, die für Proteine kodiert, die maßgeblich an der Aktivierung des Immunsystems beteiligt sind. Da diese Proteine zuerst auf der Oberfläche weißer Blutzellen entdeckt wurden, werden sie auch HLAs (Human Leucocyte Antigens) genannt und der MHC auch als HLA-Region bezeichnet. Die MHC-Proteine präsentieren den körpereigenen Abwehrzellen Antigene, die daraufhin aktiviert werden. Es werden unterschiedliche Klassen von MHC-Proteinen unterschieden. Die MHC-Proteine, die an der Immunreaktion beteiligt sind, gehören zu den Klassen I und II, die sich in Struktur und Funktion unterscheiden. MHC-I-Moleküle werden auf der Zelloberfläche aller

kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Dazu zählen HLA-A, HLA-B und HLA-C. Sie präsentieren kontinuierlich intrazelluläre Proteine, so dass atypische Veränderungen an jeder Körperzelle erkannt werden können. MHC-II-Moleküle wie HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ befinden sich nur auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, B-Lymphozyten). Diese Zellen können durch Phagozytose aufgenommenes Material in Bruchstücke zerlegen und über MHC-II-Proteine auf ihrer Zelloberfläche präsentieren (Horton et al., 2004).

1.6.1 MHC-Nomenklatur

Der allergrößte Anteil der Gene, die für MHC-I und -II Proteine kodiert, liegt auf Chromosom 6. Es gibt etwa 20 MHC-I-Gene auf Chromosom 6. Die drei wichtigsten sind HLA-A, HLA-B und HLA-C. Sie kodieren die α -Kette der MHC-I-Moleküle.

Die Gene der Klasse II kodieren die α - und β -Kette der MHC-II-Moleküle. Die Bezeichnung dieser Gene enthält drei Buchstaben. Der erste Buchstabe „D“ steht für die Klasse. Der zweite Buchstabe beschreibt die Familie (z.B. „R“, „P“, „Q“) und der dritte Buchstabe „A“ oder „B“ besagt, ob eine α - oder β -Kette kodiert wird. Durch verschiedene Zahlen, durch ein Sternchen voneinander getrennt, werden weitere Informationen bezüglich des MHC-Gens ergänzt. Die enthaltenen Informationen lassen sich am besten von hinten nach vorne nachvollziehen. Die Ziffern nach dem Sternchen stehen für eine bestimmte Allelvariante. Die Zahl vor dem Sternchen bezeichnet die Nummer des Gens. Bei „HLA-DQA1*02:01“ handelt es sich um die Allelvariante 02:01 von Gen 1, welches für die α -Kette eines Q-Proteins der Klasse D kodiert (Klein und Sato, 2000).

1.7 GWAS – Genome-Wide Association Studies (deutsch: Genomweite Assoziationsstudien)

Ein Hauptziel der Forschung am menschlichen Genom ist die Entdeckung genetischer Risikofaktoren verschiedener Erkrankungen.

Bei der Erforschung genetischer Grundlagen von Erkrankungen sind Single Nucleotide Polymorphisms (SNP, sprich snip) von großer Bedeutung. Ein SNP ist die Veränderung einer einzigen Base an einer bestimmten Position im menschlichen Genom. Ein SNP verfügt über mehrere Allele. Diese Allele können entweder identisch, also homozygot

oder unterschiedlich und somit heterozygot sein (Bush und Moore, 2012). Die Häufigkeit des selteneren Allels wird auch Minor Allele Frequency (MAF) genannt. Die strenge Definition eines SNPs setzt eine MAF von 1% in der Population voraus. Liegt die MAF unter 1%, wird diese genetische Variante Mutation genannt. Der größte Anteil, über 90% genetischer Variation im menschlichen Genom besteht aus SNPs.

In einer Genome-Wide Association Study (GWAS) wird durch Analyse von genetischen Markern im gesamten Genom nach einem genetischen Merkmal gesucht, das mit einem bestimmten phänotypischen Merkmal, meist einer bestimmten Erkrankung, in Beziehung gesetzt werden kann. Dabei werden SNPs als genetische Marker genutzt. Insbesondere ermöglicht eine GWAS den Vergleich zweier Gruppen (Fallgruppe und Kontrollgruppe) und identifiziert genetische Varianten, die in der Fallgruppe signifikant häufiger oder seltener auftreten (Ziegler und König, 2010).

Das Konzept von GWAS nutzt ein Phänomen, das Linkage Disequilibrium (LD) oder auch Kopplungsungleichgewicht genannt wird. Linkage (Kopplung) ist die nicht-zufällige Beziehung zweier SNPs an unterschiedlichen Positionen im Genom. Im Allgemeinen werden zwei SNPs, die nah beieinander liegen, weniger häufig durch Rekombination während der Meiose getrennt und daher häufiger gemeinsam vererbt. Ein hohes Maß an LD drückt aus, dass eine Kombination von Allelen zweier SNPs überdurchschnittlich oft über Generationen hinweg zusammen auftritt, diese SNPs also nicht unabhängig voneinander vererbt werden. Das heißt, zwei oder mehr Genloci mit bestimmten Sequenzvarianten in Individuen einer Population treten häufiger gemeinsam auf als dies durch Zufall zu erwarten wäre. Das Wissen um das Vorliegen einer bestimmten Variante (Marker) ermöglicht, auf das Vorliegen der zweiten Variante zu schließen (Visscher et al., 2012). Das LD ist umso stärker ausgeprägt, desto jünger die untersuchte Bevölkerungsgruppe ist, da sich die LD-Struktur von Generation zu Generation aufgrund von Rekombination verändert.

Es ist möglich, mit der Genotypisierung von etwa 500.000 SNPs die genetische Variation des gesamten Genoms in einer europäischstämmigen Bevölkerung zu erfassen. Die LD-Struktur des menschlichen Genoms wurde im Rahmen verschiedener Projekte erfasst und katalogisiert. Auf Grundlage dieser Daten kann mit der Genotypisierung von nur einem kleinen Teil aller SNPs der andere Großteil erschlossen werden. Ein Maß für das LD zwischen zwei Markern ist r^2 . Hohe Werte für r^2 bedeuten, dass im Fall zweier SNPs

A und B, nur einer der beiden genotypisiert werden muss, um auf das Allel des zweiten SNPs zu schließen (Bush und Moore, 2012).

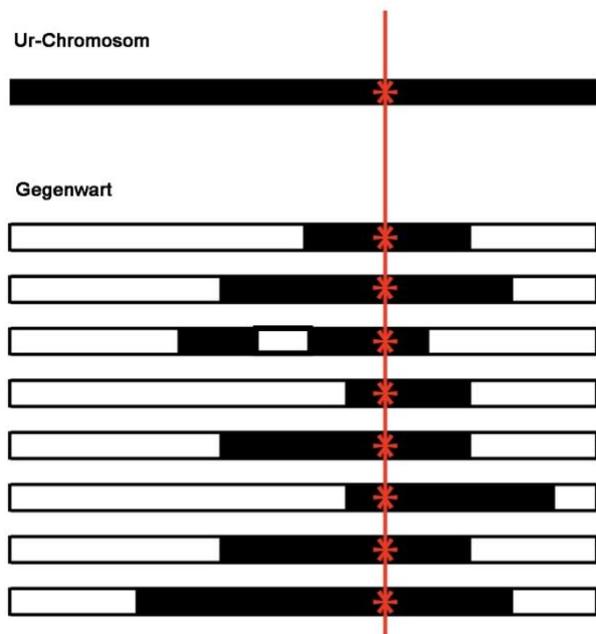


Abbildung 3: Linkage Disequilibrium

Schematische Darstellung der Entstehung des Linkage Disequilibrium ausgehend von einer einzelnen Mutation in einem gemeinsamen Ur-Chromosom. Das ursprüngliche Chromosom ist schwarz dargestellt und das hypothetisch mutierte Allel mit einem roten Stern markiert. Die 8 Nachfahren und Träger der ursprünglichen Mutation besitzen unterschiedlich große Anteile des Ur-Chromosoms. Die Allele innerhalb der schwarzen Bereiche befinden sich im Linkage Disequilibrium und wurden nicht zufällig und nicht unabhängig vererbt. (adaptiert aus Abecasis et al., 2005)

1.8 Fragestellung der Arbeit

In den allermeisten Fällen autoimmuner Enzephalitiden mit Antikörpern gegen synaptische Proteine ist der Auslöser unbekannt. Trotz verschiedener möglicher Risikofaktoren und Erklärungsversuchen sind die Gründe für das Auftreten der beiden häufigsten Erkrankungen in dieser Gruppe noch weitestgehend unklar. Es stellt sich die Frage, ob es eine genetische Prädisposition der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis gibt. Diese Überlegung wird mittels Durchführung einer Genome-Wide Association Study überprüft.

2. Methoden

Für die Durchführung einer erfolgreichen Genome-Wide Association Study sind eine Reihe von aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten notwendig. Nach Formulierung der zugrundeliegenden Fragestellung erfolgt zuerst die Patientenrekrutierung, genaue Definierung der Phänotypen und die DNA-Extraktion. Als nächstes schließt sich die eigentliche Genotypisierung an. Auf diese folgt eine gründliche Qualitätskontrolle der Daten. Die von Fehlern bereinigten Daten werden danach mit Hilfe modernster Computerprogramme einer komplexen bioinformatischen Analyse unterzogen, um eine abschließende Bewertung der Ergebnisse durchführen zu können. Auf die Schritte Patientenrekrutierung, Genotypisierung, Qualitätskontrolle und Datenanalyse in dieser Studie soll im weiteren Verlauf eingegangen werden.

2.1 Patientenrekrutierung

Die Zusammenstellung der Patientenkohorten erfolgte aus den Daten des Deutschen Netzwerks zur Erforschung autoimmuner Enzephalitiden (German Network for Research on Autoimmune Encephalitis, kurz GENERATE). GENERATE basiert auf der Kooperation von 76 Kliniken in Deutschland, Österreich und der Schweiz.

Die Arbeit von GENERATE beinhaltet eine pseudonymisierte Dokumentation klinischer Daten in einem zentralen Patientenregister sowie die dezentrale Sammlung von Patientenmaterialien in mehreren GENERATE-Biomaterialbanken. Alle rekrutierenden Zentren lassen die anonymisierte Datenerfassung, Probenentnahme und -asservierung sowie genetische und andere Untersuchungen der Proben durch die zuständigen regionalen Ethikkommissionen prüfen. Die Patienten erteilen im jeweiligen Zentrum eine schriftliche Einwilligung in die Verwendung ihrer Daten für Forschungszwecke. In der GENERATE-Datenbank werden Patienten mit Verdacht auf autoimmune Enzephalitis erfasst, unabhängig vom Nachweis von Auto-Antikörpern in Serum und Liquor.

In dieser Studie wurden die Daten von insgesamt 241 Patienten mit anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und Anti-Lgi1 Enzephalitis aus 23 GENERATE-Zentren und einer weiteren kooperierenden Klinik in Prag erfasst. Je nach Erkrankung wurden die Patienten der entsprechenden Gruppe zugeordnet. Der Krankheitsbeginn aller 241

Patienten lag zwischen Januar 2007 und April 2017. Die Patientendaten wurden innerhalb dieses Zeitraums auch in der GENERATE-Datenbank registriert.

Zunächst erfolgte die Auswertung der in der Datenbank gespeicherten, für das Projekt relevanten klinischen Informationen. Fehlende Daten wurden durch Kontaktaufnahme mit den jeweiligen behandelnden Ärzten ergänzt.

Neben den grundlegenden Informationen zu jedem Patienten wie Geschlecht, Ethnie und Alter bei Symptombeginn wurden allgemein anerkannte und definierte Diagnosekriterien für das jeweilige Krankheitsbild überprüft und die klinische Präsentation spezieller Symptome erfasst. Die Symptomausprägung wurde hinsichtlich Auftretens von epileptischen Anfällen, psychiatrischen Veränderungen, autonomen Regulationsstörungen oder Gedächtnisstörungen und anderen Symptomen ausgewertet. Zur weiteren Beurteilung der Erkrankung wurde überprüft, ob sich pathologische Veränderungen in Liquor (Autoantikörper, Oligoklonale Bande, Pleozytose), MRT und EEG zeigten und ob ein Tumorleiden vorlag. Weiterhin wurden Informationen bezüglich der Enzephalitisbehandlung, wie Therapiebeginn und Einsatz von Erst- oder Zweitlinien-Therapie erfasst.

Die in dieser Studie angewandten klinischen Diagnosekriterien wurden im April 2016 von Graus et al. publiziert (Graus et al., 2016).

Die Diagnose Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und somit die Aufnahme in diese Studiengruppe erfolgte bei Nachweis von NMDA-Rezeptor Antikörpern im Liquor und bei Vorliegen von mindestens einer der sechs folgenden Symptomgruppen.

6 Hauptsymptomgruppen:

- Abnormales Verhalten oder Kognitive Dysfunktion
- Sprachstörungen
- Epileptische Anfälle
- Bewegungsstörungen, Dyskinesien
- Bewusstseinsstörungen
- Autonome Regulationsstörungen

Zusätzlich konnten vorliegen:

- Pathologisches EEG
- Liquor mit Pleozytose oder Oligoklonalen Banden
- Teratom

Die Aufnahme in die Anti-Lgi1 Enzephalitis Gruppe erfolgte ebenfalls bei Nachweis von LGI1 Antikörpern im Liquor und wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Subakuter Beginn (Progress innerhalb der ersten 3 Monate) von Gedächtnisstörungen, psychiatrischen Symptomen, epileptischen Anfällen
- Bilaterale Auffälligkeiten in FLAIR-gewichteten MRT-Sequenzen im mittleren Temporallappen
- Mindestens eine der folgenden Veränderungen:
 - lymphozytäre Pleozytose im Liquor
 - EEG-Auffälligkeiten
 - Begründeter Ausschluss anderer Erkrankung

2.2 Sammlung von DNA-Proben

Von allen Patienten wurden frisches oder gefrorenes EDTA-Blut oder gefrorene PBMC-Proben (Peripheral Blood Mononuclear Cell-Proben) nach Kiel geschickt. Die DNA-Isolierung erfolgte mittels Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits, wie vom Hersteller Qiagen vorgegeben.

2.3 Kontrollgruppe

Die Kontrollen entstammten einer bereits genotypisierten Kohorte aus der populationsbasierten Biobank PopGen. PopGen (Population-Based Recruitment for Genetics Research) wurde im Jahr 2003 gegründet, um eine Infrastruktur für die Erforschung genetischer Risikofaktoren verschiedener Erkrankungen zu schaffen. PopGen enthält eine Vielzahl an Informationen von Erkrankten und darüber hinaus auch von zufällig ausgewählten, gesunden Personen. Alle Probanden gelten als neurologisch

gesund und stammen aus der norddeutschen Allgemeinbevölkerung (Nöthlings und Krawczak, 2012).

Die DNA-Proben von 1219 gesunden Kontrollen wurden genotypisiert und gingen in die Datenanalyse ein.

2.4 Angewandte Software

Für die komplexe Datenanalyse im Rahmen einer GWAS wurden die neuesten, international frei zugänglichen Programme und Datenbanken verwendet.

Programme:

- Plink 1.9
- Michigan Imputation Server
- SNP2HLA
- PyHLA

Internet Ressourcen:

- Allele Frequency Net Database (AFND): <http://www.allelefrequencies.net/>
- Genetic Power Calculator: <http://zzz.bwh.harvard.edu/gpc/cc2.html>
- GTEx: www.gtexportal.org
- HaploReg v4.1:
<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>
- Michigan Imputation Server:
<https://imputationserver.sph.umich.edu/index.html>
- plink1.9: www.cog-genomics.org/plink/1.9/
- NHGRI-EBI GWAS catalogue: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/home>
- OMIM (Online-Katalog menschlicher Genetik): <https://omim.org>
- Genecards: <https://www.genecards.org>

2.5 Berechnung der statistischen Trennschärfe (Power)

Die Durchführung einer GWAS an Enzephalitispatienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe hatte zum Ziel, bestimmte Risikofaktoren, also genetische Varianten, die signifikant unterschiedlich in der Enzephalitisgruppe vorliegen, zu identifizieren. Die

Wahrscheinlichkeit, dass in einer Studie ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Gruppen entdeckt wird, wenn dieser Unterschied tatsächlich existiert, nennt sich statistische Trennschärfe oder statistische Power. Im Fall einer GWAS heißt das, eine Studie besitzt dann eine gute Trennschärfe, wenn sie eine hohe Wahrscheinlichkeit hat, eine Assoziation zu entdecken und diese mit statistischer Signifikanz nachzuweisen. Die Trennschärfe einer Studie ist abhängig von der Stichprobengröße (N), der Effektstärke, ausgedrückt als Odds Ratio, der Frequenz des Effektalleles und der Wahrscheinlichkeit des Fehlers erster Art (α -Fehler). Im Allgemeinen wird eine statistische Power von 80% für die Durchführung einer Fall-Kontroll-Studie als ausreichend angenommen (Fletcher und Fletcher, 2007).

Die Nullhypothese dieser Studie lautet: Es gibt keine genetische Assoziation. Die Alternativhypothese dagegen heißt: Es gibt genetische Marker welche mit dem Krankheitsphänotyp assoziiert sind. Würde die Nullhypothese abgelehnt, obwohl sie wahr ist, läge ein Fehler 1. Art oder α -Fehler vor. Würde hingegen die Alternativhypothese abgelehnt, obwohl sie wahr ist, es also tatsächlich eine genetische Assoziation gibt, so würde ein Fehler 2. Art oder β -Fehler vorliegen.

Die statistische Power ist hoch, wenn die Wahrscheinlichkeit sinkt, einen Fehler 2. Art (β -Fehler) zu begehen und somit zu dem Schluss zu kommen, dass es keinen Effekt (keine genetische Assoziation) gibt, obwohl es tatsächlich einen gibt. Die statistische Power wird ausgedrückt: $\text{Power} = 1 - \beta$

In dieser Studie wurde die Berechnung der statistischen Trennschärfe mit dem „Genetic Power Calculator“ von S. Purcell durchgeführt. Die Analysemethode „Case-control for discrete traits“ wurde angewendet (Purcell et al., 2003).

2.6 Genotypisierung

Die Genotypisierung ist der Vorgang, bei dem der Genotyp eines Individuums, die genotypische Ausprägung eines Markers festgestellt wird. Alle DNA-Proben wurden am Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB) Kiel auf dem Illumina Infinium Global Screening Array (GSA) genotypisiert. Dabei wurden etwa 660.000 Marker erfasst.

Die Technik des GSA basiert auf einer enzymatischen Extension genomischer DNA, die zuvor an spezifische, auf dem Array fixierte Fragmente bindet. Die Extension erfolgt mit

fluoreszenz-markierten Basen. Im Anschluss wird die Intensität des Fluoreszenzsignals mit einer speziellen Illumina Software (iScan-System) erfasst und daraus der entsprechende Genotyp für jeden SNP errechnet. Dabei gibt es entsprechend den vier in der DNA enthaltenen Basen, Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin vier Möglichkeiten für die Ausprägung eines Genotyps (Ziegler und König, 2010).

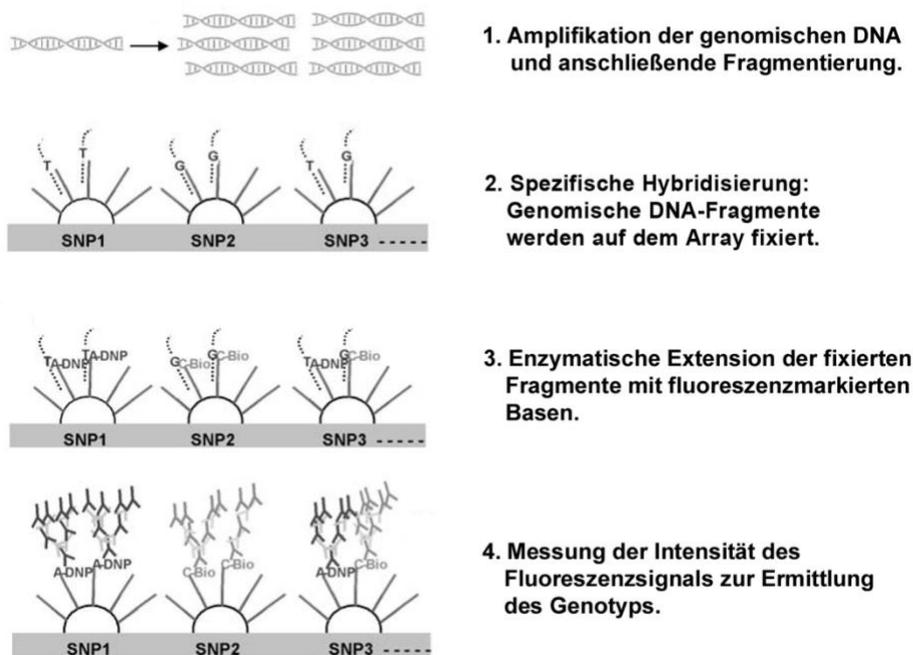


Abbildung 4: Genotypisierung auf dem Global Screening Array
Vereinfachte Darstellung der vier Hauptschritte der Genotypisierung auf dem Global Screening Array.
SNP=Single Nucleotide Polymorphism (adaptiert aus Gunderson, 2009)

Die Daten von Patienten und Kontrollen wurden in Dateien im Plink-Format gespeichert und zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Plink ist eine frei zugängliche Software, die speziell für die Auswertung und Qualitätskontrolle der großen Datenmengen einer GWAS entwickelt wurde (Purcell et al., 2007).

2.7 Qualitätskontrolle der Genotypisierungsdaten

Das grundlegende Ziel einer GWAS in Form einer Fall-Kontroll-Studie ist die Aufdeckung eines Unterschieds von Allelhäufigkeiten zwischen Fall- und Kontrollgruppe. Bei der Untersuchung von SNPs hinsichtlich einer Assoziation mit einem Phänotyp gibt es eine Reihe von Fehlerquellen. Diese können zu falsch-positiven oder auch falsch-negativen Ergebnissen führen. Eine sorgfältige Qualitätskontrolle der Daten hinsichtlich

verschiedenster Aspekte ist daher essentiell. Die Daten der beiden Enzephalitisgruppen ebenso wie der Kontrollgruppe wurden überprüft. Die Qualitätskontrolle der Daten und die bioinformatische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Neurogenetik der Klinik für Neurologie der Universitätsklinik Kiel.

2.7.1 Qualitätskontrolle der Proben

A) Missing Call Rate/Missingness Rate:

Die sogenannte Missing Call Rate ist ein Indikator für die Qualität einer einzelnen DNA-Probe. Dabei wird das Verhältnis von genotypisierten Markern gegenüber dem Anteil von Markern welche nicht bestimmt werden konnten pro Probe betrachtet. Ein hoher Anteil fehlender, also nicht-genotypisierter Marker kann durch Hybridisierungsprobleme der Probanden-DNA auf dem Array verursacht sein und deutet auf mangelhafte Probenqualität hin (Laurie et al., 2010).

Alle Proben mit weniger als 98% genotypisierten Markern wurden ausgeschlossen.

B) Heterozygotenrate:

Ein weiterer Störfaktor ist die mögliche Kontamination oder versehentliche Vermischung von Proben. Jeder genotypisierte Marker kann aufgrund des diploiden Chromosomensatzes homozygot oder heterozygot vorliegen. Statistisch gesehen gibt es einen bestimmten zu erwartenden Anteil heterozygoter Marker in jeder Probe. Eine Diskrepanz zwischen dem Verhältnis von erwarteten und tatsächlich beobachteten heterozygoten autosomalen Genotypen kann als Hinweis auf eine Probenkontamination dienen. Zunächst wird überprüft, wie viele heterozygote Genotypen in jeder einzelnen Probe vorliegen. Unter Betrachtung aller Proben wird eine durchschnittliche Heterozygotenrate errechnet sowie die Standardabweichung der zugrundeliegenden Verteilung. Dann wird jede Probe anhand dieses Durchschnitts kontrolliert, wobei der Anteil der heterozygoten SNPs in einer Probe nicht außerhalb der dreifachen Standardabweichung von diesem Durchschnitt liegen sollte (Ziegler und König, 2010). Proben, deren Heterozygotenrate außerhalb der dreifachen Standardabweichung von der durchschnittlichen Heterozygotenrate aller Proben lag, wurden ausgeschlossen.

C) Geschlecht der Proben:

Ein anderer Hinweis auf Probenkontamination kann eine Abweichung von dokumentiertem Geschlecht zu genotypisiertem Geschlecht sein. Plink verfügt über entsprechende Kontrollmechanismen beim Auslesen der Genotypisierungsergebnisse. Proben, bei denen eine Abweichung auftrat, wurden aussortiert.

D) Cryptic Relatedness (Verborgene Verwandtschaft):

Für die Aussagekraft der Studie bezüglich genetischer Prädisposition ist es wichtig, eine unbekannte genetische Verwandtschaft der einzelnen Proben zu überprüfen. Eine solche Verwandtschaft kann durch Anhäufung bestimmter Haplotypen die Ergebnisse verfälschen und muss daher ausgeschlossen werden (Ziegler und König, 2010).

Alle Proben, für die eine genetische Verwandtschaft als Cousin 1. Grades oder näher bestand, wurden ausselektiert.

E) Ethnische Zugehörigkeit:

Alle Proben sollten derselben ethnischen Gruppe angehören, um genetische Unterschiede zwischen Ethnien als Einflussfaktor zu vermeiden. Zur Identifikation von Proben, die einer anderen ethnischen Gruppe angehören, erfolgte ein Abgleich mit den Daten der 1000 Genomes Database. In dieser Datenbank sind Informationen zu den genetischen Variationen aus 26 verschiedenen Populationen enthalten (Consortium, 2015a).

Proben, die nicht kaukasischer Abstammung waren, gingen nicht in die weitere Analyse ein.

2.7.2 Qualitätskontrolle der genotypisierten Marker

A) Missingness Rate pro Marker:

Die Missingness Rate ist ein Maß für den Anteil an Proben, in denen kein Genotyp an einem bestimmten Marker bestimmt werden konnte. Eine Missingness Rate größer als 2% dient hier als Ausschlusskriterium für einen SNP.

Außerdem werden die Genotypisierungsraten für die einzelnen Marker zwischen Fall- und Kontrollgruppe verglichen. Marker, für die ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht, werden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Dieser Unterschied wird auch als Informative Missingness bezeichnet. Auf diese Weise wird die Beobachtung von falsch-positiven Assoziationen vermieden (Ziegler und König, 2010). Alle SNPs, die entsprechend diesen Kriterien auffielen, wurden ausgeschlossen.

B) Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE):

Zur Untersuchung, ob Fehler bei der Genotypisierung der SNPs stattgefunden haben, wird innerhalb der Kontrollgruppe überprüft, ob die Allelfrequenzen dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (engl. Hardy-Weinberg-Equilibrium, HWE) entsprechen. Das HWE geht von einer idealen Population aus, in der Panmixie vorherrscht und die keiner Selektion unterworfenen ist. In einer solchen Population besagt das HWE, dass die Genotypenverteilung von Generation zu Generation stabil bleibt. Im Fall eines Genlokus für den es zwei mögliche Allele (P und Q) gibt, drückt sich das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht so aus:

$$p^2+2pq+q^2=1$$

p und q sind die Allelfrequenzen

p^2 und q^2 sind die Homozygotenfrequenz

$2pq$ ist die Heterozygotenfrequenz

(Murken et al., 2006)

Abweichungen von dieser Genotypenverteilung im Sinne einer erhöhten Heterozygotenfrequenz sprechen für Fehler bei der Genotypisierung.

Krankheitsverursachende Genloci allerdings unterliegen einer Selektion und können deshalb stark vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen. Aus diesem Grund wird nur die Kontrollgruppe auf abweichende Marker untersucht und diese ausgeschlossen. In der Fall-Gruppe würde die Anwendung des HWE unter Umständen zum Ausschluss wichtiger und gewünschter Informationen als Hinweis auf Assoziation führen (Ziegler

und König, 2010). SNPs, die in der Kontrollgruppe nicht dem HWE entsprachen, fanden in der weiterführenden Auswertung keine Beachtung.

C) Minor Allele Frequency:

Die Frequenz des selteneren Allels einer Sequenzvariation in einer Population wird auch Minor Allele Frequency (MAF) genannt. Die strenge Definition eines SNPs setzt eine MAF von 1% in der Population voraus. Liegt die MAF unter 1% wird diese genetische Variante Mutation genannt (Bush und Moore, 2012). Außerdem besteht eine gewisse Fehlerrate bei der Genotypisierung und ein solcher Fehler kann bei einer MAF unter 1% nicht mehr zuverlässig von einer echten, aber sehr seltenen genetischen Variante unterschieden werden. Alle Marker mit einer MAF kleiner als 1% wurden demnach ausgeschlossen.

2.8 Imputation

Eine Imputation ermöglicht die Bestimmung nicht-genotypisierter SNPs. Dies geschieht auf Grundlage des Linkage Disequilibrium und einem ausgewählten Referenzdatensatz (Sammlung zuvor genotypisierter Informationen). Für die Ermittlung zusätzlicher Marker wurde der freizugängliche Michigan Imputation Server genutzt. Diese Software ermöglicht es, den Prozess der Imputation zu automatisieren.

Der qualitätsgeprüfte Datensatz aller untersuchten Proben (Patienten und Kontrollen) wird importiert und das Programm übernimmt alle weiteren Schritte (Das et al., 2016). Ein vorgegebenes Maß für die Qualität der imputierten Marker ist der vom Programm vorgegebene Info Score. Nur imputierte Marker mit einem Info Score über 0,3 und mit einer MAF über 1% gingen in die weitere Analyse ein.

2.9 Assoziationsanalyse

Eine Assoziation im Kontext einer GWAS bedeutet, dass ein spezifisches Allel eines genetischen Markers statistisch signifikant häufiger oder seltener in der Gruppe der Erkrankten als in der Kontrollgruppe auftritt. Die Assoziationsanalyse wird erst im

Anschluss an die Qualitätskontrolle durchgeführt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

Der Ansatz einer Assoziationsanalyse ist es, jeden einzelnen SNP auf eine Krankheitsassoziation hin zu testen. Die Assoziationsanalyse wurde erst nach Ausschluss qualitativ mangelhafter Marker sowohl für die direkt genotypisierten SNPs (Anzahl: 470.313) als auch für die imputierten Marker (Anzahl: 7.139.953) durchgeführt. Die beiden Enzephalitisgruppen wurden getrennt analysiert. Innerhalb der Anti-NMDAR Enzephalitisgruppe wurde darüber hinaus auf möglicherweise bestehende Krankheitsassoziation in Patienten-Subgruppen geprüft: Patienten mit einem frühen oder späten Krankheitsbeginn (jünger oder älter als 23,5 Jahre) sowie mit und ohne Tumor. Für die Assoziationsanalyse wurde wieder die Software PLINK genutzt (Chang et al., 2015).

Ein wichtiger Einfluss- oder Störfaktor bei der Assoziationsanalyse ist die sogenannte Population Stratification (Bevölkerungsstruktur). Population Stratification beschreibt den Unterschied von Allelfrequenzen zwischen möglichen Untergruppen innerhalb einer Gesamtpopulation. Diese in sich genetisch ähnlichen Untergruppen mit signifikant unterschiedlichen Frequenzen eines bestimmten Allels können zum Beispiel durch ihre geografische Nähe und somit durch eine lokalisierte Paarung von Individuen zu Stande kommen. Diese Differenzen in der Abstammung können zu falsch positiven Ergebnissen in der Assoziationsanalyse führen (Price et al., 2006).

Aus diesem Grund ist es essentiell bei der Assoziationsanalyse darauf zu achten, ob in der Studienpopulation eine Population Stratification vorliegt. Dazu gibt es verschiedene Ansätze.

Eine Möglichkeit mit Population Stratification umzugehen ist das Konzept der „Genomic Control“ (GC). GC korrigiert Population Stratification, in dem das Testergebnis für jeden einzelnen Marker mittels eines einheitlichen Genomic Inflation Factor λ adjustiert wird. Der Genomic Inflation Factor λ ist ein Maß für Population Stratification und besagt, wie stark das ermittelte Testergebnis vom erwarteten Ergebnis abweicht. Der Genomic Inflation Factor λ berechnet sich als Quotient des Medians des beobachteten Testergebnisses (χ^2) und dem erwarteten Median, welcher mit 0,456 definiert ist:

$$\lambda = \text{median}(\chi^2) / 0,456$$

Zudem kann es sehr nützlich sein, ein Quantil-Quantil Diagramm zu erstellen. In diesem werden die ermittelten P-Werte für jeden SNP der Größe nach eingetragen im Vergleich zu den P-Werten unter der Nullhypothese „Es gibt keine Assoziation“. Ein solches Diagramm veranschaulicht das Ausmaß von Population Stratification.

Wenn nur wenige Marker von der zu erwartenden Linie abweichen, könnte es sich bei diesen Markern um eine wahre Assoziation handeln.

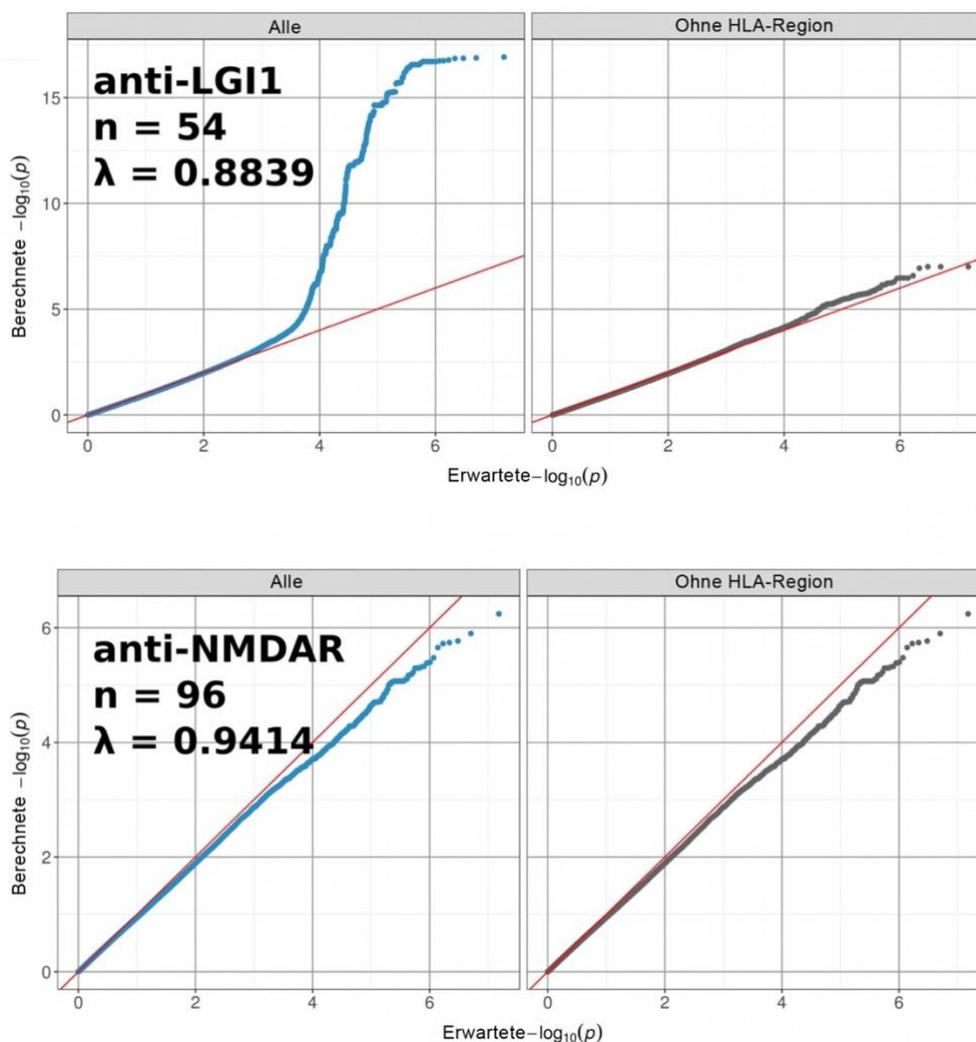


Abbildung 5: Quantil-Quantil Diagramm

Vergleich der pro Marker berechneten P-Werte (blaue und graue Punkte) und der P-Werte unter der Nullhypothese „Keine Assoziation“ (rote Linie). In der rechten Hälfte der Abbildung sind die Marker der HLA-Region nicht enthalten.

oben: Assoziationsanalyse der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe mit dem Genomic Inflation Factor $\lambda=0,8839$. Der Vergleich des Quantil-Quantil-Diagramms mit und ohne HLA-Region unterstreicht, dass der Großteil der hoch assoziierten Marker in der HLA-Region gelegen sein muss.

unten: Assoziationsanalyse der Anti-NMDAR-Enzephalitisgruppe mit Genomic Inflation Factor $\lambda=0,9414$.

Lgi1=Leucine-rich Glioma-Inactivated 1

NMDAR= N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor

λ =Genomic Inflation Factor

n=Anzahl

Außerdem kann zur Detektion und Korrektur von Population Stratification eine Hauptkomponentenanalyse (englisch: Principal Component Analysis, PCA) durchgeführt werden. Das Ziel einer Hauptkomponentenanalyse ist es, die wichtigsten Informationen eines großen Datensatzes zu extrahieren und diese Informationen in Form einer geringeren Anzahl an Variablen, den Hauptkomponenten, auszudrücken. Diese reflektieren wiederum einen Großteil der Varianz des ursprünglichen Datensatzes. Eine Hauptkomponentenanalyse an den Genotypisierungsdaten einer GWAS wird angewendet, um Hauptachsen genetischer Variation zu identifizieren. Entlang dieser Achsen können die Daten in Bezug auf Population Stratification angepasst werden und diese adjustierten Daten dann für die Assoziationsanalyse genutzt werden (Ziegler und König, 2010).

Den Berechnungen der Assoziationsanalyse in der Studie lag eine logistische Regressionsanalyse zugrunde. Eine logistische Regression ermöglicht die Überprüfung, ob ein Zusammenhang zwischen einer binären Variable (hier einfach ausgedrückt „krank/Enzephalitis“ oder „gesund“) und mehreren unabhängigen Variablen besteht (Fletcher und Fletcher, 2007). In diese Berechnung eingehende Variablen waren beispielweise Alter oder Geschlecht und die ersten vier Dimensionen der Hauptkomponentenanalyse.

2.10 HLA-Imputation

In dieser Studie ging es um die Untersuchung zweier Autoimmunerkrankungen. Aus diesem Grund wurde die MHC-Region näher analysiert und auf Assoziation mit den beiden Enzephalitisgruppen untersucht. Die MHC-Region auf Chromosom 6 liegt im Bereich von Basenpaar 29Mbp (Megabasenpaar, englisch: Megabase pair) bis 34Mpb. Mit Hilfe des Programms SNP2HLA (Jia et al., 2013) wurden vierstellige HLA-Allele auf der Grundlage von 6213 zuvor auf dem GSA direkt genotypisierten SNPs mit einer MAF von 0,025 und höher imputiert.

Als Referenzdatensatz für die imputierten Allele dienten Daten des Type 1 Diabetes Genetics Consortium (T1DGC) Reference Panel. Diese Datenbank enthält Informationen

zu Haplotypen von über 5000 Individuen. Die acht imputierten HLA-Gene waren: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DPA1 und HLA-DPB1

2.11 HLA-Assoziationsanalyse

Die HLA-Assoziationsanalyse wurde mit der Software PyHLA durchgeführt (Fan und Song, 2017). Dabei wurde jeweils die Assoziation der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis getrennt überprüft. Zur Berechnung diente wieder eine logistische Regressionsanalyse, in die Alter, Geschlecht und die ersten vier Dimensionen einer Hauptkomponentenanalyse als Variablen eingingen. Eine α -Adjustierung erfolgte mittels Step-up Methode nach Hochberg.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkohorte

Für die Durchführung der GWAS zur Untersuchung einer genetischen Prädisposition der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis wurden insgesamt 241 Enzephalitispatienten rekrutiert.

Entsprechend ihrer Erkrankung und dem nachgewiesenen Autoantikörper wurden die Patienten den Gruppen „Anti-NMDAR“ oder „Anti-Lgi1“ zugeteilt. In der ersten Gruppe fanden sich anfangs 166 Patienten, in der zweiten Gruppe 75 Patienten.

Im Verlauf verkleinerten sich die Kohorten, so dass nur insgesamt 163 Patienten für die Genotypisierung mittels GSA zur Verfügung standen. Die verschiedenen Gründe, die zum Ausschluss der Patienten führten, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

	Schriftliche Einwilligung widerrufen	Diagnosekriterien nicht erfüllt	Keine DNA-Probe vorhanden
Anti-NMDAR	7	4	47
Anti-Lgi1	2	1	17

Tabelle 1: Ausschlusskriterien bei der Patientenrekrutierung
Lgi1=Leucine-rich Glioma-Inactivated 1
NMDAR= N-Methyl-D-Aspartat Receptor

In der Anti-NMDAR-Gruppe blieben 108 Patienten, in der Anti-Lgi1-Gruppe 55 Patienten für die Durchführung der Genotypisierung übrig.

Während der Qualitätskontrolle der GWAS-Daten entfielen weitere 13 Patienten. Bei 2 Patienten bestand eine Abweichung zwischen dokumentiertem und tatsächlich genotypisiertem Geschlecht, bei 3 Patienten bestand eine Cryptic Relatedness, bei 7 Patienten wich die Heterozygotenrate um mehr als das Dreifache der Standardabweichung vom Mittel ab und ein Patient entstammte einer nicht-europäischen Population.

Auch in der Kontrollgruppe wurden 25 Personen aufgrund von Cryptic Relatedness (n=17) und Heterozygotenrate (n=8) aussortiert. In die Assoziationsanalyse gingen letztlich die Daten von 150 Patienten (Anti-NMDAR: 96; Anti-Lgi1: 54) und 1194 Kontrollen ein.

Grundlegende Charakteristika und klinische Informationen der beiden Patientengruppen sowie der Kontrollgruppe sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

	Anti-NMDAR	Anti-Lgi1	Kontrollgruppe
Anzahl	96	54	1194
Anteil von Frauen in %	80,2%	42,6%	45,1%
Mittleres Alter (+/- Standardabweichung)	30,3 (+/-13,3)	62,7 (+/-11,0)	54,1 (+/-14,3)
Mittleres Alter bei Krankheitsbeginn (+/-)	29,0 (+/-13,3)	62,0 (+/-10,9)	Nicht anwendbar (NA)
Prodromale Symptome	42%	50%	NA
Epileptische Anfälle	73%	76%	NA
Psychiatrische Symptome	92%	57%	NA
Bewegungsstörungen	45%	11%	NA
Autonome	39%	12%	NA
Pathologisches EEG	75%	78%	NA
Pathologisches MRT	57%	74%	NA
Pleozytose im Liquor	70%	14%	NA
Oligoklonale Bande	70%	31%	NA
Tumor	17% (94% Ovarielles)	2% (ein Oesophaguskarzinom)	NA
Steroidtherapie, IVIG, Plasmapherese,	99%	94%	NA
Rituximab, Cyclophosphamid, beides	47%	40%	NA
Behandlung auf der Intensivstation	42%	7%	NA
Zeit von Symptombeginn bis Therapiebeginn in Tagen	16,5 (1-1638)	17,5 (1-1035)	NA
Zeit von Diagnose bis letzte Untersuchung in Tagen (Range)	297 (16-2728)	325 (15-3797)	NA

Tabelle 2: Klinische Informationen zu den 3 Studienkohorten

Lgi1=Leucine-rich Glioma-Inactivated 1

NMDAR= N-Methyl-D-Aspartat Receptor

IVIG=Intravenöse Immunglobuline

SCLC=Small Cell Lung Cancer

Besonders hervorzuheben ist, dass die beiden Patientengruppen im Hinblick auf Alter und Geschlecht den in der Literatur beschriebenen Ausprägungen entsprachen. Die Anti-NMDAR-Gruppe enthielt einen großen Anteil von Frauen, insgesamt 80,2%; wohingegen in der Anti-Lgi1-Gruppe keine solche Betonung des weiblichen Geschlechts beobachtet werden konnte. Darüber hinaus war das mittlere Erkrankungsalter in der Anti-NMDAR-

Gruppe mit 29 Jahren deutlich niedriger als in der Anti-Lgi1-Gruppe mit 62 Jahren. In der Assoziationsanalyse wurden insbesondere das Erkrankungsalter sowie das Vorliegen eines Teratoms in der Anti-NMDAR-Gruppe näher betrachtet.

3.2 Assoziationsanalyse der einzelnen Marker

An den nach eingehender Qualitätskontrolle weiterhin zur Verfügung stehenden Daten und nach Imputation weiterer SNPs wurde zuerst die Assoziationsanalyse der einzelnen Marker durchgeführt. Die Assoziationsanalyse erfolgte getrennt für beide Enzephalitisgruppen und abschließend gemeinsam im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2.1 Assoziationsanalyse in der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe

In der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe zeigte sich eine starke Assoziation zu SNP rs2858870. Die rs-Nummer steht für „Reference SNP Cluster ID“ und ist eine eindeutige Identifikationsnummer für einen SNP entsprechend den Daten einer freizugänglichen Datenbank für SNPs (dbSNP). Diese Datenbank ermöglicht die genauere Zuordnung eines SNPs zu genetischen Regionen und dokumentiert verschiedene Varianten des Genotyps (Kitts und Sherry, 2011).

SNP rs2858870 lag auf Chromosom 6 in der HLA-Region. In nächster Nähe zu diesem SNP lagen 26 andere SNPs, die mit ähnlich hoher Signifikanz mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis assoziiert waren (Detaillierte Informationen zur SNP-Assoziationsanalyse zeigt Tabelle 7 im Anhang).

Die genomweite Signifikanz einer Assoziation zwischen einem SNP und einem Phänotyp kann mit einem sogenannten Manhattan-Plot veranschaulicht werden. Entlang der X-Achse wird die chromosomale Position abgebildet, entlang der Y-Achse wird der negative Logarithmus des P-Wertes der Assoziationsberechnung für jeden SNP angegeben, sozusagen als Maß für die Assoziationsstärke. Jeder Punkt im Manhattan-Plot repräsentiert den P-Wert der Assoziationsberechnung eines SNPs. Die üblicherweise gewählte Schwelle für genomweite Signifikanz ist $P < 5 \times 10^{-8}$ (Gibson, 2010).

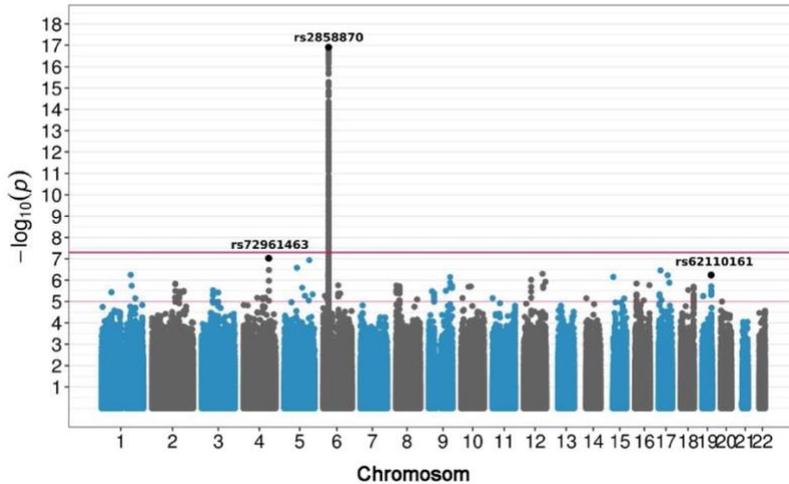


Abbildung 6: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe. Der Manhattan-Plot zeigt die in die Assoziationsanalyse eingegangenen SNPs aller 54 Anti-Lgi1 Enzephalitispatienten und der 1194 gesunden Kontrollen. Der negative Logarithmus der markerbezogenen P-Werte ist gegen die chromosomale Position des SNPs eingetragen. SNP rs2858870 übersteigt eindeutig das genomweite Signifikanzniveau (Odds Ratio=13,6; 95% Konfidenzintervall=7,50-24,87; $P=1,22 \times 10^{-7}$). Die rote Linie markiert die für genomweite Signifikanz gewählte Schwelle $P < 5 \times 10^{-8}$. rs=Reference SNP

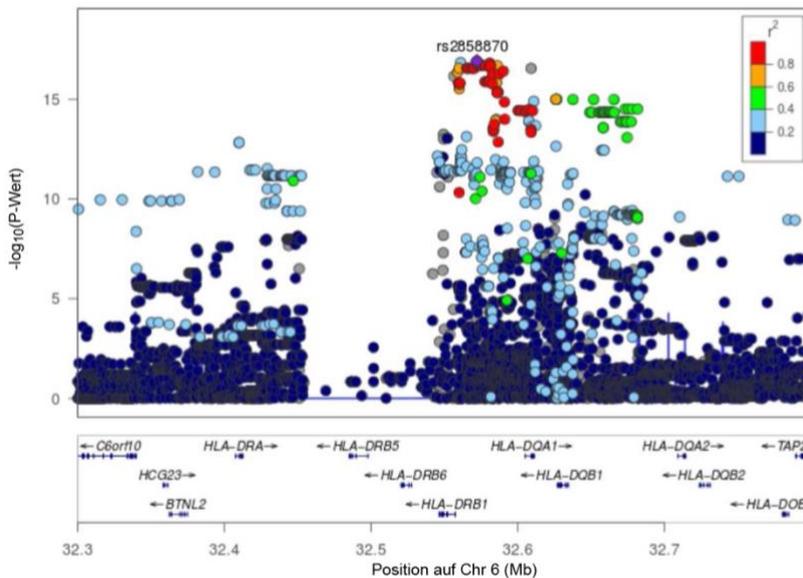


Abbildung 7: Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis mit Markern der HLA-Region. In dieser Abbildung, dem Regional-Plot sind die Assoziationen für Marker in der HLA-Region auf Chromosom 6 in der chromosomalen Region von Basenpaar 32.300.000 bis 32.800.000 abgebildet. Entlang der X-Achse findet sich die chromosomale Position, entlang der Y-Achse der negative Logarithmus des P-Wertes. Als zusätzliche Information ist r^2 als Maß für das Linkage Disequilibrium (LD) zwischen zwei Markern angegeben. Aufgrund des stark ausgeprägten LD (rot markiert) in dieser Region kann keine Aussage darüber getroffen werden, welcher einzelne SNP ein kausaler SNP für die Anti-Lgi1 Enzephalitis ist.

Im unteren Abschnitt der Abbildung ist schematisch dargestellt, welche Gene im jeweiligen Abschnitt auf Chromosom 6 gelegen sind. Es handelt es sich mehrheitlich um HLA-Gene.

rs=Reference SNP

Mb=Megabasen

HLA=Human Leukocyte Antigen

Neben der Assoziation auf Chromosom 6, zeigten sich noch zwei weitere Regionen, in denen jeweils ein SNP gehäuft in der Anti-Lgi1-Gruppe auftrat. SNP rs72961463 auf Chromosom 4 (Odds Ratio=13,9; 95% Konfidenzintervall=5,11-34,04; $P=9,84 \times 10^{-8}$) und SNP rs62110161 auf Chromosom 19 (Odds Ratio=4,11; 95% Konfidenzintervall=2,36-7,15; $P=5,87 \times 10^{-7}$) blieben nur knapp unter der genomweiten Signifikanz.

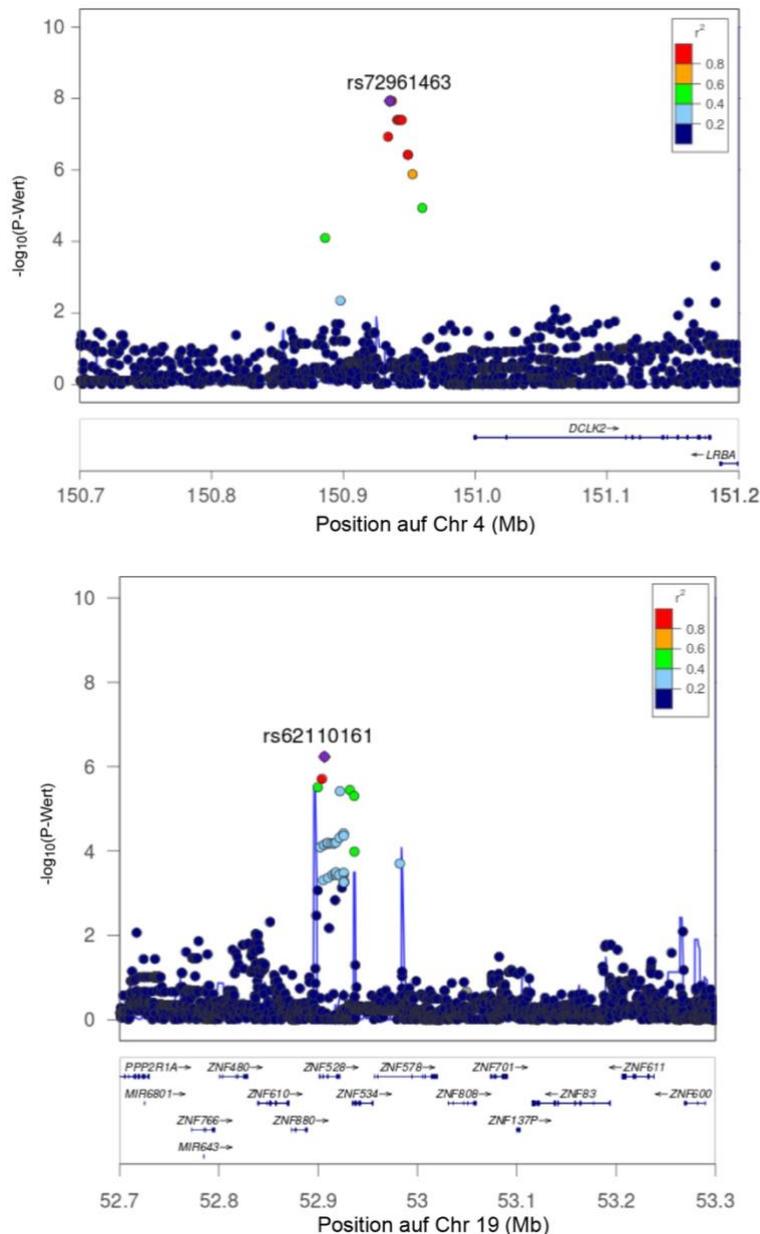


Abbildung 8: Weitere Assoziationen in der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe
Regional-Plot für die Regionen auf Chromosom 4 (oben) und 19 (unten). Entlang der X-Achse findet sich die chromosomale Position, entlang der Y-Achse der negative Logarithmus des P-Wertes. Als zusätzliche Information ist r^2 als Maß für das Linkage Disequilibrium zwischen zwei Markern angegeben. SNP rs72961463 auf Chromosom 4 und SNP rs62110161 auf Chromosom 19 verfehlten nur knapp die genomweite Signifikanz von $P < 5 \times 10^{-8}$. Im unteren Abschnitt der Abbildungen ist jeweils schematisch dargestellt, welche Gene in dem jeweiligen Abschnitt gelegen sind. So liegt rs72961463 auf Chromosom 4

in der Nähe des Genes der Double Cortin Like Kinase 2 und rs62110161 auf Chromosom 19 liegt im Bereich verschiedener Zinkfinger Gene.

Mb= Megabasen

DCLK=Double Cortin Like Kinase

ZNF=Zinkfinger Gen

rs=Reference SNP

Mit der freizugänglichen Software HaploReg v4.1 ist es möglich, bestimmte DNA-Sequenzen oder Marker näher zu annotieren, wie zum Beispiel mit Informationen zu assoziierten Genen oder bekannten Funktion im Genom (Ward und Kellis, 2016). HaploReg v4.1 nutzt die Daten der Genotype-Tissue Expression (GTEx) Pilot Analysis, welche in Zusammenhang mit Expressionsmustern tausende von genetischen Varianten katalogisiert und kategorisiert hat (Consortium, 2015b). Die Betrachtung der Informationen von HaploReg v4.1 ergab, dass SNP rs72961463 auf Chromosom 4 mit einem Gen der Doublecortin-like Kinase 2 in Zusammenhang steht. Weiterhin ergibt sich dies aus der Annahme, dass aus der physikalischen Nähe eines SNPs auf einem Chromosom zu bestimmten Genen darauf geschlossen werden kann, dass der SNP auf dieses nahe gelegene Gen verweist. SNP rs62110161 auf Chromosom 19 ist ein Expression Quantitative Trait Locus, welcher mit einem relativ unbekanntem Zinkfinger Gen *ZNF528* zusammenhängt. Als expression Quantitative Trait Locus (eQTL) werden Abschnitte der DNA definiert, die assoziiert sind mit der Genexpression spezifischer Gene (Nica und Dermitzakis, 2013).

3.2.2 Assoziationsanalyse in der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitisgruppe

Auch die Anti-NMDAR-Gruppe wurde hinsichtlich Assoziation mit bestimmten SNPs untersucht. Im Gegensatz zur Anti-Lgi1-Gruppe ergaben sich hier keine signifikanten Assoziationen. Dies wird auch im Manhattan-Plot, der alle SNPs der 96 Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitispatienten und der gesunden Kontrollen zeigt, ersichtlich:

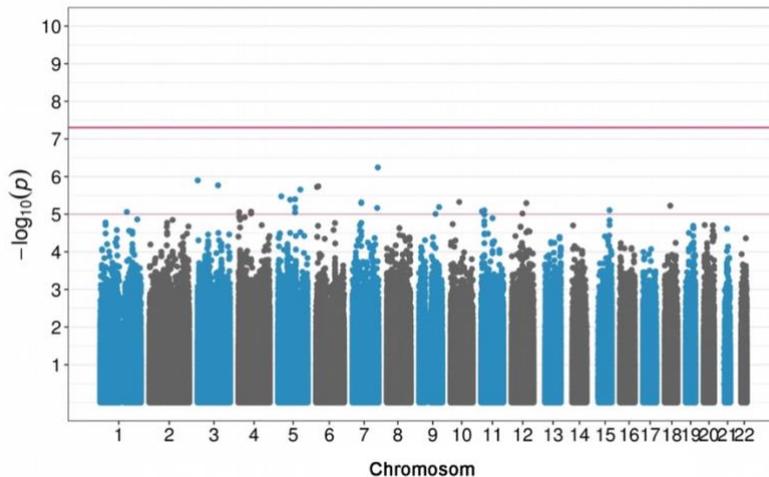


Abbildung 9: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Anti-NMDAR Enzephalitisgruppe. Entlang der X-Achse wird die chromosomale Position abgebildet, entlang der Y-Achse wird der negative Logarithmus des P-Wertes der Assoziationsberechnung für jeden SNP angegeben. Jeder Punkt im Manhattan-Plot repräsentiert einen SNP entsprechend der Assoziationsanalyse der Anti-NMDAR Enzephalitisgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. NMDAR= N-Methyl-D-Aspartat Receptor

Zusätzlich wurden Untergruppen der Anti-NMDAR-Gruppe untersucht. Die Einteilung der Untergruppen erfolgte anhand des medianen Erkrankungsalters und anhand des Vorliegens eines ovariellen Teratoms. Diese Überlegungen ergaben sich aus den in der Literatur beschriebenen epidemiologischen Merkmalen von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis (Titulaer et al., 2013). Der Vergleich der Gruppen mit Krankheitsbeginn jünger oder älter als 23,5 Jahre, dem medianen Erkrankungsalter in der Anti-NMDAR-Gruppe, erbrachte allerdings keine zusätzlichen Erkenntnisse, ebenso der Vergleich von Patienten mit und ohne Tumor. Eine gemeinsame Assoziationsanalyse beider Enzephalitiskohorten zeigte ebenfalls keine weitere signifikante Assoziation eines Markers mit dem Krankheitsstatus.

3.3 Assoziationsanalyse der HLA-Region

Bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und bei der Anti-Lgi1 Enzephalitis handelt es sich um Autoimmunerkrankungen. Schon für andere Autoimmunerkrankungen konnten mittels GWAS Assoziationen zwischen bestimmten HLA-Genen und den untersuchten Erkrankungen gezeigt werden. Aufgrund dessen wurde auch hier jeweils eine Assoziationsanalyse der HLA-Region auf Chromosom 6 mit den beiden Enzephalitisgruppen durchgeführt.

3.3.1 HLA-Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis

Es ließen sich elf HLA-Allele identifizieren, die signifikant mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis assoziiert waren. Alle diese Allele gehörten zu Genen für MHC-II-Proteine.

Die stärkste Assoziation zeigten HLA-DQA1*02:01, HLA-DRB1*07:01 und HLA-DQB1*02:02. Weitere Assoziationen zeigten DQA1*01:02, DQA1*05:01, DQB1*02:01, DQB1*03:03, DQB1*06:02, DPB1*03:01, DRB1*03:01 und DRB1*15:01.

HLA-Allel	Patienten (Anti-Lgi1-E)			Kontrollen			P-Wert (adj)	OR [95% Konfidenzintervall]
	Positiv	Negativ	Frequenz	Positiv	Negativ	Frequenz		
DQA1*02:01	53	55	0,4907	282	2106	0,1181	1,38x10 ⁻¹⁶	13.36 [7.34-24.33]
DRB1*07:01	53	55	0,4907	282	2106	0,1181	1,61x10 ⁻¹⁶	13.36 [7.34-24.33]
DQB1*02:02	40	68	0,3704	190	2198	0,0796	3,76x10 ⁻¹⁵	10,01 [5,74-17,45]
DQB1*03:03	14	94	0,1296	117	2271	0,0796	0,0028	3,06 [1,60-5,86]
DQA1*05:01	11	97	0,1019	605	1783	0,2534	0,0052	0,37 [0,19-0,69]
DQA1*01:02	11	97	0,1019	501	1887	0,2098	0,0258	0,45 [0,24-0,85]
DQB1*02:01	3	105	0,0278	278	2110	0,1164	0,0326	0,23 [0,07-0,72]
DPB1*03:01	3	105	0,0278	271	2115	0,1136	0,0391	0,22 [0,07-0,69]
DRB1*03:01	3	105	0,0278	275	2113	0,1152	0,0444	0,23 [0,07-0,73]
DQB1*06:02	6	102	0,0556	329	2059	0,1378	0,0453	0,38 [0,16-0,87]
DRB1*15:01	6	102	0,0556	336	2052	0,1407	0,0467	0,37 [0,16-0,86]

Tabelle 3: Ergebnisse der HLA-Assoziationstestung der Anti-Lgi1 Enzephalitis

54 Patienten mit Anti-Lgi1 Enzephalitis (Anti-Lgi1-E) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (n=1194).

Allelhäufigkeiten und Frequenz sind für alle signifikant assoziierten HLA-Allele angegeben. Das Vorhandensein bestimmter Allele wird als „positiv“ bezeichnet, liegt das Allel nicht vor „negativ“.

OR=Odds Ratio

Adj=adjustiert

3.3.2 Die Anti-Lgi1 Enzephalitis und assoziierte Haplotypen

Neben der Feststellung der Assoziation zwischen Anti-Lgi1 Enzephalitis und einzelnen Allelen der HLA-Region fand sich eine weitere Beobachtung: In allen Proben von Enzephalitispatienten und gesunden Kontrollen zeigte sich, dass DRB1*07:01 und DQA1*02:01 immer gemeinsam auftraten. Das lässt sich mit dem Phänomen des Linkage Disequilibrium erklären, denn HLA-Allele werden nicht unabhängig voneinander vererbt.

Der Haplotyp, bestehend aus DRB1*07:01 und DQA1*02:01, im Weiteren als H1 bezeichnet, war stark assoziiert mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis. (Odds Ratio = 7.20 95%, Konfidenzintervall=4.84-10.71, $P < 2.2 \times 10^{-16}$). Da DRB1*07:01 und DQA1*02:01 unabhängig vom Phänotyp immer gemeinsam auftraten, können keine Aussagen hinsichtlich des Beitrages des einzelnen Allels zur Krankheitsausprägung getroffen werden.

Darüber hinaus zeigten zwei weitere Haplotypen, im Weiteren H2 und H3 genannt, eine Assoziation mit Anti-Lgi1 Enzephalitis. H2 setzte sich aus DRB1*07:01, DQA1*02:01 und DQB1*02:02 zusammen und H3 aus DRB1*07:01, DQA1*02:01 und DQB1*03:03.

Haplotyp H1: HLA-DRB1*07:01 + HLA-DQA1*02:01

	Kontrollen	Anti-Lgi1-E	Anti-NMDAR-E
H1+ (Freq)	282 (0,12)	53 (0,49)	27 (0,14)
H1- (Freq)	2106 (0,88)	55 (0,51)	165 (0,86)
Gesamt (Freq)	2388 (1,0)	108 (1,0)	192 (1,0)
	OR=7,2 [4,84-10,71] P<2,2x10 ⁻¹⁶		

Haplotyp H2: HLA-DRB1*07:01 + HLA-DQA1*02:01 + HLA-DQB1*02:02

	Kontrollen	Anti-Lgi1-E	Anti-NMDAR-E
H2+ (Freq)	190 (0,08)	40 (0,37)	19 (0,10)
H2- (Freq)	2198 (0,92)	68 (0,63)	173 (0,90)
Gesamt (Freq)	2388 (1,0)	108 (1,0)	192 (1,0)
	OR=6,8 [4,48-10,33] P<2,2x10 ⁻¹⁶		

Haplotyp H3: HLA-DRB1*07:01 + HLA-DQA1*02:01 + HLA-DQB1*03:03

	Kontrollen	Anti-Lgi1-E	Anti-NMDAR-E
H3+ (Freq)	92 (0,04)	13 (0,12)	8 (0,04)
H3- (Freq)	2296 (0,96)	95 (0,88)	184 (0,96)
Gesamt (Freq)	2388 (1,0)	108 (1,0)	192 (1,0)
	OR=3,42 [1,84-6,32] P<9,65x10 ⁻⁵		

Tabelle 4: Mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis assoziierte Haplotypen

Die Assoziation zwischen den Haplotypen und der Anti-Lgi1 Enzephalitis wurde mit einem Chi-Quadrat-Test berechnet. Das Vorhandensein des jeweiligen Haplotyps wird in den Tabellen mit „+“ angezeigt und das Nicht-Vorhandensein mit „-“. Als Referenz werden die Haplotyp-Häufigkeiten in der Anti-NMDAR-Gruppe angegeben.

Anti-Lgi1-E=Anti-Lgi1 Enzephalitis

Anti-NMDAR-E=Anti-N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor Enzephalitis

Freq=Frequenz

In der Betrachtung der einzelnen vorliegenden Allele zeigte sich, dass der Großteil der Anti-Lgi1 Enzephalitispatienten entweder heterozygot oder sogar homozygot für H1 war. Dies steht im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in welcher der Großteil der Probanden H1-negativ war. Bei Betrachtung der Anti-NMDAR-Gruppe zeigte sich, dass die Haplotypenverteilung in dieser Gruppe fast mit der Kontrollgruppe übereinstimmte.

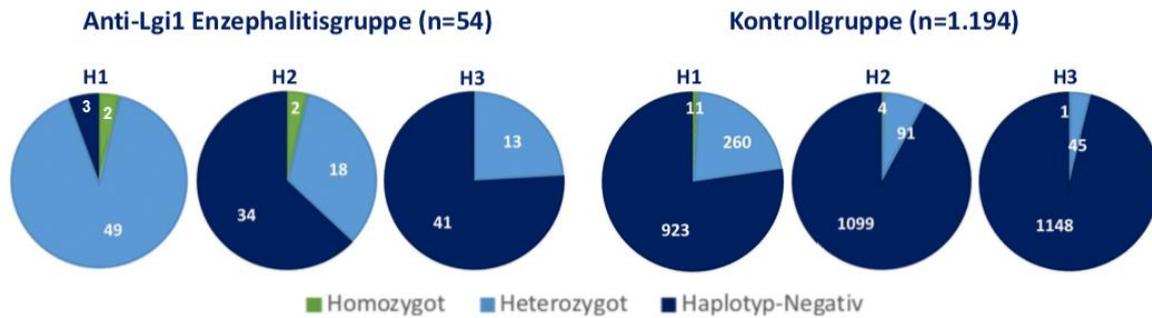


Abbildung 10: Verteilung der heterozygoten und homozygoten Haplotypen
Verteilung von H1, H2 und H3 in der Anti-Lgi1- und der Kontrollgruppe. 51 Patienten mit Anti-Lgi1 Enzephalitis waren heterozygot oder homozygot für H1.

3.3.3 HLA-Assoziation der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis

Bei der Untersuchung einer genetischen Prädisposition der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis wurde auch für diese Gruppe eine HLA-Assoziationsanalyse durchgeführt. Die Analyse der gesamten Gruppe erbrachte nach α -Adjustierung für multiples Testen mittels PyHLA ein statistisch signifikantes Ergebnis. Es handelte sich um ein Allel der MHC-I-Region: HLA-B*07:02 (Odds Ratio = 2.01, 95% Konfidenzintervall=1.23-3.29, P=0.039) Bei genauerer Betrachtung dieser Assoziation und der Untersuchung von Subgruppen wurde zwischen jüngeren und älteren Patienten (Medianes Alter bei Krankheitsbeginn 23,5 Jahre, Dichotomisierung in $\leq 23,5$ oder $>23,5$ Jahre) unterschieden. Es zeigt sich, dass die Assoziation in der älteren Gruppe ($>23,5$ Jahre) stärker ausgeprägt war (Odds Ratio=2.32, 95% Konfidenzintervall=1.34-4.00, P=0,0175). In der jüngeren Gruppe ($\leq 23,5$ Jahre) fehlte die Assoziation.

Phänotyp	HLA-Allel	Patienten			Kontrollen			P-Wert (adj)	OR [95% Konfidenzintervall]
		Positiv	Negativ	Frequenz	Positiv	Negativ	Frequenz		
Anti-NMDAR-E gesamt	B*07:02+	34	156	0.1789	309	2047	0,1312	0.0390	2.01 [1.23-3.29]
Anti-NMDAR-E $\leq 23,5$ J	B*07:02+	13	79	0.1413	309	2047	0,1312	0.8383	1.20 [0.32-4.43]
Anti-NMDAR-E $>23,5$ J	B*07:02+	21	77	0.2143	309	2047	0,1312	0.0175	2.32 [1.34-4.00]

Tabelle 5: Ergebnisse der HLA-Assoziationsstestung in der Anti-NMDAR Enzephalitisgruppe 96 Patienten mit Anti-NMDAR Enzephalitis (Anti-NMDAR-E) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (n=1194). Unterscheidung von Subgruppen mit Krankheitsbeginn vor oder nach dem 23,5 Lebensjahr.

Allelhäufigkeiten und Frequenz sind für alle signifikant assoziierten HLA-Allele angegeben. Das Vorhandensein bestimmter Allele wird als „positiv“ bezeichnet, liegt das Allel nicht vor „negativ“.

-für dieses Gen konnten die Allele nicht in allen Proben lückenlos imputiert werden, was zu einer Reduktion der eingehenden Probenanzahl führte

OR=Odds Ratio

J=Jahre

3.4 Zusammenfassung

Die beiden untersuchten Enzephalitiskohorten entsprachen in ihren epidemiologischen und klinischen Merkmalen den jeweils klassischen und bekannten Ausprägungen. In der mehrschrittigen Assoziationsanalyse fanden sich insbesondere für die Anti-Lgi1 Enzephalitis statistisch signifikante Ergebnisse. In der markerbezogenen Assoziationsanalyse zeigte ein SNP auf Chromosom 6 eine signifikante Assoziation mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis. Darüber hinaus fanden sich zwei weitere SNPs auf Chromosom 4 und auf Chromosom 19, die eine grenzwertig signifikante Assoziation mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis zeigten. Für die Anti-NMDAR Enzephalitis ergab sich in diesem Analyseschritt kein signifikantes Ergebnis.

Bei der anschließenden HLA-Assoziationsanalyse zeigten sich mehrere HLA-II-Allele signifikant mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis assoziiert. In der Anti-NMDAR Enzephalitisgruppe ergab sich lediglich eine schwache Assoziation zu einem HLA-I-Allel.

4. Diskussion

Die Untersuchung auf eine genetische Prädisposition der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis erfolgte mittels einer Genome-Wide Association Study. Es handelte sich um die erste GWAS, die an den beiden häufigsten Formen autoimmuner Enzephalitis mit Antikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene durchgeführt wurde. Bei der Auswertung der Genotypisierungsergebnisse wurde in zwei Analyseschritten zunächst die Assoziation von einzelnen Markern mit den beiden Enzephalitisgruppen untersucht und anschließend eine Assoziation von Allelen der HLA-Region überprüft.

Für die Anti-Lgi1 Enzephalitis ergaben sich sowohl in der genomweiten markerspezifischen Assoziationsanalyse als auch in der HLA-Assoziationsanalyse signifikante Ergebnisse. Mehrere SNPs auf Chromosom 6 zeigten signifikante Assoziation. In Bezug auf eine Assoziation zwischen der Anti-Lgi1 Enzephalitis und bestimmten HLA-Allelen ist insbesondere die Entdeckung der starken Assoziation der MHC-II-Allele DRB1*07:01 und DQA1*02:01 hervorzuheben.

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen zeigte sich für die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis keine signifikante Assoziation mit einem bestimmten Marker. Erst die genaue Analyse der MHC-Region ergab eine Assoziation der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis mit HLA-B*07:02.

4.1 Ergebnisdiskussion in Bezug auf die Anti-Lgi1 Enzephalitis

4.1.1 Markerbezogene Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis

Die markerbezogene Analyse zeigte eine starke Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis mit SNP rs2858870 auf Chromosom 6 in der HLA-Region. In nächster Nähe zu diesem SNP lagen 26 andere SNPs, die mit ähnlich hoher Signifikanz mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis assoziiert waren. Aufgrund des stark ausgeprägten LD in dieser Region kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob ein einzelner dieser SNPs als kausale Variante des Assoziationssignals angesehen werden kann.

Aufgrund der Tatsache, dass die Anzahl der untersuchten Proben relativ gering war, ist es umso bemerkenswerter, dass es neben diesen stark assoziierten Markern noch zwei weitere SNPs gab, die ein gehäuftes Vorkommen in dieser Kohorte zeigten.

Auf Chromosom 19 fand sich rs62110161, welcher in der Nähe von wenig erforschten Zinkfingerengen liegt. Insbesondere bestand ein Zusammenhang mit Zinkfingerengen *ZNF528*. Bei *ZNF528* handelt es sich um ein für ein Protein kodierendes Gen (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF528>). Dieses scheint im Zellkern exprimiert zu werden, bindet an DNA und übernimmt eine noch nicht näher beschriebene Funktion als Transkriptionsfaktor. Vermutlich nimmt es Einfluss auf die Transkriptionsregulation im Zellkern (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q3MIS6>). Exprimiert wird *ZNF528* im Gehirn - im Lobus Frontalis, Corpus Callosum (https://bgee.org/?page=gene&gene_id=ENSG00000167555) und vor allem im Cerebellum und dem Nucleus Caudatus (<http://omim.org/entry/615580?search=ZNF528&highlight=znf528>).

Auf Chromosom 4 fand sich rs72961463. Dieser SNP ist assoziiert mit einem Gen für die Doublecortin Like Kinase 2 (DCLK2). Die Proteine der Gruppe der Doublecortin Like Kinasen wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, wo sie zwei wichtige Aufgaben erfüllen. Erstens sind DCLKs entscheidend an der Vermittlung dendritischen Wachstums beteiligt, zweitens regulieren und inhibieren sie die Entwicklung glutamaterger Synapsen. Die Überexpression von DCLK1 führt zu einer Reduktion von AMPA-Rezeptoren im murinen Model (Shin et al., 2013). DCLK 1 und 2 zeigen große Ähnlichkeit in ihrer Expression und Struktur, was vermuten lässt, dass auch eine Dysregulation von DCLK2 zu einer reduzierten AMPA-Rezeptor Wirkung führt. Außerdem verursacht das Fehlen von DCLK2 bei Mäusen eine gestörte Entwicklung des Hippocampus mit einhergehender Epilepsie (Kerjan et al., 2009). All diese Aspekte lassen mutmaßen, dass DCLK2 an der Krankheitsausprägung der Anti-Lgi1 Enzephalitis beteiligt sein könnte.

Die Entdeckung der beiden nur knapp unterhalb genomweiter Signifikanz liegenden Varianten lässt hoffen, dass weitere GWAS an größeren Kohorten neben tieferen

Einblicken in die genetischen Grundlagen auch ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Anti-Lgi1 Enzephalitis liefern könnten.

4.1.2 HLA-Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis

Das bedeutendste Ergebnis dieser GWAS in Bezug auf die Anti-Lgi1 Enzephalitis ist die signifikante HLA-Assoziation mit DRB1*07:01 und DQA1*02:01. Zudem zeigte sich, dass beide Allele immer gemeinsam auftraten und somit einen Haplotyp (H1) formten. Der Abgleich dieser Informationen mit der Allele Frequency Net Database in Bezug auf das gemeinsame Vorkommen von DRB1*07:01 und DQA1*02:01 in der deutschen Population erbrachte keine weiteren Erkenntnisse. Die Allele Frequency Net Database (AFND) ist eine frei nutzbare zentrale Datenbank, die es ermöglicht, das Vorkommen und die Häufigkeit von bestimmten Allelen des gesamten menschlichen Genoms mit internationalen Daten zu vergleichen (González-Galarza et al., 2015). Im internationalen Datenvergleich fand sich eine japanische Kohorte (n=3078) und eine amerikanische Kohorte (n=1889), die beide auch ausschließlich diesen Haplotyp aufwiesen.

Allerdings ist keines dieser Allele jemals zuvor mit einer anderen Autoimmunerkrankung in Verbindung gebracht worden, was die Betrachtung der umfassenden Informationen des NHGRI-EBI GWAS Katalog zeigte (MacArthur et al., 2017). Bei diesem Katalog handelt es sich um eine Sammlung der Ergebnisse von internationalen GWAS seit dem Jahr 2008.

Interessanterweise waren H1 ebenso wie DQB1*02:02 (H2) in einer großen GWAS assoziiert mit Konzentrationsänderungen verschiedener Immunglobulinklassen (Jonsson et al., 2017). Da die Autoantikörper bei der Anti-Lgi1 Enzephalitis hauptsächlich vom Typ IgG4 sind lässt sich spekulieren, dass diese HLA-Haplotypen durch eine Dysregulation der Immunglobulinkonzentrationen die Bildung von pathogenen IgG4-Antikörpern zusätzlich fördern.

In Zusammenschau mit anderen Studien und genetischen Untersuchungen scheinen insbesondere IgG4-assoziierte Enzephalitiden genetisch prädisponiert zu sein. Auch für andere IgG4-vermittelte Enzephalitiden wurde das Auftreten bestimmter HLA-Allele beschrieben:

Zum Beispiel für Enzephalitiden mit Autoantikörpern gegen IgG4, einem neuronalen Membranprotein mit noch weitestgehend unbekannter Funktion. Bei diesen Enzephalitiden kommt es unter anderem zu schweren Schlafstörungen (Sabater et al., 2016). Bei Patienten mit Antikörpern gegen IgG4 fanden sich MHC-II Allele HLA-DRB1*1001 und HLA-DQB1*0501 (Sabater et al., 2014).

Eine weitere autoimmune Enzephalitis mit Antikörpern vom IgG4-Typ betrifft Caspr2 (Contactin-associated protein-2), einem anderen neuronalen Membranprotein. Diese Erkrankung präsentiert sich klinisch als limbische Enzephalitis. Eine Assoziation zu HLA-DRB1*11:01 wurde festgestellt (Binks et al., 2018).

Neurologische Autoimmunerkrankungen mit IgG4-Typ-Antikörpern ähneln sich aufgrund der Funktion von IgG4-Antikörpern in den krankheitsverursachenden Mechanismen. Anders als zum Beispiel Antikörper gegen den NMDA-Rezeptor führen sie nicht zur Internalisierung des Antigens und somit zur veränderten Funktion, sondern beeinträchtigen das Antigen direkt und führen zu einer gestörten Protein-Protein-Interaktion (Huijbers et al., 2015). Diese pathophysiologische Gemeinsamkeit sowie das Auftreten von HLA-II Allelen lässt eine gewisse gemeinsame Ätiologie der IgG4-vermittelten Autoimmunerkrankungen vermuten. Die Untersuchung der genetischen Prädisposition der Anti-Lgi1 Enzephalitis ergänzt und erweitert das bisherige Wissen um die genetischen Grundlagen IgG4-assoziierter Erkrankungen.

4.1.3 Genetische Assoziationen in anderen Studien

Die Ergebnisse der GWAS an 54 Anti-Lgi1 Enzephalitispatienten bestätigt und erweitert die Erkenntnisse aus zwei früheren Studien. In einer koreanischen Studie von Dezember 2016 fand sich bei 10 von 11 Anti-Lgi1 Enzephalitispatienten HLA-Allel DRB1*07:01 (Kim et al., 2016). Eine niederländische Studie an 25 Patienten wies bei 22 Patienten das Vorliegen von HLA-DRB1*07:01 nach (van Sonderen et al., 2016).

In einer englischen Studie mit 68 Patienten, welche nach der Publikation der hier beschriebenen Ergebnisse veröffentlicht wurde, bestätigten sich die vier auch in dieser GWAS führenden HLA-Allele: DRB1*07:01, DQB1*02:02, DQA1*02:01, DQB1*03:03 (Binks et al., 2018).

In diesen Studien wurde ebenso wie in dieser GWAS eine Analyse von Untergruppen durchgeführt. Die Assoziationsanalyse für unterschiedliche Altersgruppen oder Patienten mit Tumor erbrachte keine weiteren Erkenntnisse in der Anti-Lgi1-Gruppe. Binks et al. schlussfolgern aus der Ähnlichkeit bezüglich des HLA-Profiles zwischen Patienten mit und ohne Tumor allerdings, dass es sich bei der Anti-Lgi1 Enzephalitis nicht um eine paraneoplastische Erscheinung handelt, sondern dass es sich beim Vorliegen eines Tumors eher um einen Zusammenhang mit dem höheren Patientenalter dieser Gruppe handelt.

4.2 Gegenüberstellung der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis

Zwischen den beiden Enzephalitisgruppen fanden sich keinerlei Übereinstimmungen in den Assoziationsanalysen. Dies lässt auf grundlegende Unterschiede hinsichtlich genetischer Prädisposition und auch der Pathophysiologie der beiden Erkrankungen schließen. In der markerspezifischen Assoziationsanalyse zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse für die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis.

Auch in der koreanischen Studie wurden 17 Anti-NMDAR Enzephalitispatienten untersucht. Es konnte keine HLA-Assoziation nachgewiesen werden (Kim et al., 2016).

4.2.1 Der Unterschied zwischen Assoziation mit MHC-I und MHC-II Allelen

Die detaillierte Analyse der MHC-Region ergab unterschiedliche Ergebnisse für die Anti-Lgi1 Enzephalitis und die Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis. Die Anti-Lgi1 Enzephalitis zeigte sich assoziiert mit verschiedenen HLA-II-Allelen. Die Analyse bezogen auf Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis, die bei Krankheitsbeginn 23,5 Jahre und älter waren, ergab eine schwache Assoziation mit einem HLA-I-Allel.

Lgi1 ist ein lösliches Protein, welches in den synaptischen Spalt sekretiert wird und über Interaktion mit ADAM22 maßgeblich an der Regulation und der Expression von AMPA-Rezeptoren beteiligt ist. Es lässt sich vermuten, dass Lgi1 aufgrund seines freien Vorliegens im synaptischen Spalt von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert und anschließend über MHC-II-Moleküle präsentiert werden könnte. Antigenpräsentierende

Zellen werden zu den das Gehirn drainierenden zervikalen Lymphknoten transportiert, wo die Präsentation und Aktivierung inflammatorischer T-Zellen stattfindet. Dieser Mechanismus wurde bereits für andere Antigene des ZNS beschrieben. So spielt die Antigenpräsentation in zervikalen Lymphknoten zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung und -erhaltung (Vos et al., 2002).

Der NMDA-Rezeptor ist ein membranständiges Protein. Erst nach Schädigung des Neurons könnte der NMDA-Rezeptor als Antigen durch eine antigenpräsentierende Zelle aufgenommen werden, welche Antigene über MHC-II-Proteine präsentiert (Planas et al., 2012). Allerdings kommt es bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis nicht zu einer primären Schädigung der Neurone und sowohl die Symptome der Erkrankung als auch die reduzierte Expression von NMDA-Rezeptoren sind bei Entfernung der Antikörper reversibel. MHC-I-Moleküle werden auf der Zelloberfläche aller kernhaltigen Körperzellen exprimiert, also auch auf der Oberfläche von Neuronen. Darüber hinaus ist bekannt, dass es sich bei Anti-NMDA-Rezeptor Antikörpern um intrathekal produzierte Antikörper handelt (Dalmau et al., 2008), wohingegen die Synthese von Anti-Lgi1 Antikörpern systemisch erfolgt (Jarius et al., 2008).

4.3 Limitationen der Studie

Aufgrund der Seltenheit der untersuchten Erkrankungen und der relativ kurzen Zeitspanne seit ihrer Entdeckung stellte die Zusammenstellung ausreichend großer Studienkohorten eine Herausforderung dar. Die Berechnung der Power für die Kohortengrößen zeigte, dass nur genetische Varianten mit einer Odds Ratio größer als 3-4 und mit einer MAF über 0,05 mit einer statistischen Power von 80% sicher nachgewiesen werden konnten.

Dem entsprechend sollten die Ergebnisse aus dieser GWAS in weiteren Studien mit einer größeren Anzahl von Proben bestätigt und erweitert werden. Insbesondere die Marker, die eine Häufung in der Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe zeigten, in der Assoziationsberechnung aber knapp unter der genomweiten Signifikanz blieben, sollten in weiteren Untersuchungen reevaluiert werden.

4.4 Ausblick

Die Untersuchung einer genetischen Prädisposition der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis hat deutliche Hinweise auf das Vorhandensein genetischer Assoziationen und damit neue Erkenntnisse erbracht. Neben der Seltenheit der Erkrankungen stellte die Beschaffung von DNA-Material eine große Herausforderung dar. Bisher war es notwendig, Blutproben von den Patienten zu erhalten, um ausreichend viel DNA für die Durchführung einer GWAS gewinnen zu können. Eine Weiterentwicklung der Genotypisierungsmethoden wird es zukünftig ermöglichen, DNA aus Mundschleimhautabstrichen der Patienten zu verwenden. Dies wird die Rekrutierung von Patienten deutlich erleichtern, weil dieser Weg der DNA-Probengewinnung vom Patienten selbst durchgeführt werden kann und keine Blutentnahme mehr erforderlich ist.

Darüber hinaus ist neben der Erweiterung der Kohorten auch eine Erweiterung der Kontrollgruppe geplant. Dazu soll das sogenannte „Spouse-Recruiting“ stattfinden. Damit ist gemeint, dass die Partner von Patienten als Kontrollen rekrutiert werden. Zusätzlich zur Gewinnung weiterer Probanden wird diese Methode auch die Vergleichbarkeit von Ergebnissen der Patienten- und Kontrollgruppe zum Beispiel in Bezug auf Umwelteinflüsse verbessern.

Insbesondere die Erforschung der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis würde von einer größeren Probenanzahl sehr profitieren, da hier die Analyse von Untergruppen zusätzliche Erkenntnisse ergab. Zudem zeigt diese Patientengruppe eine größere phänotypische Heterogenität als die Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe.

Darüber hinaus rücken andere Gruppen autoimmuner Enzephalitiden mit Antikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene, wie CASPR2 und GAD65 (65 kD Glutamic Acid Decarboxylase) in den Fokus der Erforschung einer genetischen Prädisposition.

4.5 Schlussfolgerungen

Die Erkenntnisse aus dieser GWAS zur Untersuchung einer genetischen Prädisposition der Anti-NMDAR Enzephalitis und der Anti-Lgi1 Enzephalitis ermöglichte die Feststellung einer Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis mit bestimmten HLA-II-Haplotypen. Im Gegensatz dazu zeigte die Anti-NMDAR Enzephalitis keine eindeutige

genetische Prädisposition, sondern es ließ sich lediglich eine schwache Assoziation zu einem HLA-I-Allel feststellen.

Überdies fand sich eine potentielle Assoziation der Anti-Lgi1 Enzephalitis mit zwei an der neuronalen Regulation beteiligten Genen: ein unbekanntes Zinkfingergen auf Chromosom 19 und *DCLK2* auf Chromosom 4. Diese Assoziationen müssen mittels Untersuchung einer größeren Kohorte noch bestätigt werden. Vor allem IgG4-assoziierte Erkrankungen scheinen eine genetische Prädisposition aufzuweisen.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Anti-Lgi1 Enzephalitis eine starke genetische Prädisposition zeigte, was im Gegensatz dazu bei der Anti-NMDA-Rezeptor Enzephalitis nicht der Fall war.

5. Zusammenfassung

Die Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Enzephalitis und die Anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 Enzephalitis sind die beiden häufigsten autoimmunen, synaptischen Enzephalitiden. In den meisten Fällen ist ihre Ursache unbekannt und somit stellte sich die Frage nach einer genetischen Prädisposition. An 150 Patienten und an 1194 gesunden Kontrollen wurde eine Genome-Wide Association Study durchgeführt. Die Genotypisierung erfolgte auf dem Global Screening Array der Firma Illumina.

Es wurde eine mehrschrittige Datenauswertung sowohl der direkt genotypisierten Marker als auch imputierter Marker durchgeführt.

In der markerspezifischen Assoziationsanalyse ergab sich ein signifikantes Ergebnis für die Anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 Enzephalitis. Auf Chromosom 6, auf dem auch die Human Leukocyte Antigen Region gelegen ist, fand sich ein Single Nucleotide Polymorphism, der eine hochsignifikante Assoziation zeigte: rs2858870 (Odds Ratio=13,6, 95% Konfidenzintervall=7,50-24,87, $P=1,22 \times 10^{-7}$). Für die Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Enzephalitis ergaben sich in diesem Analyseschritt keine signifikanten Ergebnisse.

Im nächsten Abschnitt der Datenauswertung wurden Human Leukocyte Antigen Allele imputiert. Bei der Assoziationsanalyse zeigte sich, dass mehrere Human Leukocyte Antigen Klasse-2 Allele mit der Anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 Enzephalitis assoziiert waren. In der Assoziationsanalyse der Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Enzephalitis ergab sich eine schwache Assoziation mit einem Human Leukocyte Antigen Klasse-1 Allel in der Untergruppe der älteren Patienten.

Human Leukocyte Antigen Allele werden nicht unabhängig voneinander vererbt. Somit lassen sich beim gemeinsamen Auftreten von zwei oder mehr Allelen Haplotypen bilden. Es stellte sich heraus, dass DRB1*07:01 und DQA1*02:01 immer zusammen auftraten. Diese beiden Allele formten den Haplotypen 1 (Odds Ratio=7,2, Konfidenzintervall=4,84-10,71, $P < 2,2 \times 10^{-16}$).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Anti-Leucine-rich glioma-inactivated 1 Enzephalitis eine starke genetische Prädisposition zeigte und insbesondere eine Assoziation mit bestimmten Human Leukocyte Antigen-2 Allelen aufwies. Im Gegensatz dazu scheint dies bei der Anti-N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Enzephalitis nicht der Fall zu sein.

6. Literaturverzeichnis

Abecasis, G.R., Ghosh, D., und Nichols, T.E. (2005). Linkage Disequilibrium: Ancient History Drives the New Genetics. *HHE* 59, 118–124.

Adang, L.A., Lynch, D.R., und Panzer, J.A. (2014). Pediatric anti-NMDA receptor encephalitis is seasonal. *Ann Clin Transl Neurol* 1, 921–925.

Armangue, T., Petit-Pedrol, M., und Dalmau, J. (2012). Autoimmune Encephalitis in Children. *J Child Neurol* 27, 1460–1469.

Armangue, T., Leypoldt, F., Málaga, I., Raspall-Chaure, M., Marti, I., Nichter, C., Pugh, J., Vicente-Rasoamalala, M., Lafuente-Hidalgo, M., Macaya, A., et al. (2014). Herpes Simplex Virus Encephalitis is a Trigger of Brain Autoimmunity. *Ann Neurol* 75, 317–323.

Binks, S., Varley, J., Lee, W., Makuch, M., Elliott, K., Gelfand, J.M., Jacob, S., Leite, M.I., Maddison, P., Chen, M., et al. (2018). Distinct HLA associations of LGI1 and CASPR2-antibody diseases. *Brain* 141, 2263–2271.

Bush, W.S., und Moore, J.H. (2012). Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLOS Computational Biology* 8, e1002822.

Chang, C.C., Chow, C.C., Tellier, L.C., Vattikuti, S., Purcell, S.M., und Lee, J.J. (2015). Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* 4, 1–16.

Consortium, T. 1000 G.P. (2015a). A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 68–74.

Consortium, T.Gte. (2015b). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science* 348, 648–660.

Dalmau, J., Gleichman, A.J., Hughes, E.G., Rossi, J.E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S.K., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., und Lynch, D.R. (2008). Anti-NMDA-receptor

encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7, 1091–1098.

Dalmau, J., Lancaster, E., Martinez-Hernandez, E., Rosenfeld, M.R., und Balice-Gordon, R. (2011). Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *The Lancet Neurology* 10, 63–74.

Das, S., Forer, L., Schönherr, S., Sidore, C., Locke, A.E., Kwong, A., Vrieze, S.I., Chew, E.Y., Levy, S., McGue, M., et al. (2016). Next-generation genotype imputation service and methods. *Nature Genetics* 48, 1284–1287.

Fan, Y., und Song, Y.-Q. (2017). PyHLA: tests for the association between HLA alleles and diseases. *BMC Bioinformatics* 18.

Fletcher, R.H., und Fletcher, S.W. (2007). *Klinische Epidemiologie - Grundlagen und Anwendung* (Bern: Hans Huber).

Florance, N.R., Davis, R.L., Lam, C., Szperka, C., Zhou, L., Ahmad, S., Campen, C.J., Moss, H., Peter, N., Gleichman, A.J., et al. (2009). Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDAR) Encephalitis in Children and Adolescents. *Ann Neurol* 66, 11–18.

Fukata, Y., Lovero, K.L., Iwanaga, T., Watanabe, A., Yokoi, N., Tabuchi, K., Shigemoto, R., Nicoll, R.A., und Fukata, M. (2010). Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3799–3804.

Gable, M.S., Sheriff, H., Dalmau, J., Tilley, D.H., und Glaser, C.A. (2012). The Frequency of Autoimmune N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis Surpasses That of Individual Viral Etiologies in Young Individuals Enrolled in the California Encephalitis Project. *Clin Infect Dis* 54, 899–904.

Gibson, G. (2010). Hints of hidden heritability in GWAS. *Nature Genetics* 42, 558–560.

Glaser, C.A., Honarmand, S., Anderson, L.J., Schnurr, D.P., Forghani, B., Cossen, C.K., Schuster, F.L., Christie, L.J., und Tureen, J.H. (2006). Beyond Viruses: Clinical Profiles and Etiologies Associated with Encephalitis. *Clin Infect Dis* 43, 1565–1577.

González-Galarza, F.F., Takeshita, L.Y.C., Santos, E.J.M., Kempson, F., Maia, M.H.T., Silva, A.L.S. da, Silva, A.L.T. e, Ghattaoraya, G.S., Alfirevic, A., Jones, A.R., et al. (2015). Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res* 43, D784–D788.

de Graaf, M.T., de Beukelaar, J.W.K., Haasnoot, G.W., Levering, W.H.B.M., Rogemond, V., Didelot, A., Honnorat, J., Gratama, J.W., und Smitt, P.A.E.S. (2010). HLA-DQ2+ individuals are susceptible to Hu-Ab associated paraneoplastic neurological syndromes. *Journal of Neuroimmunology* 226, 147–149.

Granerod, J., Ambrose, H.E., Davies, N.W., Clewley, J.P., Walsh, A.L., Morgan, D., Cunningham, R., Zuckerman, M., Mutton, K.J., Solomon, T., et al. (2010). Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *The Lancet Infectious Diseases* 10, 835–844.

Granerod, J., Cousens, S., Davies, N.W.S., Crowcroft, N.S., und Thomas, S.L. (2013). New Estimates of Incidence of Encephalitis in England. *Emerg Infect Dis* 19, 1455–1462.

Graus, F., Titulaer, M.J., Balu, R., Benseler, S., Bien, C.G., Cellucci, T., Cortese, I., Dale, R.C., Gelfand, J.M., Geschwind, M., et al. (2016). A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *The Lancet Neurology* 15, 391–404.

Gresa-Arribas, N., Titulaer, M.J., Torrents, A., Aguilar, E., McCracken, L., Leypoldt, F., Gleichman, A.J., Balice-Gordon, R., Rosenfeld, M.R., Lynch, D., et al. (2014). Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *The Lancet Neurology* 13, 167–177.

Gunderson, K.L. (2009). Whole-Genome Genotyping on Bead Arrays. In *DNA Microarrays for Biomedical Research: Methods and Protocols*, M. Dufva, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 197–213.

Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M.J., Povey, S., Talbot, C.C., Wright, M.W., et al. (2004). Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5, 889–899.

Hughes, E.G., Peng, X., Gleichman, A.J., Lai, M., Zhou, L., Tsou, R., Parsons, T.D., Lynch, D.R., Dalmau, J., and Balice-Gordon, R.J. (2010). Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci* 30, 5866–5875.

Huijbers, M.G., Querol, L.A., Niks, E.H., Plomp, J.J., Maarel, S.M. van der, Graus, F., Dalmau, J., Illa, I., and Verschuuren, J.J. (2015). The expanding field of IgG4-mediated neurological autoimmune disorders. *European Journal of Neurology* 22, 1151–1161.

Irani, S.R., Alexander, S., Waters, P., Kleopa, K.A., Pettingill, P., Zuliani, L., Peles, E., Buckley, C., Lang, B., and Vincent, A. (2010). Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan’s syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133, 2734–2748.

Irani, S.R., Michell, A.W., Lang, B., Pettingill, P., Waters, P., Johnson, M.R., Schott, J.M., Armstrong, R.J.E., S. Zagami, A., Bleasel, A., et al. (2011). Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol*. 69, 892–900.

Jarius, S., Hoffmann, L., Clover, L., Vincent, A., and Voltz, R. (2008). CSF findings in patients with voltage gated potassium channel antibody associated limbic encephalitis. *Journal of the Neurological Sciences* 268, 74–77.

Jia, X., Han, B., Onengut-Gumuscu, S., Chen, W.-M., Concannon, P.J., Rich, S.S., Raychaudhuri, S., and de Bakker, P.I.W. (2013). Imputing Amino Acid Polymorphisms in Human Leukocyte Antigens. *PLoS One* 8.

Jonsson, S., Sveinbjornsson, G., Portilla, A.L. de L., Swaminathan, B., Plomp, R., Dekkers, G., Ajore, R., Ali, M., Bentlage, A.E.H., Elmér, E., et al. (2017). Identification of sequence variants influencing immunoglobulin levels. *Nature Genetics* 49, 1182–1191.

Kerjan, G., Koizumi, H., Han, E.B., Dubé, C.M., Djakovic, S.N., Patrick, G.N., Baram, T.Z., Heinemann, S.F., und Gleeson, J.G. (2009). Mice lacking doublecortin and doublecortin-like kinase 2 display altered hippocampal neuronal maturation and spontaneous seizures. *PNAS* 106, 6766–6771.

Kim, T.-J., Lee, S.-T., Moon, J., Sunwoo, J.-S., Byun, J.-I., Lim, J.-A., Shin, Y.-W., Jun, J.S., Lee, H.S., Lee, W.-J., et al. (2016). Anti-LGI1 Encephalitis is Associated with Unique HLA Subtypes. *Ann Neurol.* n/a-n/a.

Kitts, A., und Sherry, S. (2011). The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation (National Center for Biotechnology Information (US)).

Klein, J., und Sato, A. (2000). The HLA System. *New England Journal of Medicine* 343, 702–709.

Lai, M., Huijbers, M.G., Lancaster, E., Graus, F., Bataller, L., Balice-Gordon, R., Cowell, J.K., und Dalmau, J. (2010). Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *The Lancet Neurology* 9, 776–785.

Lancaster, E. (2016). The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis. *J Clin Neurol* 12, 1–13.

Lancaster, E., und Dalmau, J. (2012). Neuronal autoantigens—pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol* 8, 380–390.

Laurie, C.C., Doheny, K.F., Mirel, D.B., Pugh, E.W., Bierut, L.J., Bhangale, T., Boehm, F., Caporaso, N.E., Cornelis, M.C., Edenberg, H.J., et al. (2010). Quality control and quality

assurance in genotypic data for genome-wide association studies. *Genet Epidemiol* 34, 591–602.

Lewerenz, J., Jarius, S., Wildemann, B., Wandinger, K.-P., und Leypoldt, F. (2016). Autoantikörperassoziierte autoimmune Enzephalitiden und Zerebellitiden. *Nervenarzt* 87, 1293–1299.

Leypoldt, F., Armangue, T., und Dalmau, J. (2015). Autoimmune encephalopathies. *Ann N Y Acad Sci* 1338, 94–114.

MacArthur, J., Bowler, E., Cerezo, M., Gil, L., Hall, P., Hastings, E., Junkins, H., McMahon, A., Milano, A., Morales, J., et al. (2017). The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res* 45, D896–D901.

Moscato, E.H., Jain, A., Peng, X., Hughes, E.G., Dalmau, J., und Balice-Gordon, R.J. (2010). Mechanisms underlying autoimmune synaptic encephalitis leading to disorders of memory, behavior and cognition: insights from molecular, cellular and synaptic studies. *Eur J Neurosci* 32, 298–309.

Murken, J., Grimm, T., und Holinski-Feder, E. (2006). *Taschenlehrbuch Humangenetik* (Stuttgart: Thieme).

Nica, A.C., und Dermitzakis, E.T. (2013). Expression quantitative trait loci: present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368.

Nöthlings, U., und Krawczak, M. (2012). PopGen. *Bundesgesundheitsbl.* 55, 831–835.

Ohkawa, T., Fukata, Y., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Yokoi, N., Takashima, H., Watanabe, M., Watanabe, O., und Fukata, M. (2013). Autoantibodies to Epilepsy-Related LGI1 in Limbic Encephalitis Neutralize LGI1-ADAM22 Interaction and Reduce Synaptic AMPA Receptors. *J Neurosci* 33, 18161–18174.

Planas, A.M., Gómez-Choco, M., Urra, X., Gorina, R., Caballero, M., und Chamorro, Á. (2012). Brain-Derived Antigens in Lymphoid Tissue of Patients with Acute Stroke. *The Journal of Immunology* 188, 2156–2163.

Price, A.L., Patterson, N.J., Plenge, R.M., Weinblatt, M.E., Shadick, N.A., und Reich, D. (2006). Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics* 38, 904–909.

Purcell, S., Cherny, S.S., und Sham, P.C. (2003). Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19, 149–150.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A.R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I.W., Daly, M.J., et al. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics* 81, 559–575.

Sabater, L., Gaig, C., Gelpi, E., Bataller, L., Lewerenz, J., Torres-Vega, E., Contreras, A., Giometto, B., Compta, Y., Embid, C., et al. (2014). A novel non-rapid-eye movement and rapid-eye-movement parasomnia with sleep breathing disorder associated with antibodies to IgLON5: a case series, characterisation of the antigen, and post-mortem study. *The Lancet Neurology* 13, 575–586.

Sabater, L., Planagumà, J., Dalmau, J., und Graus, F. (2016). Cellular investigations with human antibodies associated with the anti-IgLON5 syndrome. *J Neuroinflammation* 13.

Schäbitz, W.-R., Rogalewski, A., Hagemeister, C., und Bien, C.G. (2014). VZV brainstem encephalitis triggers NMDA receptor immunoreaction. *Neurology* 83, 2309–2311.

Shin, E., Kashiwagi, Y., Kuriu, T., Iwasaki, H., Tanaka, T., Koizumi, H., Gleeson, J.G., und Okabe, S. (2013). Doublecortin-like kinase enhances dendritic remodelling and negatively regulates synapse maturation. *Nature Communications* 4, 1440.

Sonderen, A. van, Thijs, R.D., Coenders, E.C., Jiskoot, L.C., Sanchez, E., Bruijn, M.A.A.M. de, Coevorden-Hameete, M.H. van, Wirtz, P.W., Schreurs, M.W.J., Smitt, P.A.E.S., et al. (2016). Anti-LGI1 encephalitis Clinical syndrome and long-term follow-up. *Neurology* 87, 1449–1456.

van Sonderen, A., Roelen, D.L., Stoop, J.A., Verdijk, R.M., Haasnoot, G.W., Thijs, R.D., Wirtz, P.W., Schreurs, M.W.J., Claas, F.H.J., Sillevius Smitt, P.A.E., et al. (2016). Anti-LGI1 encephalitis is strongly associated with HLA-DR7 and HLA-DRB4. *Ann Neurol.* n/a-n/a.

Titulaer, M.J., McCracken, L., Gabilondo, I., Armangué, T., Glaser, C., Iizuka, T., Honig, L.S., Benseler, S.M., Kawachi, I., Martinez-Hernandez, E., et al. (2013). Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor encephalitis: a cohort study. *Lancet Neurol* 12, 157–165.

Tunkel, A.R., Glaser, C.A., Bloch, K.C., Sejvar, J.J., Marra, C.M., Roos, K.L., Hartman, B.J., Kaplan, S.L., Scheld, W.M., and Whitley, R.J. (2008). The Management of Encephalitis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 47, 303–327.

Tüzün, E., Zhou, L., Baehring, J.M., Bannykh, S., Rosenfeld, M.R., and Dalmau, J. (2009). Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 118, 737–743.

Visscher, P.M., Brown, M.A., McCarthy, M.I., and Yang, J. (2012). Five Years of GWAS Discovery. *The American Journal of Human Genetics* 90, 7–24.

Vora, N.M., Holman, R.C., Mehal, J.M., Steiner, C.A., Blanton, J., and Sejvar, J. (2014). Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1998–2010. *Neurology* 82, 443–451.

Vos, A.F. de, Meurs, M. van, Brok, H.P., Boven, L.A., Hintzen, R.Q., Valk, P. van der, Ravid, R., Rensing, S., Boon, L., Hart, B.A. 't, et al. (2002). Transfer of Central Nervous System

Autoantigens and Presentation in Secondary Lymphoid Organs. *The Journal of Immunology* 169, 5415–5423.

Ward, L.D., und Kellis, M. (2016). HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res* 44, D877–D881.

Ziegler, A., und König, I. (2010). *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology* (Weinheim: Wiley-Blackwell).

7. Anhang

Tabelle 6

Schritt in der Qualitätskontrolle	Ausschlusskriterium	Anzahl der ausgeschlossenen Marker
Kein Genotyp oder nur heterozygote Genotypen	Kein Genotyp oder nur heterozygote Genotypen	57.165
Missingness Rate	>2%	5053
Haploider Marker mit heterozygotem Genotyp	Haploider Marker mit heterozygotem Genotyp	1097
Minor Allele Frequency	<0,01	142.982
Hardy-Weinberg-Equilibrium	$P < 1 \times 10^{-20}$	20
Informative Missingness	$P < 1 \times 10^{-8}$	64

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ausschlusskriterien für genotypisierte Marker während der Qualitätskontrolle.

Tabelle 7

Chr	Basenpaar- position	rs-ID	Allel 1	Allel 2	Fall-MAF	Kontroll- MAF	OR [KI]	P-Wert
6	32.572.251	rs2858870	C	T	0,4907	0,1156	13,66 [7,50- 24,87]	1,22x10 ⁻¹⁷
6	32.580.999	rs12205706	T	C	0,4815	0,1135	13,66 [7,50- 24,87]	1,33x10 ⁻¹⁷
6	32.561.137	rs28366311	G	C	0,5000	0,1193	12,61 [7,05- 22,57]	1,39x10 ⁻¹⁷
6	32.580.928	rs12192221	G	A	0,4907	0,1185	12,70 [7,08- 22,77]	1,42x10 ⁻¹⁷
6	32.573.950	rs2647072	T	G	0,4907	0,1173	13,49 [7,41- 24,55]	1,69x10 ⁻¹⁷
6	32.581.491	rs10947320	T	C	0,4815	0,1156	12,72 [7,08- 22,86]	1,82x10 ⁻¹⁷
6	32.609.181	rs1129765	T	C	0,5185	0,1319	10,30 [6,02- 17,64]	1,86x10 ⁻¹⁷
6	32.572.666	rs2858869	G	A	0,4907	0,1177	13,42 [7,37- 24,44]	1,99x10 ⁻¹⁷
6	32.574.014	rs2647073	C	A	0,4907	0,1177	13,42 [7,37- 24,44]	1,99x10 ⁻¹⁷
6	32.574.991	rs13193798	A	G	0,4907	0,1177	13,42 [7,37- 24,44]	1,99x10 ⁻¹⁷

Chr	Basenpaar- position	rs-ID	Allel 1	Allel 2	Fall-MAF	Kontroll- MAF	OR [KI]	P-Wert
6	32.576.036	rs12206257	T	C	0,4907	0,1177	13.42 [7.37- 24.44]	1,99x10 ⁻¹⁷
6	32.577.847	rs13206219	T	G	0,4907	0,1177	13.42 [7.37- 24.44]	1,99x10 ⁻¹⁷
6	32.578.100	rs13206639	A	G	0,4907	0,1177	13.42 [7.37- 24.44]	1,99x10 ⁻¹⁷
6	32.580.703	rs12192104	C	A	0,4907	0,1181	13.36 [7.34- 24.33]	2,30x10 ⁻¹⁷
6	32.559.975	rs28366272	A	C	0,4907	0,1185	13.29 [7.30- 24.20]	2,77x10 ⁻¹⁷
6	32.565.355	rs28366363	A	G	0,4907	0,1185	13.29 [7.30- 24.20]	2,77x10 ⁻¹⁷
6	32.565.979	rs28383172	G	A	0,4907	0,1185	13.29 [7.30- 24.20]	2,77x10 ⁻¹⁷
6	32.568.127	rs28752491	C	G	0,4907	0,1185	13.29 [7.30- 24.20]	2,77x10 ⁻¹⁷
6	32.569.667	rs2647060	T	G	0,4907	0,1185	13.29 [7.30- 24.20]	2,77x10 ⁻¹⁷
6	32.570.439	rs2647063	C	G	0,4907	0,1185	13.29 [7.30- 24.20]	2,77x10 ⁻¹⁷
6	32.590.352	rs28383318	T	G	0,5000	0,1231	10.93 [6.27- 19.04]	2,77x10 ⁻¹⁷

Chr	Basenpaar- position	rs-ID	Allel 1	Allel 2	Fall-MAF	Kontroll- MAF	OR [KI]	P-Wert
6	32.558.962	rs184006295	T	C	0,4722	0,1152	12.60 [6.98- 22.72]	3,84x10 ⁻¹⁷
6	32.586.246	rs28383274	G	A	0,4907	0,1214	10.96 [6.28- 19.14]	3,86x10 ⁻¹⁷
6	32.587.281	rs28383315	G	A	0,5000	0,1244	10.86 [6.23- 18.94]	4,26x10 ⁻¹⁷
6	32.556.499	rs28724207	A	G	0,4722	0,1173	11.97 [6.70- 21.41]	5,60x10 ⁻¹⁷
6	32.583.026	rs13204933	G	A	0,5741	0,1524	5.34 [3.61- 7.91]	6,17x10 ⁻¹⁷
6	32.560.262	rs28366280	G	A	0,5463	0,1621	8.12 [4.96- 13.28]	7,28x10 ⁻¹⁷

Tabelle 7: Hoch signifikant mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis assoziierte SNPs auf Chromosom 6
In der chromosomalen Region auf Chromosom 6 um rs2858870 befanden sich 26 weitere SNPs, die signifikant mit der Anti-Lgi1 Enzephalitis (P-Wert < 1x10⁻¹⁶) assoziiert waren. In dieser Region bestand ein ausgeprägtes Linkage Disequilibrium zwischen den einzelnen Markern.

Chr=Chromosom

rs-ID=Reference SNP Identifikationsnummer

MAF=Minor Allele Frequency

OR=Odds Ratio

KI=Konfidenzintervall 95%

Abbildung 11

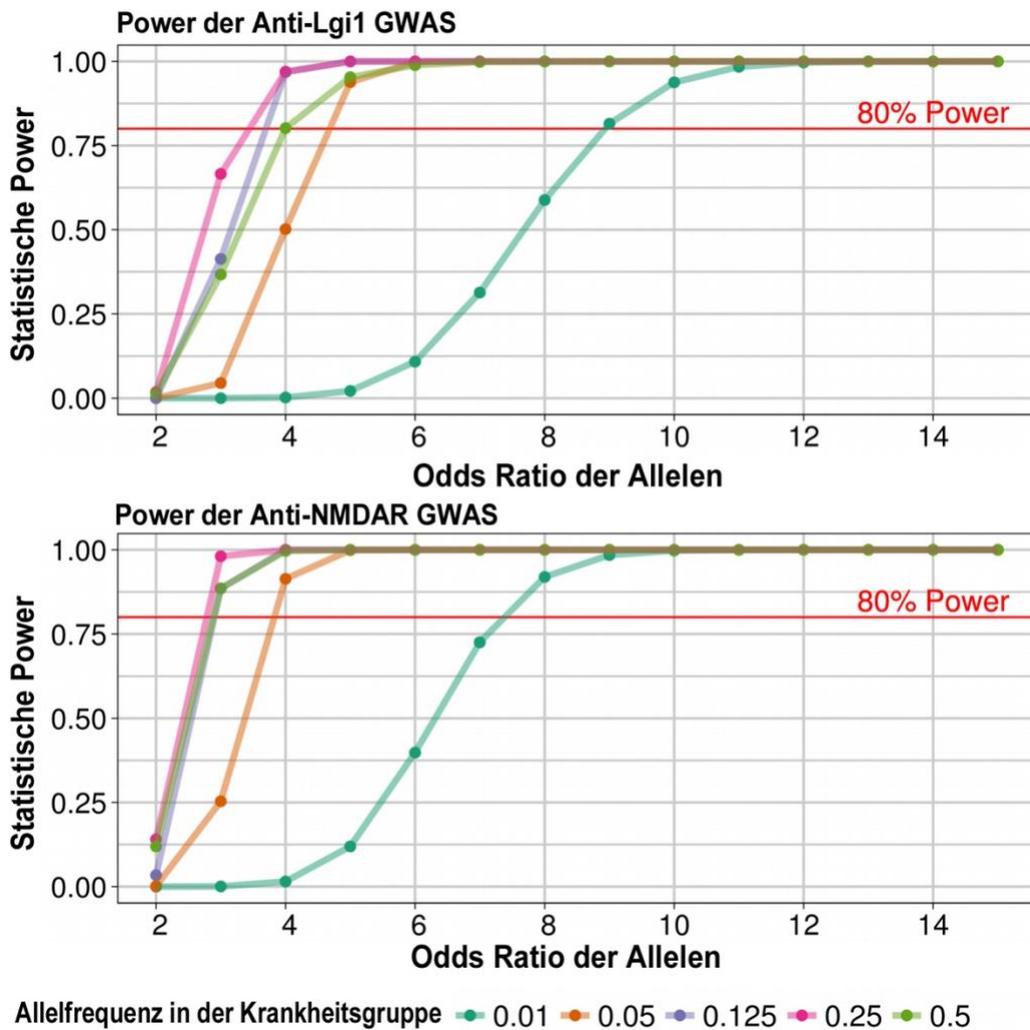


Abbildung 11: Berechnung der Power (statistische Trennschärfe)
Erwartete statistische Power für die Feststellung tatsächlicher genetischer Assoziationen bei verschiedenen Werten der Odds Ratio (2-15) und bei verschiedenen Allelfrequenzen (0,01-0,5). Die obere Abbildung zeigt die Berechnungen für die Anti-Lgi1 Enzephalitisgruppe, die untere Abbildung für die Anti-NMDAR Enzephalitisgruppe.

Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten, keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Kiel, 31.07.2019

Anna Katharina Färber

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Frank Leypoldt bedanken, dass ich an dieser spannenden wissenschaftlichen Fragestellung arbeiten durfte und er mich stetig unterstützt hat. Seine Begeisterung für die Wissenschaft in Zusammentreffen mit klinischem Alltag war ansteckend und inspirierend.

Besonderen Dank möchte ich an Frau Dr. Stefanie Müller aus der Arbeitsgruppe Neurogenetik der Klinik für Neurologie richten. Ohne sie wären die bioinformatische Auswertung und die Publikation in *Annals of Neurology* nicht zustande gekommen.

Weiterhin bedanke ich mich auch bei Herrn Prof. Kuhlenbäumer als Leiter der Arbeitsgruppe Neurogenetik für seine Unterstützung.

Herrn Prof. Franke und Frau Dr. May vom Institut für Molekularbiologie Kiel ermöglichten die Umsetzung der Genotypisierung in ihren Laboren, dafür gilt ihnen mein Dank.

Weiterhin bin ich dankbar für die Zusammenarbeit innerhalb des GENERATE-Netzwerkes: Ich bedanke mich bei den Patienten, die ihre Daten für dieses Projekt zur Verfügung gestellt haben. Ich bedanke mich bei den vielen Mitgliedern, Ärzten und Ärztinnen des GENERATE-Netzwerkes für ihren Beitrag zu meiner Arbeit. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Wandering aus Lübeck, der an der Konzeptionierung dieses Projektes maßgeblichen Anteil hatte.

Mein Dank gilt außerdem dem Institut für Epidemiologie Kiel für die Möglichkeit der Nutzung der Daten aus der PopGen-Datenbank.

Bedanken möchte ich mich auch bei Martina Jansen, die mir im Labor geduldig und mit praktischen Hinweisen zur Seite stand sowie bei unserer gesamten Arbeitsgruppe Neuroimmunologie im Institut für klinische Chemie.

Ich danke meinem Mann Ulrich für seinen geduldigen Zuspruch und jede Ermutigung bis zur letzten Zeile. Besondere Dankbarkeit gilt abschließend meinen Eltern für ihre Liebe und uneingeschränkte Unterstützung.