

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

**PRÄVALENZ JUXTAPARANODALER AUTOANTIKÖRPER
BEI IMMUNNEUROPATHIEN**

Inauguraldissertation
Zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
HANNAH HÜLST
aus Neumünster

Kiel, 2019

1. Berichterstatter: PD Dr. Frank Leypoldt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Petra Bacher

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel den 02.03.2021

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Brandt

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Polyneuropathien	1
1.2 Immunvermittelte Neuropathien	2
1.2.1 Pathophysiologie bei Immunneuropathien	4
1.2.2 Zelluläre Pathomechanismen	4
1.2.3 Humorale Pathomechanismen	5
1.2.4 „Molekulares Mimikry“ in der Pathogenese des Guillain-Barré-Syndrom	6
1.2.5 Autoantikörper bei Immunneuropathien	6
1.2.6 Autoantikörper gegen die juxtaparanodale, paranodale und nodale Zone des Axons von peripheren Nerven	7
1.3 Zielsetzung der Doktorarbeit und Fragestellung	10
2 Methodik und Materialien	12
2.1 Studiendesign	12
2.2 Klinische Datenerhebung	13
2.3 Patientenkollektiv	16
2.4 Sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen	18
2.4.1 Präparation/Fixation der Rattenhirne	19
2.4.2 Immunologische Färbung der Rattenschnitte	19
2.5 Indirekte Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen	21
2.5.1 Beschichtung der Petrischalen mit Poly-D-Lysin (PDL)	21
2.5.2 Zellaussaat der HEK 293 T-Zellen:	22
2.5.3 Transfektion der HEK 293 T-Zellen:	22
2.5.4 Immunfluoreszenz am Beispiel von Neurofascin-155	22
2.6 Indirekte Immunfluoreszenz auf nicht permeabilisierten, embryonalen Primärkulturneuronen	23
2.6.1 Immunfluoreszensfärbung hippocampaler, primärer Neurone	23
2.7 Materialien	24

2.8 Statistik.....	25
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Vergleich der Kohorten	26
3.2 Prävalenz neuronaler/glialer Autoantikörper	29
3.2.1 Insgesamt identifizierte neuronale/gliale Antikörper im Liquor und Serum	29
3.2.2 Prävalenz neuronaler/glialer Autoantikörper in den verschiedenen Krankheitsgruppen	32
3.2.3 Klinischer Vergleich zwischen Patienten mit oder ohne neuronale/gliale Autoantikörper	33
3.2.4 Analyse der klinischen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne neuronale/gliale Autoantikörper und einer klinischen CIDP	39
3.2.5 Analyse der klinischen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne neuronale/gliale Autoantikörper und einem klinischen GBS oder MFS	44
3.2.6 Analyse der klinischen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne neuronale/gliale Autoantikörper und einer vermuteten inflammatorischen oder nicht-inflammatorischen Neuropathie	48
3.3 Analyse der neuronalen/glialen Autoantikörper auf die Reaktivität mit bekannten juxtanaranodalen Antigenen	52
3.4 Beschreibung der beiden Patienten mit Antikörpern gegen NF-155 und HNK-1	53
3.5 Weitere Teilcharakterisierung der neuronalen/glialen Autoantikörper mit unbekanntem Zielantigen	55
4 Diskussion	56
4.1 Neuronale/gliale Autoantikörpern bei Immunneuropathien.....	56
4.2 Bekannte Antigene	57
4.3 Klinische Korrelation.....	59
4.4 Limitationen der Arbeit.....	60
4.5 Ausblick.....	61
5 Zusammenfassung	63
6 Literaturverzeichnis.....	65
7 Danksagung	69
8 Eidesstattliche Erklärung	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Mögliche Verteilungsmuster von Polyneuropathien.....	2
Abbildung 1.2, Einteilung der Immunneuropathien;	4
Abbildung 1.3: Aufbau Neuron, modifiziert nach (Rasband und Peles, 2015)	8
Abbildung 1.4: Molekulare Struktur des Ranvierschen Schnürrings im peripheren und zentralen Nervensystem; modifiziert aus (Stathopoulos et al., 2015)	9
Abbildung 2.1:Diagnostischer Ablauf modifiziert nach (Wandinger et al., 2018).....	13
Abbildung 2.2: Sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen – Darstellung der Antikörperreakтивität	21
Abbildung 2.3: Indirekte Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen - Beispiel Neurofascin-155	23
Abbildung 3.1: Antikörperverteilung der Liquorproben	29
Abbildung 3.2: Antikörperverteilung der Serumproben.....	30
Abbildung 3.3: Beispielbefunde von Patienten mit nachweisbaren neuronalen Antikörpern im Serum und Liquor. Sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen	31
Abbildung 3.4: Prävalenz von hippocampalen Antikörpern bei Patienten nach klinischen Gruppen sortiert.....	33
Abbildung 3.5: Krankheitsverlauf der Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor	35
Abbildung 3.6: Klinische Symptomatik der Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung	35
Abbildung 3.7: Therapieansprechen aller Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor.....	36
Abbildung 3.8: Krankheitsverlauf der Patienten mit und ohne Antikörper im Serum.....	38
Abbildung 3.9: Klinische Symptomatik der Patienten mit und ohne Antikörper im Serum bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung.....	38
Abbildung 3.10: Krankheitsverlauf der CIDP-Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor.....	41
Abbildung 3.11: Symptomatik der CIDP-Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung	41
Abbildung 3.12: Therapieansprechen der CIDP-Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor.....	42
Abbildung 3.13: Symptomatik der Patienten mit akuten Immunneuropathien mit und ohne Antikörper im Liquor bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung	46

Abbildung 3.14: Krankheitsverlauf der Patienten mit akuten Immunneuropathien mit und ohne Antikörper im Liquor	46
Abbildung 3.15: Symptomatik der Patienten mit anderen inflammatorischen Polyneuropathien mit und ohne Antikörper im Liquor bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung	49
Abbildung 3.16: Krankheitsverlauf der Patienten mit anderen inflammatorischen PNP mit und ohne Antikörper im Liquor	50
Abbildung 3.17: Verteilung der hippocampalen Antikörper im Liquor und im Serum	52
Abbildung 3.18: Vergleich aller Patienten mit hippocampalen Antikörpern im Liquor und Serum.	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: INCAT Behinderungsgrad übersetzt aus (Hughes et al., 2001)	16
Tabelle 2: mRS (modifizierte Ranking Skala) aus (Mattle et al., 2013) nach (van Swieten et al., 1988)	16
Tabelle 3: EFNS-Kriterien (European Federation of Neurological Science) für die CIDP, ...	18
Tabelle 4: Kohorten mit Anzahl Liquor- und Serumproben;	26
Tabelle 5: Vergleich der unterschiedlichen Kohorten.....	28
Tabelle 6: Vergleich der Antikörper positiven und Antikörper negativen Patienten im Liquor.....	37
Tabelle 7: Vergleich der Antikörper positiven und negativen Patienten im Serum.....	39
Tabelle 8: Vergleich der AK- positiven und negativen Patienten mit CIDP (definitiv&wahrscheinlich) im Liquor	43
Tabelle 9: Vergleich der AK-positiven und negativen Patienten mit definitiver CIDP im Liquor.....	44
Tabelle 10: Vergleich der AK- positiven und negativen Patienten mit akuten Immunneuropathien im Liquor.....	47
Tabelle 11: Vergleich der Ak-positiven mit negativen Patienten mit AIDP im Liquor	51
Tabelle 12: Beschreibung der beiden Patienten mit bekannten Zielantigenen	54

Abkürzungsverzeichnis

AIDP:	Akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
AIP:	Andere inflammatorische Polyneuropathie
ANIP:	Andere nicht inflammatorische Polyneuropathie
AK:	Antikörper
AMAN:	Akute motorische axonale Polyneuropathie
AMSAN:	Akute motorische und sensible axonale Neuropathie
BSA:	Bovines Serumalbumin
C.jejuni:	Campylobacter jejuni
CASPR1:	Contactin assoziiertes Protein-1
CIDP:	Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
DAB:	Diaminobenzidin
DADS:	Distal erworbene demyelinisierende symmetrische Neuropathie
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EFNS:	European Federation of Neurological Science
FCS:	Fötales Kälber Serum (Eng: Fetal Calf Serum)
HNK-1:	Human natural killer-1
INCAT	Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment
IS:	Immunsuppressiva
MADSAM:	Multifokal erworbene demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie
MAG:	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MFS:	Miller-Fisher-Syndrom
MMN:	Multifokal motorische Neuropathie
mRS:	Modifizierte Ranking-Skala
MW:	Mittelwert
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
NrCam:	Neuronal cell adhesion molecule
PBS:	Phosphate buffered saline
PDL:	Poly-D-lysin
Pen-Strep:	Penicillin-Streptomycin
PPH:	Plasmapherese
PFA:	Paraformaldehyd
PNP:	Polyneuropathie

1 Einleitung

1.1 Polyneuropathien

Bei einer Polyneuropathie (PNP) handelt es sich um eine Erkrankung des peripheren Nervensystems, die motorische, sensible, sowie autonome Nerven betreffen kann. Die weltweite Prävalenz wird auf 30-80/100 000 Einwohner geschätzt (Masuhr et al., 2013). Es gibt über 200 verschiedene Ursachen für eine PNP. Sie können metabolisch (z.B. Diabetes mellitus, Urämie), entzündlich autoimmun (akut oder chronisch), hereditär, ernährungsbedingt (z.B. Vitaminmangel), exogen toxisch (z.B. Alkohol, Medikamente) oder immunvermittelt (z.B. Kollagenosen, paraneoplastisch) sein. Die häufigsten Formen stellen dabei die PNP bei Diabetes mellitus mit ca. 35 % und bei Alkoholkrankheit mit ca. 11 % der Fälle dar. Bei ca. 22 % bleibt die Ursache ungeklärt (Zifko, 2017). Die klinischen Manifestationen können vielfältig sein. Es kann zu sensiblen Ausfällen und Reizerscheinungen kommen (bspw. Parästhesien, Dysästhesien), motorischen Ausfällen (Paresen, Muskelatrophien, Faszikulationen), neuropathischen Schmerzen, Abschwächung oder Fehlen von Reflexen, sowie trophischen und autonomen Störungen. Außerdem kann eine Beteiligung der Hirnnerven vorliegen. Das Verteilungsmuster variiert zwischen symmetrisch und asymmetrisch, proximal und distal, sowie fokal und multifokal. Den häufigsten Lokalisationstyp stellt der distal-symmetrische Typ dar. Die Patienten entwickeln distal betonte strumpfförmige und im Verlauf auch handschuhförmige Sensibilitätsstörungen, die mit Paresen einhergehen können. Zu den asymmetrischen Formen zählen unter anderem Mononeuropathien mit Ausfällen im Versorgungsgebiet eines peripheren Nerven, oder die Mononeuropathia multiplex, bei der es zu einem Befall mehrerer einzelner Nerven kommt (siehe Abbildung 1.1) (Masuhr et al., 2013). Nach der Entwicklung der Symptome werden akute (unter 4 Wochen), subakute (4-8 Wochen) und chronische (über 8 Wochen) Krankheitsverläufe unterschieden (Hacke, 2016).

Mithilfe von laborchemischen- (Blut und Liquor), genetischen-, und bildgebenden Untersuchungen, sowie der Biopsie von Nerven- und Muskelgewebe, kann eine Zuordnung zu der möglichen Ätiologie erfolgen. Außerdem ist anhand von elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden (Elektroneurographie, Elektromyographie) eine Aussage über die Art der Schädigung möglich. Sie kann das Axon der Nerven, die Myelinscheide oder beide Strukturen betreffen, wobei im fortgeschrittenen Krankheitsstadium häufig eine gemischt axonal-demyelinisierende Beteiligung vorliegt (Hacke, 2016).

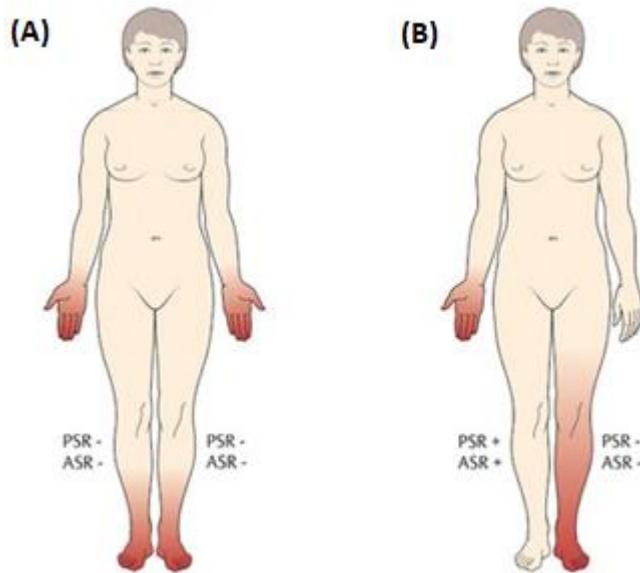


Abbildung 1.1: Mögliche Verteilungsmuster von Polyneuropathien

Modifiziert nach (Masuhr et al., 2013)

(A): distal-symmetrischer Typ: häufigster Typ mit distal-symmetrischen Verteilungsmuster

(B): Mononeuropathie multiplex: Ausfälle mehrerer einzelner Nerven

Dunkelrot: betroffene Areale; hell: nicht betroffene Areale

PSR: Patellasehnenreflex; ASR: Achillessehnenreflex; (+): normal; (-): abgeschwächt

1.2 Immunvermittelte Neuropathien

Immunneuropathien stellen eine heterogene Gruppe von autoimmun-entzündlichen Erkrankungen der peripheren Nerven und Nervenwurzeln dar. Es werden akute von chronischen Verlaufsformen unterschieden (Abbildung 1.2). Je nach Manifestations- und Verteilungsmuster können diese weiter in Subgruppen unterteilt werden. Beispielsweise gibt es Untergruppen mit einer rein motorischen oder sensorischen Beteiligung, sowie einem vorwiegend axonalen oder demyelinisierenden Befall.

Zu den akuten Formen zählt das Guillain-Barré-Syndrom mit seinen Untergruppen. Dabei wird zwischen der akuten inflammatorischen demyelinisierenden PNP (AIDP), der akuten motorischen axonalen Neuropathie (AMAN), der akuten motorischen und sensiblen axonalen Neuropathie (AMSAN), der akuten Pandysautonomie und dem Miller-Fisher-Syndrom (MFS) differenziert. Die häufigste Form ist die AIDP (auch klassisches Guillain-Barré-Syndrom). Die Inzidenz liegt zwischen 0,5 und 2/100 000 Einwohner (Mattle et al., 2013) und die Nervenschädigung weist einen demyelinisierenden Charakter auf. Andere Varianten, bei denen die axonale Degeneration im Vordergrund steht, sind die AMAN und AMSAN (Yan et al., 2000). Die akute Pandysautonomie äußert sich durch eine Störung des autonomen Nervensystems. Es wird angenommen, dass sympathische Ganglienneurone in den Pathomechanismus involviert sind (Dalakas, 2015). Einen weiteren Subtyp stellt das Miller-Fisher-Syndrom dar, welches durch eine Ophthalmoplegie mit Ataxie und Areflexie gekennzeichnet ist (Mattle et al., 2013). Beim klassischen Guillain-Barré-Syndrom entwickeln sich typischerweise innerhalb weniger Tage

symmetrische Paresen, beginnend in den Beinen, die sich von distal nach proximal ausbreiten und in einer Tetraplegie enden können (aszendierende Landry-Paralyse). Sensible Störungen stehen gegenüber den motorischen eher im Hintergrund (Mattle et al., 2013). Häufig geht den Lähmungen ein Infekt der oberen Atemwege oder des Gastrointestinaltraktes voraus (Hacke, 2016) (siehe Absatz 1.2.4). Bei 25 % der Patienten befallen die Paresen im Verlauf die Atemmuskulatur und das Zwerchfell und führen zu einer Atemlähmung mit Beatmungspflichtigkeit (Yuki und Hartung, 2012). Eine Beteiligung der Hirnnerven und des autonomen Nervensystems mit lebensbedrohlichen Folgen sind möglich (Hacke, 2016). Da bisher keine diagnostischen Biomarker zur Verfügung stehen, handelt es sich vor allem um eine klinische Diagnosestellung. (Willison et al., 2016). Sie kann mit Hilfe von elektrophysiologischen Untersuchungen und einer Lumbalpunktion unterstützt werden, wobei im Liquor häufig eine zytoalbuminäre Dissoziation zu finden ist (Masuhr et al., 2013). Therapeutisch wirksam sind Immunglobuline (Hughes et al., 2014) oder Plasmapherese (Chevret et al., 2017), die beide gleichermaßen in der Behandlung eingesetzt werden können (Sommer C. et al., 2018). Kortikosteroide führen zu keiner langfristigen Besserung und können sogar die Rehabilitation verzögern (Hughes et al., 2016). Insgesamt ist die Prognose gut. Bei etwa 70 % bilden sich die Symptome klassischerweise in umgekehrter Reihenfolge ihres Auftretens wieder vollständig zurück (Masuhr et al., 2013).

Kommt es zu einer Entwicklung der Symptome über einen Zeitraum von mehr als 8 Wochen, handelt es sich um eine chronische Immunneuropathie (Hacke, 2016). Dazu zählen u.a. die chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP), die multifokale motorische Neuropathie (MMN), die multifokale erworbene demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie (MADSAM) und die distale erworbene demyelinisierende symmetrische Neuropathie (DADS) (Mattle et al., 2013). Die CIDP ist mit einer Prävalenz von 9/100 000 die häufigste chronische Autoimmunneuropathie (Dalakas, 2013). Vorausgegangene Infektionen spielen hier eine untergeordnete Rolle. Es kommt zu einer multifokalen Demyelinisierung, die die Spinalnerven, Plexi und proximalen Nervenstämme befällt und je nach Befall ein variables klinisches Bild präsentieren kann (Dalakas, 2013). Klassisch ist jedoch eine vorwiegend symmetrische sensormotorische Manifestation mit distalen sensiblen Störungen und proximalen und distalen Paresen (Mattle et al., 2013). Der Verlauf kann chronisch progradient, schubförmig, aber auch chronisch remittierend sein (Peltier und Donofrio, 2012). Die Diagnosestellung ergibt sich anhand der klinischen Präsentation und elektrophysiologischen Kriterien (Van den Bergh et al., 2010) (siehe Tabelle 3:EFNS-Kriterien) und kann durch Zusatzuntersuchungen (Liquor, MRT, Nervenbiopsie) unterstützt werden (Mathey et al., 2015). Typisch ist auch hier eine Eiweißverhöhung im Liquor bei weitgehend normaler Zellzahl und findet sich bei etwa 90 %

der Patienten (Peltier und Donofrio, 2012). Therapeutisch kommen wie beim Guillain-Barré-Syndrom Immunglobuline und Plasmapherese zum Einsatz, allerdings zeigen die Patienten auch ein Ansprechen auf Kortikosteroide (Sommer C. et al., 2018).

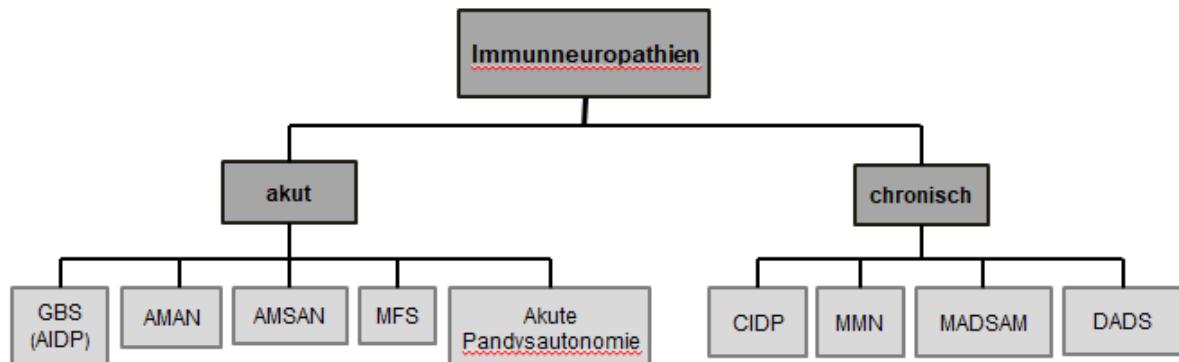


Abbildung 1.2, Einteilung der Immunneuropathien;

GBS=Guillain-Barré-Syndrom, AIDP=akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, AMAN=akute motorische axonale Neuropathie, AMSAN=akute motorische und sensible axonale Neuropathie, MFS=Miller-Fisher-Syndrom, CIDP=chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, MMN=multifokale motorische Neuropathie, MADSAM=multifokale erworbene demyelinisierende sensible und motorische Neuropathie, DADS=distale erworbene demyelinisierende symmetrische Neuropathie

1.2.1 Pathophysiologie bei Immunneuropathien

Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen kommt es bei den Immunneuropathien zu einer fehlerhaften Immunantwort gegen körpereigene Moleküle oder Gewebe. Betroffene Strukturen sind vor allem die Myelinscheiden, Axone und Bestandteile des Ranvierschen Schnürrings von peripheren Nerven, sowie Ganglienneurone (Dalakas, 2015). Der genaue Pathomechanismus und die auslösenden Faktoren, die zu solchen Neuropathien führen, sind derzeit noch nicht vollständig für alle Subgruppen geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass es sich dabei um einen autoimmunen Prozess handelt, da die Patienten zum Teil gut auf Immuntherapien ansprechen, T-Zell-Infiltrate in peripheren Nerven zu finden sind, und bereits einige Antikörper identifiziert werden konnten (Dalakas, 2015). In der Pathogenese spielen sowohl zelluläre, als auch humorale Mechanismen, die durch autoreaktive T-Zellen, Makrophagen und Antikörper vermittelt werden, eine Rolle (Dalakas, 2015; Mathey et al., 2015). Für das Guillain-Barré-Syndrom, vor allem für die AMAN, wird das sogenannte „molekulare Mimikry“ als möglicher Auslösefaktor vermutet. (siehe Abschnitt 1.2.4).

1.2.2 Zelluläre Pathomechanismen

Die zellulären Komponenten des Pathomechanismus zeigen sich unter anderem durch das Vorhandensein von entzündlichen Infiltraten in Nervenbiopsien von GBS- und CIDP-Patienten (Schmidt et al., 1996). Die typischen pathologischen Befunde des Guillain-Barré-Syndroms sind gekennzeichnet durch perivaskuläre und endoneurale inflammatorische Infiltrate in den Nerven, Nervenwurzeln und Nervenplexi, sowie

segmentaler Demyelinisierung und häufiger sekundärer axonaler Degeneration. Bei den immunologischen Zellen handelt es sich hauptsächlich um T-Zellen und Makrophagen (Dalakas, 2015; Yuki und Hartung, 2012). Die Makrophagen sind in der Lage die Basalmembran der Schwann Zellen zu durchbrechen und die Myelinschicht zu zerstören. Die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch aktivierte T-Zellen führt zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität und der weiteren Transmigration von Makrophagen (Dalakas, 2015). In Tiermodellen zu der experimentellen allergischen Neuritis konnten diese T-Zell-vermittelten Prozesse nachgewiesen werden. Es wurde beobachtet, dass Tiere, die mit peripheren Nervenproteinen immunisiert wurden, eine allergische Neuritis mit segmentaler Demyelinisierung und Infiltration durch Makrophagen und T-Zellen entwickelten, welche dem Guillain-Barré-Syndrom sehr ähnlich ist. Die T-Zellen werden gegen das Myelin sensibilisiert und können die Krankheit auf gesunde Tiere übertragen. (Dalakas, 2015).

Bei der CIDP gibt es kein typisches pathologisches Bild in der Nervenbiopsie. Die pathologischen Veränderungen umfassen Zeichen von segmentaler Demyelinisierung, Remyelinisierung, axonaler Degeneration, Nerven-Ödemen, „Onion-bulbs“-Formationen und Infiltrationen durch inflammatorische Zellen (Mathey et al., 2015; Peltier und Donofrio, 2012; Schafflick et al., 2017). Anders als beim Guillain-Barré-Syndrom finden sich bei der CIDP jedoch nur minimale Anzeichen von T-Zellinfiltraten (Dalakas, 2013). Sie sind im Vergleich zu Kontrollen nur bei der Minderheit der Patienten erhöht und keiner spezifischen Lokalisation zuzuordnen (Bosboom et al., 1999). Bei den wesentlich beteiligten inflammatorischen Zellen handelt es sich vor allem um Makrophagen, die vorwiegend in Clustern um endoneurale Gefäße angeordnet sind und zu einer Zerstörung der Myelinscheiden führen (Mathey et al., 2015; Sommer et al., 2005). Aktivierte T-Zellen können die Blut-Hirn-Schranke passieren und deren Permeabilität für normalerweise unzugängliche Moleküle, wie beispielsweise Antikörper, erhöhen (Mathey et al., 2015). Außerdem scheint eine Fehlregulierung der Immunregulation eine Rolle zu spielen, was sich in der reduzierten Anzahl und Funktionsstörung von regulatorischen T-Zellen bei CIDP-Patienten zeigt (Mathey et al., 2015).

1.2.3 Humorale Pathomechanismen

Für die humorale Beteiligung in der Pathogenese von Immunneuropathien spricht vor allem das gute Ansprechen auf Antikörper-fokussierte Therapien, wie der Plasmapherese oder intravenösen Immunglobulinen (Querol et al., 2013). In Nervenbiopsien konnten Ablagerungen von IgG und Komplementfaktoren gesehen werden (Querol et al., 2013) und die nur minimalen T-Zellinfiltrate bei CIDP-Patienten deuten auf einen nicht ausschließlich zellulären Prozess hin (siehe Abschnitt 1.2.2). Außerdem konnten in tierexperimentellen Untersuchungen die Bedeutung von antikörpervermittelten Mechanismen in der

Pathophysiologie gezeigt werden, beispielsweise durch die passive Übertragung von CIDP-Patientenserum mit Anti-Myelin-IgG auf Ratten-Ischiasnerven, die zu einer Demyelinisierung und Leitungsblöcken führten (Yan et al., 2000). Auch wurden in der Vergangenheit bereits einige Antikörper in Patientenserien nachgewiesen (siehe Abschnitt 1.2.5).

1.2.4 „Molekulares Mimikry“ in der Pathogenese des Guillain-Barré-Syndrom

In Subgruppen des Guillain-Barré-Syndroms könnte das sogenannte „molekulare Mimikry“ in der Pathogenese eine Rolle spielen. Bei 2/3 der GBS-Patienten tritt die Erkrankung typischerweise innerhalb von vier Wochen nach einem Atemwegs- oder Magendarminfekt auf und es wurden Fälle nach einer Impfung gegen Tollwut und Influenza Typ A berichtet (Willison et al., 2016). Durch eine molekulare Verwechslung zwischen den mikrobiellen Antigenen und den Nervenantigenen wird eine abnorme Immunreaktion ausgelöst, die sich gegen die peripheren Nerven oder Nervenwurzeln richtet (Dalakas, 2015; Willison et al., 2016). Es kommt zu einer Sensibilisierung von kreuzreagierenden T-Zellen, die wiederum Makrophagen rekrutieren und B-Zellen aktivieren, welche Antikörper gegen Myelinproteine produzieren (Dalakas, 2013). Als häufige Erreger sind *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* (*C.jejuni*), *Cytomegalievirus*, *Epstein-Barr-Virus*, *Herpes Virus*, *Hepatitis A und E*, *HIV* oder *Haemophilus influenzae* bekannt, wobei *C.jejuni* den wichtigsten Erreger darstellt. So wurden bei bis zu 30 % der Patienten mit AMAN und bei bis zu 20 % der Patienten mit Miller-Fisher-Syndrom hohe Titer von IgG oder IgM *C.jejuni* spezifischen Antikörpern beobachtet (Dalakas, 2015). Andersherum entwickeln jedoch die meisten Patienten (>99 %), die diesen spezifischen Erregern ausgesetzt sind, keine autoimmune Reaktion. (Willison et al., 2016). Die Art der vorausgegangen Infektion wirkt sich auf den klinischen Phänotyp, sowie auf die Prognose aus. Beispielsweise besteht eine Assoziation zwischen Patienten mit vorheriger *C.jejuni* Infektion und der Entwicklung der rein motorischen Form des GBS (AMAN), sowie Antikörpern gegen Ganglioside vom Subtyp GM1 oder GD1a (Willison et al., 2016) (siehe Absatz 1.2.5).

1.2.5 Autoantikörper bei Immunneuropathien

Bei einigen Immunneuropathien, wie beispielsweise bei bestimmten Varianten des Guillain-Barré-Syndroms oder der Anti-MAG-Neuropathie, konnten bereits spezifische Zielantigene identifiziert und die Autoantikörper charakterisiert werden (Dalakas, 2015). Beim Guillain-Barré-Syndrom wurde das Interesse vor allem auf Ganglioside gelegt, die wichtige Komponenten der peripheren Nerven darstellen und reichlich vorhanden sind (Dalakas, 2015; Yuki und Hartung, 2012). So ist schon länger bekannt, dass Antikörper gegen bestimmte Ganglioside (GM1, GD1a), die sich auf dem Axolem von peripheren Nerven befinden, in der Pathogenese der motorischen Form des Guillain-Barré-Syndroms

(AMAN) eine wichtige Rolle spielen und zur Degeneration des Axons führen können (Dalakas, 2015). Auch bei Patienten mit einer MMN konnten bei 50 % solche GM1-Antikörper detektiert werden, wobei deren pathogene Rolle bisher nicht belegt wurde (Van Asseldonk et al., 2005). Des Weiteren gibt es Assoziationen zwischen dem Miller-Fisher-Syndrom und Antikörpern gegen das GQ1b-Gangliosid. Dieses ist überproportional in motorischen Nerven von Augenmuskeln angereichert und IgG-Antikörper konnten bei 90 % der Patienten mit MFS nachgewiesen werden (Dalakas, 2015). Bei der Anti-MAG-Neuropathie handelt es sich um eine Erkrankung, die mit einer monoklonalen IgM-Gammopathie unbekannter Signifikanz assoziiert ist. Bei mehr als 50 % der Patienten mit einem IgM-Paraprotein können Anti-MAG Antikörper nachgewiesen werden (Mathey et al., 2015). Die Antikörper richten sich gegen das Myelin-assozierte Glykoprotein (MAG), welches sich im peripheren und zentralen Nervenmyelin befindet, oder gegen andere Glykoproteine und Glykolipide, die sich Antigendeterminanten mit MAG teilen (Dalakas, 2018).

Anders als bei den oben genannten Subgruppen der Immunneuropathien konnten bei den häufiger vorkommenden demyelinisierenden Formen wie der AIDP und der CIDP bisher keine spezifischen Antikörper als ursächliche Faktoren für die Pathogenese erfasst werden (Dalakas, 2015). In der Vergangenheit wurden auch hier Glykoproteine und Ganglioside im kompakten Myelin als ursächliche Faktoren in Betracht gezogen (Stathopoulos et al., 2015). Allerdings hat sich der Fokus in letzter Zeit vor allem auf das nicht kompakte Myelin mit Molekülen der juxtaparanodalen, paranodalen und nodalen Zone als Zielantigene gelegt (Mathey et al., 2015).

1.2.6 Autoantikörper gegen die juxtaparanodale, paranodale und nodale Zone des Axons von peripheren Nerven

Das myelinisierte Axon kann in verschiedene Domänen unterteilt werden: Die Internodien, die juxtaparanodale Zone, die paranodale Zone und die nodale Zone (Ranvierscher Schnürring) (siehe Abbildung 1.3) (Rasband und Peles, 2015). Die Myelinscheide wird im zentralen Nervensystem von den Oligodendrozyten und im peripheren Nervensystem von den Schwannzellen gebildet. Dies geschieht, indem sich die Gliazellen um einen Abschnitt des Axons herumlegen und in regelmäßigen Abständen bis zur nächsten Gliazelle schmale Lücken hinterlassen. Bei den myelinisierten Anteilen handelt es sich um die Internodien, die mit einer Länge von bis zu 1,5 mm den größten Anteil des Axons ausmachen (Rasband und Peles, 2015; Trepel, 2012). Die myelinfreien Unterbrechungen stellen die Ranvierschen Schnürringe dar. Durch eine hohe Dichte an spannungsgesteuerten Natriumkanälen wird die Regenerierung des Aktionspotenzials und die damit verbundene schnelle saltatorische Erregungsweiterleitung ermöglicht. Am Ende der Internodien befindet sich die Juxtaparanodalzone. An sie grenzt die Paranodalzone, an denen die Myelinscheide mit

ihren zytoplasmatischen Schleifen endet (Rasband und Peles, 2015).

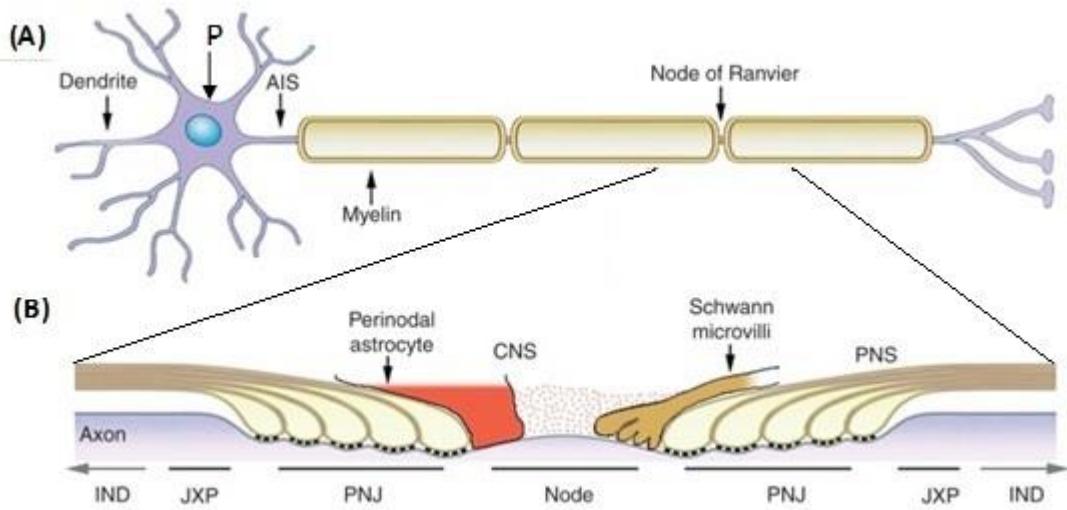


Abbildung 1.3: Aufbau Neuron, modifiziert nach (Rasband und Peles, 2015)

AIS=Initialsegment; P=Perikaryon; Node of Ranvier=Ranvierscher Schnürring; CNS=zentrales Nervensystem; PNS=peripheres Nervensystem; IND=Internodium; JXP=juxtagaranodale Zone; PNJ=paranodale Zone; Node=nodale Zone

(A): Neuron bestehend aus Zellkörper (Perikaryon), myelinisiertes Axon und Dendriten. Das Axon besteht aus den Internodien und den myelinfreien Ranvierschen Schnürringen

(B): myelinisiertes Axon im PNS und ZNS; unterteilt in Internodien, juxtagaranodale Zone, paranodale Zone und Ranvierschen Schnürring. Im PNS hat das Axolem Kontakt mit Mikrovilli von Schwann-Zellen, im ZNS durch perinodale Astrozyten- und Oligodendrozytenvorläuferzellen

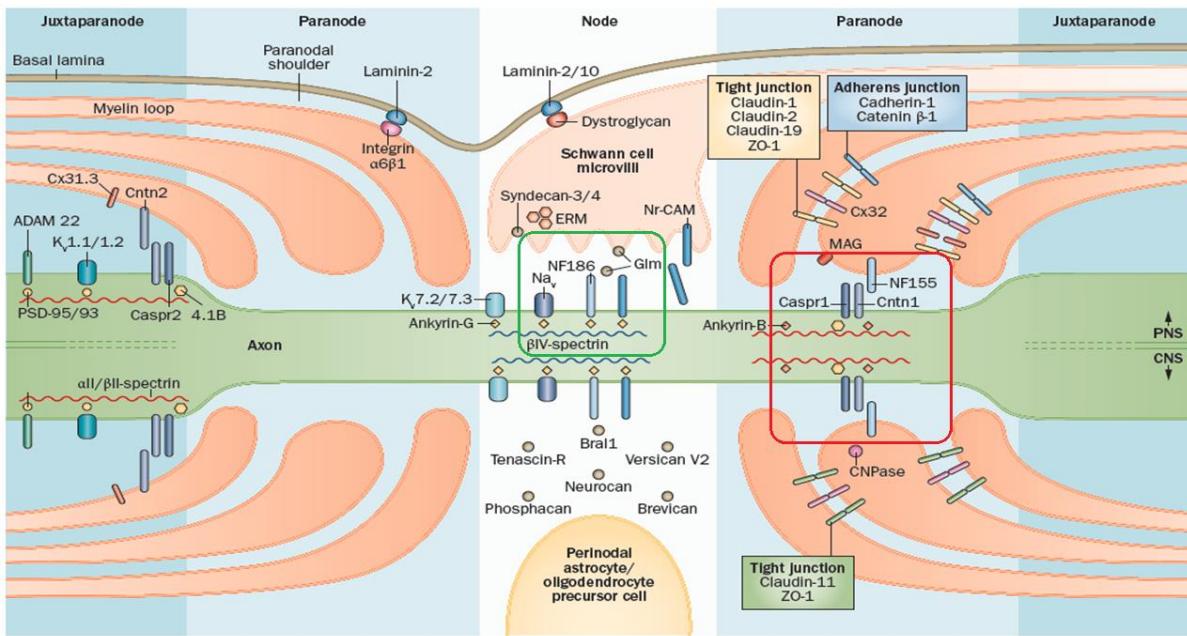


Abbildung 1.4: Molekulare Struktur des Ranvierschen Schnürrings im peripheren und zentralen Nervensystem; modifiziert aus (Stathopoulos et al., 2015)

Je nach Kompartiment bilden verschiedene Zelladhäsionsmoleküle Komplexe mit anderen Adhäsionsmolekülen, Ionenkanälen oder dem Zytoskelett. Zwischen dem peripheren- und zentralen Nervensystem gibt es keine wesentlichen Unterschiede im Hinblick auf die Moleküle und Verbindungen. Der rot und der grün umrandete Bereich stellen Antikörper dar, die bereits identifiziert werden konnten;

Rot: NF155=Neurofascin-155, CNTN1=Contactin-1, CASPR1=Contactin-assoziiertes-Protein-1;

Grün: NF186=Neurofascin-186, Gli=Glomedin

Juxtaparanode=juxtaparanodale Zone; Paranode=paranodale Zone; Node=nodale Zone (Ranvierscher Schnürring); PNS=peripheres Nervensystem; CNS=zentrales Nervensystem

Abbildung 1.4 zeigt die molekulare Struktur des Ranvierschen Schnürrings und der angrenzenden Kompartimente im peripheren- und zentralen Nervensystem. Die Myelin- und Axonmembran werden, je nach Domäne, durch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle miteinander verbunden. Die axoglialen Verbindungen sind für die Bildung und Funktionen dieser Regionen entscheidend und spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der saltatorischen Erregungsweiterleitung (Koike et al., 2017; Mathey et al., 2015).

Es wird angenommen, dass Adhäsionsmoleküle der nodalen, paranodalen und juxtaparanodalen Region Zielantigene in bestimmten Subgruppen von Immunneuropathien, wie der CIDP, AIDP und MMN, darstellen können und Antikörper für die Demyelinisierung verantwortlich sind (Dalakas, 2013; Stathopoulos et al., 2015). Die schnelle klinische und elektrophysiologische Verbesserung der Patienten nach Plasmapherese und Immunglobulinen, sowie die bestehenden reversiblen Nervenleitungsstörungen (Leitungsblöcke) können am besten durch Strukturveränderungen dieser Regionen erklärt werden. Es ist unwahrscheinlich, dass diese Effekte der schnellen Rehabilitation aus Remyelinisierungsprozessen resultieren, sondern es scheint sich vielmehr um eine humorale Blockade von Molekülen zu handeln, die mit der saltatorischen Erregungsleitung assoziiert sind (Dalakas, 2015; Stathopoulos et al., 2015). In Nervenbiopsien von

CIDP-Patienten konnten unter anderem multiple Veränderungen der paranodalen und nodalen Strukturen von Schwannzellen gesehen (Cifuentes-Diaz et al., 2011) und charakteristische Befunde erhoben werden, die eine reduzierte myelinisierte Faserdichte, sowie das Ausbleiben einer Makrophagen-vermittelten Demyelinisierung und „Onion bulbs“ bei CIDP-Patienten mit Neurofascin-155 und Contactin-1 Antikörpern zeigten (Koike et al., 2017).

In der Tat konnten bereits einzelne Antikörper gegen diese Bestandteile in Subgruppen von Immunneuropathien nachgewiesen werden, beispielsweise gegen Contactin-1, Neurofascin, Gliomedin und Contactin-assoziiertes-Protein-1 (CASPR-1). Bei Neurofascin-186 und Gliomedin handelt es sich um Moleküle, die in der **nodalen** Region des Axons exprimiert werden. Neurofascin-186 ist für die Verankerung und damit die Position und Funktion von spannungsgesteuerten Natriumkanälen im Ranvierschen-Knoten und im Initialsegment des Nerven zuständig (Querol und Illa, 2015). Es interagiert im peripheren Nervensystem mit löslichem Gliomedin und dem neuronalem Zelladhäsionsmolekül (NrCam) (Vural et al., 2018). Bei Patienten mit CIDP, GBS und MMN wurden Antikörper gegen Gliomedin (Devaux et al., 2012; Notturno et al., 2014) und Neurofascin-186 (Delmont et al., 2017; Ng et al., 2012; Notturno et al., 2014) beschrieben, allerdings konnte die Reaktion auf diese Antigene in anderen Studien nicht gezeigt werden (Doppler et al., 2015a; Mathey et al., 2017; Querol et al., 2014).

Contactin-1, Neurofascin-155 und CASPR-1 sind Zelladhäsionsmoleküle der **paranodalen** Zone. Neurofascin-155, das auf der glialen Seite exprimiert wird, interagiert mit dem Komplex aus CNTN-1 und CASPR-1 auf der axonalen Seite und ist für die Struktur und Funktion dieser Region wichtig (Querol und Illa, 2015). In mehreren Studien wurde das Vorhandensein von Antikörpern gegen Neurofascin-155 (Burnor et al., 2018; Devaux et al., 2016; Mathey et al., 2017; Ng et al., 2012; Ogata et al., 2015; Querol et al., 2014; Yan et al., 2014), sowie Contactin-1 (Delmont et al., 2017; Doppler et al., 2015b; Koike et al., 2017; Mathey et al., 2017; Miura et al., 2015; Querol et al., 2013) und CASPR-1 (Querol et al., 2013) bei Patienten mit Immunneuropathien untersucht und beschrieben. Die Häufigkeit von Neurofascin-155 Antikörpern variiert dabei zwischen 4 (Querol et al., 2014) und 18 % (Ogata et al., 2015) bei Patienten mit einer CIDP und zwischen 2 (Ng et al., 2012) und 7 % (Burnor et al., 2018) bei GBS--Patienten. Antikörper gegen Contactin-1 finden sich nach aktuellen Forschungsergebnissen bei unter 1 (Delmont et al., 2017; Koike et al., 2017) bis 8 % (Doppler et al., 2015b) der CIDP-Patienten.

1.3 Zielsetzung der Doktorarbeit und Fragestellung

In letzter Zeit wurde der Fokus der Pathogenese in einigen Gruppen der Immunneuropathien, wie der CIDP, vor allem auf Zelladhäsionsmoleküle als Zielantigene in den nodalen, paranodalen und juxtaparanodalen Regionen von peripheren Nerven gelegt.

Es konnten bereits einige Antikörper identifiziert werden, allerdings bleibt unklar wie häufig solche bekannten- und weitere Antikörper gegen bislang unbekannte Antigene in Subgruppen von Immunneuropathien vorkommen. Eine besondere Schwierigkeit bei der Identifizierung bereitet die Tatsache, dass keine „Screeningtests“ für solche Autoantikörper existieren.

Ein weiteres Problem ist, dass CIDP-Patienten ein sehr heterogenes Bild in Bezug auf das Therapieansprechen zeigen und die Diagnosestellung vor allem auf einer klinischen Einschätzung beruht. Es werden Biomarker benötigt, die a) dabei helfen spezifische Subgruppen zu definieren, b) dabei helfen das Ansprechen auf Therapeutika besser vorherzusagen, und c) als prognostische Marker dienen können.

Fragestellungen:

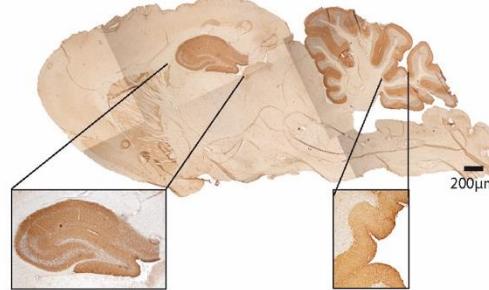
- 1) Wie häufig sind bekannte und unbekannte paranodale und juxtaparanodale Autoantikörper bei Immunneuropathien in einer retrospektiven Pilotkohorte?
- 2) Korreliert der Nachweis von juxtaparanodalen/paranodalen Autoantikörpern mit klinischen Parametern/Kovarianten?
- 3) Sprechen Patienten mit Antikörpern besser oder schlechter auf eine Therapie an?

2 Methodik und Materialien

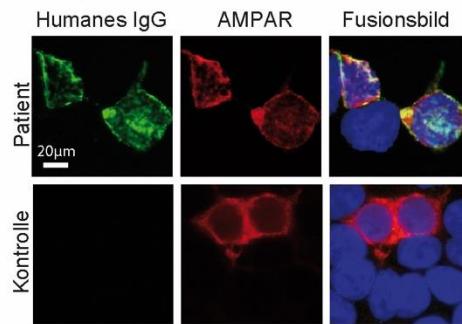
2.1 Studiendesign

Es wurde eine retrospektive monozentrische Kohortenanalyse von insgesamt 81 Patienten mit einer CIDP (n=13), wahrscheinlicher CIDP (n=4), MMN (n=3), akuten Immunneuropathien (n=16), Guillain-Barré-Syndrom(GBS) (n=10) + Miller-Fisher-Syndrom(MFS) (n=6)), anderen inflammatorischen Polyneuropathien (n=22, AIP), anderen nicht inflammatorischen Polyneuropathien (n=23, ANIP), sowie 40 Kontrollpatienten ohne polyneuropathische Beschwerden, im Zeitraum zwischen dem 23.01.2006 und dem 01.03.2016 im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Kiel als Pilotkohorte durchgeführt. Hierbei wurden Patienten anhand der Entlassungsdiagnose identifiziert. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Einschlusskriterium war (1) die Klassifikation der Patienten in eine der oben genannten Gruppen anhand einer retrospektiven Analyse der Patientenakten in Zusammenarbeit mit PD Dr. Frank Leypoldt, sowie (2) das Vorhandensein mindestens einer Liquor- und möglichst einer Serum-Probe mit genügend Material zur Untersuchung. Von den Patienten wurden klinische, elektrophysiologische und laborchemische Daten erfasst. Es wurden pseudonymisierte Daten aus dem Krankenhausinformationssystem ORBIS herausgesucht und anschließend nur mit den pseudonymisierten Daten weitergearbeitet. Die Proben wurden mittels sekundärer Immunhistochemie auf fixierten Rattenhirnschnitten untersucht um bekannte neuronale/gliale Antikörper, sowie Antikörper gegen bislang unbekannte neuronale/gliale Antigene im Liquor und Serum zu identifizieren. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Proben mit nicht eindeutigem Resultat ein zweites Mal getestet und anhand dessen eine Aussage über das Vorhandensein von neuronalen Antikörpern getroffen. Alle Patientenproben mit ausreichend vorhandenem Material wurden bei unserem Kooperationspartner an der Uniklinik Wien mit dem gleichen Verfahren bestätigt. Dieser untersuchte im Anschluss positive Proben auf das Vorhandensein von Neurofascin-155 oder Contactin -1 AK mittels indirekter Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK293T-Zellen zur Identifizierung dieser bekannten Antikörper. Außerdem untersuchten sie Proben mit suggestiv imponierenden immunhistochemischen Mustern mittels indirekter Immunfluoreszenz auf embryonalen Primärkulturneuronen zur Bestätigung von unbekannten neuronalen Oberflächenantigenen. Der diagnostische Ablauf ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

A Screening mit Gewebe-basiertem Test



B Charakterisierung von Antikörpern gegen Oberflächenantigene mit Zell-basierten Testsystemen



C Bestätigung neuer synaptischer Antikörper auf neuronalen Primärkulturen

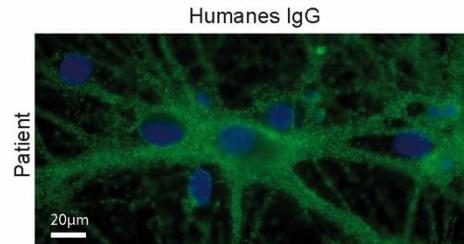


Abbildung 2.1:Diagnostischer Ablauf modifiziert nach (Wandinger et al., 2018)

A: Sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen: Detektion von bekannten neuronalen/glialen Antikörpern, sowie Antikörpern gegen bislang unbekannte neuronale/gliale Antigene; es zeigen sich charakteristische Muster;

B: Indirekte Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen für die Detektion bekannter Antikörper;

C: Indirekte Immunfluoreszenz auf embryonalen Primärkulturneuronen für die Bestätigung von unbekannten neuronalen Oberflächenantigenen

2.2 Klinische Datenerhebung

Die Patientendaten wurden aus den digitalisierten archivierten Patientenakten aus dem UKSH Kiel entnommen. Dabei handelte es sich um pseudonymisierte Daten aus dem Krankenhausinformationssystem ORBIS. Anschließend wurde nur mit den pseudonymisierten Daten weitergearbeitet. Es wurden verschiedene Parameter ermittelt und mittels Microsoft Excel tabellarisch dokumentiert. Anhand dieser Parameter erfolgte ein Vergleich der Kohorten miteinander, sowie ein Vergleich von antikörperpositiven- gegenüber antikörpernegativen Patienten.

Folgende Parameter wurden ermittelt und analysiert:

- Alter bei Symptombeginn
- Geschlecht
- Datum der ersten Präsentation am UKSH Kiel
- Die Erkrankungsdauer bis zur ersten Lumbalpunktion im UKSH Kiel
- Die ersten neurologischen Symptome (sensorisch, motorisch, sensomotorisch, autonom)
- Krankheitsverlauf (chronisch progressiv, schubförmig rezidivierend, stabil)
- Die Krankheitsschwere gemessen an zwei verschiedenen Scores:
 - Initialer INCAT disability Score (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment); (siehe Tabelle 1)
 - Initiale Punktzahl auf der modifizierten Ranking Skala (mRS); maximale Punktzahl auf der modifizierten Ranking Skala (mRS); (siehe Tabelle 2)
- Krankheitsverlauf gemessen an
 - Dauer der Symptome seit der ersten Vorstellung im UKSH Kiel
 - Dauer der Erkrankung in Jahren (Zeit von Symptombeginn bis zur letzten Vorstellung im UKSH Kiel)
 - letzter erhobener mRS- und INCAT-Wert
- Vorhandensein von Komorbiditäten
 - Komorbiditäten (ja, nein, keine Angabe) – Beschreibung
 - Medikation bei der ersten Präsentation
 - Diabetes mellitus als Komorbidität
 - HbA1c-Pathologie, HbA1c in Prozent
 - Vorherige Chemotherapie
 - HIV-Erkrankung
 - Hepatitis B
 - Hepatitis C
 - Vitamin B12 Mangel
- Art der Symptome (symmetrisch; distal; Arme betroffen; Beine betroffen; Autonomes Nervensystem betroffen; Hirnnerven betroffen)
- Durchführung einer Serumimmunfixation
 - Vorhandensein einer monoklonalen Gammopathie
- Erste Liquorpunktion im UKSH Kiel
 - Das Vorhandensein einer Liquorpleozytose
 - Anzahl der Leukozyten im Liquor
 - Eiweißverhöhung im Liquor
 - Laktaterhöhung im Liquor

- Glukose im Liquor
- Isolierte oligoklonale Banden im Liquor
- Albumin im Liquor und Serum
- IgG im Liquor und Serum
- IgA im Liquor und Serum
- IgM im Liquor und Serum
- Durchführung eines Nerven-MRTs
- Durchführung eines Rückenmark-MRTs
 - Verabreichung von Gadolinium, Kontrastmittelanreicherung
- Elektrophysiologische Untersuchungen
 - Neurographie - Vorhandene Pathologie
 - Elektromyographie - vorhandene Pathologie
 - Somatosensorisch evozierte Potenziale - Pathologie
- Nervenbiopsie - vorhandene Pathologie
- Therapie – Ja/Nein, Art, Ansprechen (Kortikosteroide, Plasmapherese, Intravenöse Immunglobuline, Immunsuppressive Mittel)
- Aufenthalt auf der Intensivstation

	Behinderung am Arm	Behinderung am Bein
0	Keine Probleme an den oberen Gliedmaßen	Gehen nicht beeinträchtigt
1	Symptome in einem Arm oder beiden Armen; keine Beeinträchtigung der folgenden Funktionen: Öffnen und Schließen von Reißverschlüssen und Knöpfen, Waschen oder Bürsten der Haare, gleichzeitiger Umgang mit Messer und Gabel, Umgang mit kleinen Münzen	Gehen beeinträchtigt; Patient kann sich aber im Freien eigenständig fortbewegen
2	Symptome in einem Arm oder beiden Armen; Patient kann alle oben genannten Funktionen eingeschränkt ausführen	Patient verwendet zum Gehen im Freien für gewöhnlich eine einseitige Gehhilfe (Stock, Krücke, einen Arm)
3	Symptome in einem Arm oder beiden Armen; Patient kann eine oder zwei der oben genannten Funktionen nicht ausführen	Patient verwendet zum Gehen im Freien für gewöhnlich beidseitige Gehhilfen (Stöcke, Krücken, Gehapparat, beide Arme)
4	Symptome in einem Arm oder beiden Armen; Patient kann drei oder alle oben genannten Funktionen nicht ausführen, aber einige gezielte Bewegungen sind noch möglich	Patient bewegt sich im Freien für gewöhnlich mit dem Rollstuhl fort, kann aber stehen und einige Schritte gehen
5	Patient kann mit keinem Arm gezielte Bewegungen ausführen	Patient ist auf den Rollstuhl angewiesen, kann auch mit Hilfe weder stehen noch einige Schritte gehen

Tabelle 1: INCAT Behinderungsgrad übersetzt aus (Hughes et al., 2001)

Punkte	Symptome
0	Keinerlei Symptome
1	keine signifikante Beeinträchtigung trotz Symptomen (kann alle gewöhnlichen Aufgaben und Aktivitäten ausführen)
2	leichte Beeinträchtigung (kann nicht mehr alle früheren Aktivitäten ausführen, kann aber nach den eigenen Dingen ohne fremde Hilfe schauen)
3	mäßige Beeinträchtigung (braucht etwas Hilfe, kann aber ohne Hilfe gehen)
4	mäßig schwere Beeinträchtigung (ohne Hilfe gehunfähig, braucht für Körperhygiene Hilfe)
5	schwere Beeinträchtigung (bettlägerig, inkontinent, braucht ständige Pflege und Aufmerksamkeit)
6	Tod

Tabelle 2: mRS (modifizierte Ranking Skala) aus (Mattle et al., 2013) nach (van Swieten et al., 1988)

2.3 Patientenkollektiv

Es wurden 81 Patienten und 40 Kontrollen in die Studie aufgenommen. Die Klassifikation der Patienten erfolgte nach den ICD-Codes, der gemeinsamen klinischen

Einschätzung/Klassifikation zusammen mit PD Dr. Frank Leypoldt anhand der archivierten Arztbriefe und Dokumente, sowie der Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen. Die Kohorten wurden klassifiziert in Patienten mit einer chronisch demyelinisierenden Polyneuropathie (n=17), multifokalen motorischen Neuropathie (n=3), akuten Immunneuropathie (Guillain-Barré-Syndrom (n=10) und Miller-Fisher-Syndrom (n=6)), anderen inflammatorischen Polyneuropathie (nicht-klassifizierbare Immunneuropathien n=15; andere entzündliche Neuropathien n=7 (paraneoplastisch n=2, bei POEMS-Syndrom, bei Vaskulitis, bei Endokarditis, PNP bei zugrundeliegender rheumatoider Erkrankung, bilaterale neuralgische Schulteramyotrophie), anderen nicht inflammatorischen Polyneuropathie (nicht inflammatorische PNP mit wahrscheinlicher oder gesicherter anderer Ätiologie n=10 (Diabetes mellitus n=4; hereditär n=3; alkoholtoxisch n=2; chemotherapieinduziert n=1); nicht inflammatorische PNP mit unklarer Ätiologie n=13) und Kontrollpatienten ohne neuropathische Beschwerden (Kopfschmerzen n=16, Kognitive Störung/Demenz n=5, Sensibilitätsstörungen/Paresen ohne fassbare neurologische Ursache n=5 (Sinusitis maxillaris, Burn out Syndrom, psychosomatischer Symptomkomplex bei Depression, Somatisierungsstörung), Gangstörung/Gangataxie n=4, Ischämie n=3 (hinteres Stromgebiet, anteriore ischämische Optikusneuropathie; v.a. TIA), Dissoziative Bewegungsstörung, Normaldruckhydrozephalus, Carpal tunnel Syndrom, Epileptischer Anfall, Delir, Facialisparesis, Tetraspastik). Die CIDP-Patienten wurden anhand der EFNS-Kriterien (European Federation of Neurological Science) weiter in die Gruppe der definitiven CIDP und der wahrscheinlichen CIDP unterteilt (Van den Bergh et al., 2010) (siehe Tabelle 3). Insgesamt lagen 128 Liquor- und 125 Serumproben der Patienten sowie jeweils 40 Liquor- und Serumproben von der Kontrollgruppe vor. Bis auf eine Ausnahme gab es bei jedem Patienten mindestens eine Liquor und Serumprobe. Bei einer Patientin mit Guillain-Barré-Syndrom war lediglich Liquor vorhanden.

I. Definitive CIDP Vorhandensein mindestens einer der folgenden Kriterien:	
a	motorische distale Latenzverlängerung um $\geq 50\%$ über der oberen Normgrenze in zwei Nerven (Medianus Neuropathie am Handgelenk aufgrund eines Karpaltunnelsyndroms muss ausgeschlossen sein)
b	Reduzierung der motorischen Leitungsgeschwindigkeit $\geq 30\%$ unter der unteren Normgrenze in zwei Nerven
c	Verlängerung der F-Wellen-Latzen $\geq 30\%$ über der oberen Normgrenze in zwei Nerven ($\geq 50\%$, falls distaler negativer Ausschlag des CMAP $< 80\%$ unter der unteren Normgrenze)
d	Abwesenheit von F-Wellen in zwei Nerven, falls distaler negativer CMAP $\geq 20\%$ unter der unteren Normgrenze + ≥ 1 anderer demyelinisierender Parameter in einem anderen Nerven
e	partieller motorischer Leitungsblock: $\geq 50\%$ Amplitudenreduktion des proximalen negativen Ausschlags des CMAP relativ zum distalen, falls der distale negative Ausschlag des CMAP $\geq 20\%$ unter der unteren Normgrenze in zwei Nerven, oder in einem Nerven + ≥ 1 zusätzlicher demyelinisierender Parameter in ≥ 1 Nerven
f	abnorme zeitliche Dispersion ($\geq 30\%$ Anstieg der Dauer zwischen dem proximalen und distalen negativem Ausschlag des CPAP) in zwei Nerven
g	Erhöhung des distalen CPAP (Intervall zwischen dem Beginn des ersten negativen Peaks und Rückkehr der Nulllinie des letzten negativen Peaks) in ≥ 1 Nerven (N. medianus $\geq 6,6$ ms, N. ulnaris $\geq 6,7$ ms, N. peroneus $\geq 7,6$ ms, N. tibialis $\geq 8,8$ ms) + ≥ 1 anderen demyelinisierenden Parameter in ≥ 1 anderen Nerven
II. wahrscheinliche CIDP	
$\geq 30\%$ Reduktion des proximalen negativen Ausschlags des CMAP relativ zum distalen (mit Außnahme des N. tibialis posterior), falls der distale negative Ausschlag des CMAP $\geq 20\%$ unter der unteren Grenze der Normalwerte in zwei Nerven ist, oder in einem Nerven + ≥ 1 anderen demyelinisierenden Parameter in ≥ 1 anderen Nerven	
III. mögliche CIDP	
Kriterien wie bei der definitiven CIDP, aber nur in einem Nerven	

Tabelle 3: EFNS-Kriterien (European Federation of Neurological Science) für die CIDP, übersetzt nach (Van den Bergh et al., 2010);
CMAP: compound muscle action potential

2.4 Sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen

Zur Identifizierung von bekannten Antikörpern und Antikörpern gegen bislang unbekannte Antigene wurden die Liquor und Serumproben der Patienten und Kontrollen mittels sekundärer Immunhistochemie auf speziell fixierten Rattenhirnschnitten, die zur Detektion neuronaler Oberflächenantigene optimiert wurden, untersucht. Dabei haben wir uns für das Screening der Patientenproben die Tatsache zunutze gemacht, dass sich bekannte juxtaparanodale Antikörper sehr gut mit diesem Ansatz darstellen lassen (klinische Beobachtung PD Dr. Frank Leypoldt). Dies liegt vermutlich daran, dass die neuronalen und glialen Oberflächenantigene im peripheren und zentralen Nervensystem aus ähnlichen molekularen Bausteinen bestehen (siehe Abbildung 1.4).

2.4.1 Präparation/Fixation der Rattenhirne

Die Präparation und Fixation der Rattenhirne erfolgte durch unsere Medizinisch Technische Assistentin Martina Jansen.

Zum Herstellen der Rattenhirnschnitte wurden adulte Wistar-Ratten aus Zuchtüberschüssen verwendet. Die Ratten wurden mittels CO₂ narkotisiert und dann mittels Genickbruch euthanasiert. Das Gehirn wurde entnommen, in zwei Hälften geschnitten und diese separat für jeweils eine Stunde bei 4 Grad Celcius (°C) (auf Eis) in einer 4-prozentigen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung fixiert. Nach der Fixierung wurden sie in eine 40-prozentige Sucrose/PBS (Phosphate buffered saline)-Lösung überführt, für 48 bis 72 Stunden bei 4°C stehen gelassen und anschließend in einer Einfrierkassette mit einem speziellen Einfriermedium platziert. Zum Frieren des Mediums wurde kaltes Isopentan verwendet. Dazu wurde ein Becherglas mit ca. 150 Milliliter (ml) 2-Methyl-Butan (Isopentan) in ein Dewar-Gefäß gehalten, das zu einem Drittel mit flüssigem Stickstoff gefüllt war und die Kassetten mit den Hirnen in das kalte Isopentan gehalten, bis das Einfriermedium voll durchgefroren war. Die Gewebekassetten wurden entnommen, auf Trockeneis gelegt, in Alufolie verpackt und bei -80°C eingefroren. Anschließend konnten die Hirne mittels Kryotom sagittal auf eine Schnittdicke von 5-7 Mikrometer (µm) zugeschnitten und auf Objektträger platziert werden.

2.4.2 Immunologische Färbung der Rattenschnitte

Für die immunhistologische Färbung der Rattenschnitte wurden diese aufgetaut, in einer PBS-Lösung gewaschen (3x5 Minuten) und die Objektträger anschließend in einer feuchten Kammer platziert (Petrischale ausgelegt mit feuchtem Papier). Um die endogene Peroxidase zu blockieren wurde eine 0,3 prozentige H₂O₂-Lösung (Ansatz: 2,5 ml 30 % H₂O₂ in 250 ml PBS) verwendet und für 10 Minuten inkubiert. Es erfolgte das erneute Waschen mittels PBS (3x5 Minuten) und die Platzierung der Objektträger in einer feuchten Kammer. Um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren wurden je Schnitt 200 Mikroliter(µl) eines 5-prozentigen Ziegen-Serums, gelöst in PBS, auf die Schnitte pipettiert und für 1,5-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Liquor- und Serumproben der Patienten als erster Antikörper auf die Schnitte gegeben. Dazu wurden sie jeweils mit einem 5-prozentigen Ziegen-Serum, in PBS, verdünnt und 150-200 µl der Lösung auf die Schnitte pipettiert, nachdem das inkubierte Ziegen-Serum mittels Aspirator abgesaugt wurde.

Als Positivkontrolle fungierte eine Serumprobe eines Patienten mit positiven N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Antikörpernachweis, als Negativkontrolle eine Serumprobe eines Kontrollpatienten ohne Antikörpernachweis. Über Nacht erfolgte eine Inkubation in der feuchten Kammer bei 4°C.

- Ansatz für die Serumverdünnung: 1:200
(1 µl Serum + 199 µl 5 % Ziegen-Serum in PBS)
- Ansatz für die Liquorverdünnung 1:4 (40 µl Liquor + 120 µl 5 % Ziegen-Serum in PBS)
- Ansatz Positivkontrolle Liquor 1:16 (10 µl Liquor + 150 µl Ziegen-Serum in PBS)
- Ansatz Negativkontrolle Liquor 1:4 (40 µl Liquor + 120 µl Ziegen-Serum in PBS)
- Ansatz Positiv- und Negativkontrolle Serum: 1:200
(1 µl Serum + 199 µl Ziegen-Serum in PBS)

Als zweiter Antikörper wurde, nach vorherigem Waschen in PBS-Lösung (3x5 Minuten), 150-200 µl biotiniertes Ziegen-anti-humanes IgG (Verdünnung 1:2000 in 5 % Ziegen-Serum in PBS) auf die Schnitte pipettiert und für 2 Stunden in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgte erneutes Waschen in PBS (3x5 Minuten) und das Auftragen von ABC Elite Kit (1 ml PBS + 5 µl Reagenz A + 5 µl Reagenz B) auf die Schnitte. Nach der Inkubationszeit von einer Stunde in der feuchten Kammer wurden die Schnitte in PBS-Lösung gewaschen (3x5 Minuten). Um eine Reduktion des Hintergrundes zu erreichen führten wir einen Vorwaschschritt für 30 Sekunden in 0,5 prozentigem Triton-X-100 in PBS-Lösung (12,5 ml 10 % Triton-100 in 250 ml PBS) durch. Das überschüssige Triton wurde abgesaugt und 150-200 µl Diaminobenzidin(DAB)Substrat-Lösung (DAB „ImmPACT“; 1 ml DAB-Dulent + 30 µl DAB-Substrat +10 µl 0,3 % H2O2 in PBS) als Färbelösung mit einer Inkubationszeit von 7-12 Minuten (erst im Dunkeln, ab 7. Minute unter Sicht) auf die Schnitte gegeben. Um die Substratlösung zu stoppen wurde die DAB-Lösung abgekippt, die Objektträger in einen Färbetrog mit PBS gestellt, das PBS einmalig gewechselt und durch destilliertes Wasser ersetzt. Es folgte eine Gegenfärbung mit 25 prozentigem Hämatoxylin in destilliertem Wasser (Verdünnung 1:4) und anschließendem Waschen in Leitungswasser (Wasser 5x wechseln). Zum Entwässern wurden die Schnitte für jeweils 2-3 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x in 70 %, 2x in 90 %, 2x in 100 %), sowie 1x in Xylol getränkt. Das anschließende Eindeckeln erfolgte mit RotiMount (Roth #HP68.1, Dichte 0,88). Ausgewertet wurde mittels Lichtmikroskop von Zeiss.

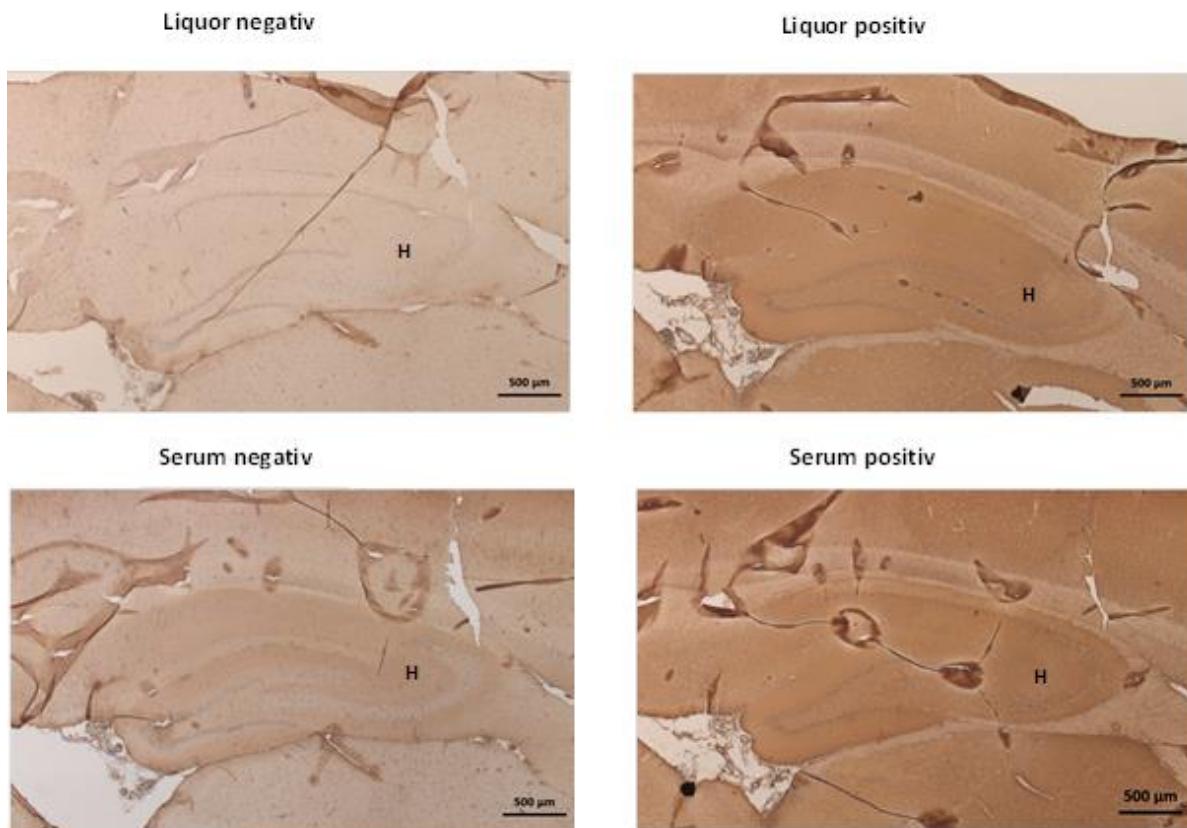


Abbildung 2.2: Sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen – Darstellung der Antikörperreakтивität
 Sagitaler Schnitt eines Rattenhirns mit Darstellung des Hippocampus (H). Die Rattenhirnschnitte wurden mit Patientenliquor und- serum (rechts) oder einer negativen Kontrollprobe (links) inkubiert und immunmarkiert. Das Patientenserum und der Patientenliquor (rechts) reagieren mit dem Hirngewebe bzw. dem Hippocampus – es zeigt sich eine neuropile hippocampale Färbung. Im Vergleich dazu zeigt sich keine Reaktion der Kontrollproben.

2.5 Indirekte Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen

Für den Nachweis von spezifischen Antikörpern wurden alle Proben mit ausreichend Material an das Institut für Neurologie der Medizinischen Universität Wien unter der Leitung von Prof. Dr. Romana Höftberger geschickt. Dort wurden die Proben zunächst separat mittels sekundärer Immunhistochemie auf Rattenhippocampus für die Detektion von bekannten neuronalen Antikörpern und Antikörpern gegen bislang unbekannte Antigene untersucht. Für die Identifikation von spezifischen Antikörpern wurden anschließend alle Proben, die dort in der Immunhistochemie ein für Neurofascin-155 oder Contactin-1 auffällig gefärbtes Muster zeigten, mittels indirekter Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK 293 T-Zellen (Human Embryonic Kidney) getestet. Alle positiven Befunde wurden in unserem Labor zusammen mit Annika Heinius (medizinische Doktorandin) überprüft.

2.5.1 Beschichtung der Petrischalen mit Poly-D-Lysin (PDL)

P60-Zellkulturschalen wurden mit 9-10 sterilen Deckgläsern beschickt. Danach wurde eine Stocklösung Poly-D-Lysin (PDL) (50 mg/ ml in destilliertem Wasser), in PBS verdünnt (Verdünnung 1:1000), in die P60 Schalen gegeben und für zwei Stunden bei 37°C im

Brutschrank inkubiert. Es folgte das dreimalige Waschen in PBS und anschließendes Trocknen. Die Zellkulturschalen wurden so im Brutschrank bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.5.2 Zellaussaat der HEK 293 T-Zellen:

Für die Transfektion wurden HEK 293 T-Zellen verwendet. Sie wurden 24 Stunden vor der Transfektion zur Aussaat bei 60-80 % Konfluenz gesplittet. Dann folgte die Einsaat von 1×10^6 Zellen in eine PDL-beschichtete P60-Zellkulturschale in 5ml DMEM mit 10 % FCS, Pen-Strep, Na-Pyruvat und 2nM L-Glutamin und Inkubation bei 4 % CO₂ und 37°C.

2.5.3 Transfektion der HEK 293 T-Zellen:

Pro Zellkulturplatte wurden je 0,5 ml Optimem mit 10 µl Lipofectamine 2000, sowie 0,5 ml Optimem mit 8 Mikrogramm (µg) Plasmid-DNA (humanes Neurofascin-155 oder Contactin-1) gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Ansätze wurden miteinander gemischt und es folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 1 ml des Mediums der P60-Schalen mit den Zellen abgenommen, 1 ml des Transfektionsmixes dazugetropft, vorsichtig gemischt und für 24 Stunden bei 37°C Raumtemperatur inkubiert.

2.5.4 Immunfloureszenz am Beispiel von Neurofascin-155

Für die Immunfloureszenz wurde das Medium von den Platten gesaugt, die Platten dreimal in PBS gewaschen und 10 Minuten mit kalten PFA 4 % auf Eis fixiert. Anschließend wurden sie, nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS, für 5 Minuten mit 0,3 % Triton-X-100 in PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert und für 90 Minuten mit 1 % Bovines Serumalbumin (BSA)/PBS blockiert. In eine feuchte Kammer (Whatmann-Papier in Petrischale, anfeuchten, Parafilm darauf) wurden je 40 µl der zu testenden Probe und der erste Antikörper pipettiert und ein entsprechendes Deckglas mit Zellrasen nach unten auf den Tropfen gesetzt. Es erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C.

Ansatz 1. Antikörper Neurofascin:

- Mouse Anti-Myc Tag 1:1000 in 1 % BSA/PBS für den Serum- und Liquor- Titer
→Myc-Tag Antikörper werden verwendet, da das Myc-Tag im Neurofascin-155-Plasmid nachweisbar ist

Damit wurden dann die Probenverdünnungen angesetzt:

- Ausgangstiter Serum: 1:40
- Ausgangstiter Liquor: 1:2

Am zweiten Tag wurden die Deckgläser dreimal in einer 6-Well-Platte gewaschen. Je 40 µl der zweiten Antikörperverdünnung wurden in eine durch Alufolie verdunkelte feuchte Kammer aufgetragen, die Deckgläser mit dem Zellrasen nach unten aufgesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Ansatz zweiter Antikörper mit einer Verdünnung von jeweils 1:1000 in 1 % BSA/PBS

- Ziegen Anti-Maus Alexa 594 IgG zum Nachweis der Transfektionseffizienz
- Ziegen Anti-Human Alexa 488 IgG zum Nachweis von humanen Antikörpern

Nach je dreimaligen Waschen der Deckgläser zunächst in 6-Well-Platten in PBS und anschließend in destilliertem Wasser folgte das Eideckeln auf Objektträger mittels Mounting Medium (Vectashield + Dapi). Die Auswertung erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskop von Zeiss.

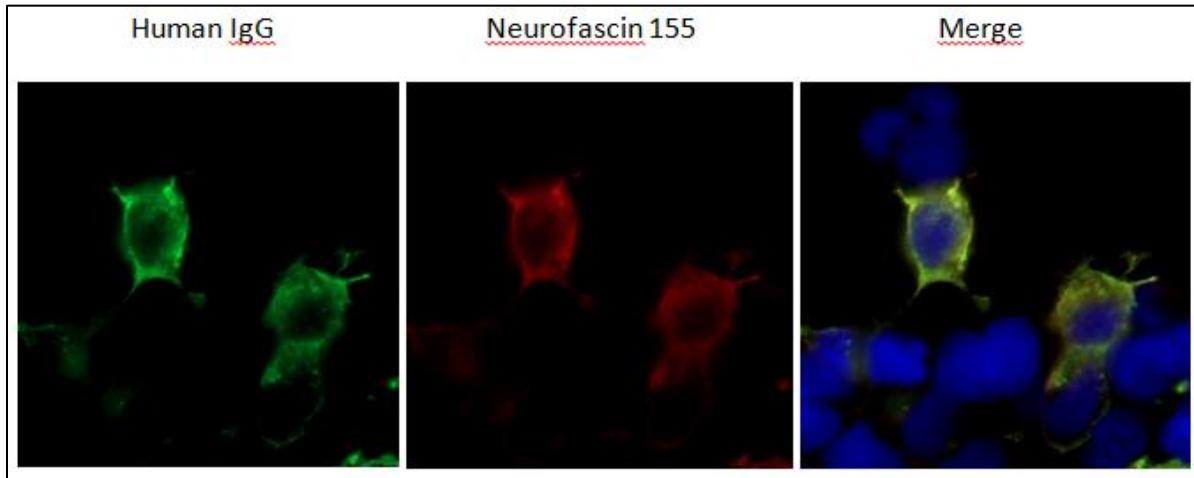


Abbildung 2.3: Indirekte Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen - Beispiel Neurofascin-155
HEK 293 T-Zellen wurden mit Neurofascin-155 transfiziert. Grün: humanes IgG des Patienten; rot: Neurofascin-155; Merge: Fusionsbild; blau: Kernfärbung mit Fluoreszenzfarbstoff DAPI

2.6 Indirekte Immunfluoreszenz auf nicht permeabilisierten, embryonalen Primärkulturneuronen

Die indirekte Immunfluoreszenz auf nicht permeabilisierten embryonalen Primärkulturneuronen erfolgte durch das neurologische Institut der Universität Wien unter der Leitung von Prof. Dr. Romana Höftberger. Proben, die in Wien mittels Immunhistochemie ein suggestiv imponierendes immunhistochemisches Muster zeigten, wurden mittels dieses Verfahrens weiter untersucht, um unbekannte neuronale Oberflächenantigene zu bestätigen. Die in den Serum- und Liquorproben vorhandenen Autoantikörper binden an Oberflächenantigene hippocampaler Neurone und können anschließend mittels eines Immunfluoreszenzfarbstoffs sichtbar gemacht werden.

2.6.1 Immunfloureszensfärbung hippocampaler, primärer Neurone

Für die Immunfloureszensfärbung wurden die Serum- (1:200) und Liquorproben (1:2) zunächst mit konditioniertem Neurobasal+B27-Medium in einer „24-well-Platte“ verdünnt. Anschließend wurden die auf Deckgläser gezüchteten Zellkulturen in die Wells gesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Neurone für 5 Minuten mit 4 prozentigem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Es erfolgte das erneute Waschen mit PBS (dreimal) und die Inkubation mit dem sekundären

Fluoreszenzantikörper Ziegen anti human AlexaFlour 488 (Verdünnung 1:1000 in 5 % Ziegen-Serum/PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur mit anschließendem dreimaligen Waschen in destilliertem Wasser. Zum Eindeckeln wurde das Vectashield/Dapi HardSet verwendet und die Objektträger mittels eines Zeis-Fluoreszenzmikroskops mit einem 63er PlanApo-Objektiv untersucht.

2.7 Materialien

Materialien:

Material	Hersteller	Land
Objektträger 75x25x1mm	Th.Geyer GmbH & Co. KG	Deutschland
Petrischale	Corning Incorporated	USA
Einmalpipetten 1 ml	Saarstedt AG & Co	Deutschland
Pipetten;1-1000 µl	Eppendorf	Deutschland
Pipettenspitzen; 10 -1000 µl	Saarstedt AG & Co	Deutschland
Färbetrog Plastik	Kartell®	Italien
Färbegestell	Kartell®	Italien
Färbetrog, Glas, nach Coplin	Th.Geyer GmbH & Co. KG	Deutschland
Reagiergefäß 2 ml	Saarstedt AG & Co	Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml	Saarstedt AG & Co	Deutschland
Deckgläser (24x50 mm)	Th. Geyer & Co KG	Deutschland
Parafilm Verschlussfolie	SIGMA	USA
Faltenfilter	Schleicher und Schuell	Deutschland
Spritzflasche	Th. Geyer & Co KG	Deutschland

Chemikalien/Lösungen/Puffer:

Chemikalie/Lösung	Hersteller	Land
PBS Dulbecco w/o Ca2+; w/o Mg2+	Biochrom GmbH	Deutschland
H2O2-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Deutschland
Goat-Serum	Biowest	USA
ABC Elite Kit	Vector Laboratories, Inc	USA
Triton X-100	Th.Geyer GmbH & Co. KG	Deutschland
DAB-„ImPACT“-Substrat-Lösung	Vector Laboratories, Inc	USA
Aqua ad injectabilia Braun	B.Braun Melsungen AG	Deutschland
Hämotoxylin	SIGMA Life Science	Schweiz
Ethanol absolut, Min. 99,9 %	Th.Geyer GmbH & Co. KG	Deutschland
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Deutschland
Roti Mount	Carl Roth GmbH + Co. KG	Deutschland

Antikörper:

Antikörper	Hersteller/Quelle
biotinilierter Ziegen-anti-human IgG (H+L),	Vector Laboratories, Inc
Positive Serumprobe für NMDA	Interne Patientenprobe
Negative Serumprobe für NMDA	Interne Patientenprobe

Geräte:

Gerät	Hersteller	Land
Abzug	Köttermann	Deutschland
Kühlschrank 4°C	National Lab GmbH	Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Panasonic	Japan
Vortexer Vortex Genie 2	SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC	USA
Grant-Bio Aspirator	Grant Instruments Ltd,	England
Microskop Zeiss, Axio Scope.A1	Zeiss	Deutschland
Objektiv: Zeiss 2,5 fach	Zeiss	Deutschland

2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von Microsoft Excel und online erhältlichen Tests ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test, Fisher-Exact-Test, One-way-ANOVA, Mann-Whitney-U-Test, Kruskall-Wallis-Test und dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Kohorten

Im ersten Schritt untersuchte ich die klinischen Charakteristika der einzelnen Gruppen von Patienten mit immunvermittelten Neuropathien im Vergleich untereinander und mit der Kontrollgruppe der Patienten mit nicht-polyneuropathischen Erkrankungen und der Kontrollgruppe der Patienten mit klinisch als nicht entzündlich eingeschätzten Neuropathien (ANIP). Da manche Patienten mit klinisch als entzündlich eingeschätzten Neuropathien keiner Kategorie entzündlicher Neuropathien sicher zugeordnet werden konnten, wurden diese als andere inflammatorische Neuropathien (AIN) kategorisiert (Detaillierte Ergebnisse siehe Tabelle 5). Aufgrund der kleinen Fallzahl in den jeweiligen Untergruppen hat der direkte Vergleich der Gruppen nur eine niedrige Trennschärfe (Power). Unter Berücksichtigung des Thesen-generierenden Pilotcharakters der Studie berichte ich jedoch auch tendenzielle Unterschiede, die in gruppenübergreifenden statistischen Tests nicht signifikant sind.

Patienten mit chronischen Immunneuropathien (n=20; 65 % männlich) waren im Mittel 53 Jahre (definitive CIDP n=13, wahrscheinliche CIDP n=4, MMN n=3), Patienten mit akuten Immunneuropathien (n=16; 44 % männlich) 57 Jahre, Patienten mit anderen inflammatorischen PNP (n=22; 64 % männlich) 52 Jahre, mit ANIP (n=23; 61 % männlich) 60 Jahre und die Kontrollgruppe (n=40; 45 % männlich) 56 Jahre alt (siehe Tabelle 4).

Kohorten	CIDP-D	CIDP-W	MMN	GBS+MFS	AIP	ANIP	Kontrollen
n	13	4	3	16	22	23	40
Alter	49± 11	71± 7	44± 18	57± 20	52± 14	60± 13	56± 19
männlich %	54	75	100	44	64	61	45
Liquorproben	28	8	3	27	36	26	40
Serumproben	28	8	3	24	36	26	40

Tabelle 4: Kohorten mit Anzahl Liquor- und Serumproben:

CIDP-D: definitiv CIDP; CIDP-W: wahrscheinlich CIDP; MMN: multifokale motorische Neuropathie; GBS: Guillain-Barré-Syndrom; MFS: Miller-Fisher-Syndrom; AIP: andere inflammatorische Polyneuropathien; ANIP: andere nicht inflammatorische Polyneuropathien; Mittelwert (MW) ± Standardabweichung

Im Hinblick auf die Alters- und Geschlechtsverteilung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkohorten und den Kontrollen (siehe Tabelle 5).

Etwa dreiviertel der Patienten mit CIDP und ANIP und über 80 % der Patienten mit akuten Immunneuropathien stellten sich mit einer symmetrischen Verteilung ihrer Beschwerden vor. Nur bei den MMN-Patienten klagten zwei von drei über ein asymmetrisches

Beschwerdebild. Eine Hirnnervenbeteiligung zeigte sich vor allem bei den akuten Immunneuropathien und den AIP. Die Hirnnerven waren in beiden Gruppen signifikant häufiger betroffen im Vergleich zu den Patienten mit ANIP (Tabelle 5). Eine autonome Symptomatik konnte lediglich bei 54 der insgesamt 81 Patienten sicher erhoben werden.

Patienten mit einer akuten Immunneuropathie wurden signifikant früher lumbalpunktiert (Median:18,3 Tage, IQR:7,3-25,6) als Patienten mit chronischen Neuropathien (definitive CIDP: Median:1,1 Jahre, IQR:2,3-0,2; wahrscheinliche CIDP: Median:4,7 Jahre, IQR:1,3-5). Auffälligkeiten im Liquor zeigten sich vor allem bei den Patienten mit akuten Immunneuropathien. Ein Viertel der Patienten wies eine milde Zellzahlerhöhung (Median:12/ μ l, Tabelle 5) auf und bei 13 % konnten oligoklonale Banden nachgewiesen werden. Auch das Gesamteiweiß war in dieser Gruppe bei 69 % der Patienten erhöht (Median:671,5mg/l; SD:485,75-956). Allerdings fand sich ein erhöhtes Gesamteiweiß tendenziell am häufigsten bei Patienten mit CIDP (definitiv+wahrscheinlich:71 %; definitiv:77 %).

Die Krankheitsschwere und den Krankheitsverlauf erfassten wir anhand des initialen INCAT- und mRS-Scores, des maximalen mRS-Score Wertes und des mRS- und INCAT-Scores während des letzten vorhandenen Verlaufbriefs. Initial, während der ersten Präsentation im UKSH, zeigte sich ein vergleichbarer Behinderungsgrad innerhalb der Gruppen mit einer leichten Beeinträchtigung im Alltag. Die stärkste Ausprägung der Symptomatik während des Krankheitshöhepunktes, gemessen am maximalen mRS-Wert, war bei den CIDP- Patienten vorhanden. In allen Gruppen kam es im Verlauf zu einer Stabilisierung der Beschwerden, in der GBS-Kohorte eher zu einer Besserung. Den längsten bekannten Verlauf hatten die Patienten mit chronischen Erkrankungen (CIDP-, sowie die ANIP-Patienten), den kürzesten verfügbaren Verlauf die Patienten mit den akuten Immunneuropathien.

Die Mehrheit der CIDP-Patienten wurde mit IVIG oder Steroiden behandelt, für alle anderen therapeutischen Modalitäten lagen sehr kleine Fallzahlen vor (Tabelle 5). Assoziiert mit Immunglobulinen kam es subjektiv zu einer Besserung der Symptomatik bei ¾ der Patienten (12/16, bei einem Patienten Therapieansprechen unbekannt). Assoziiert mit Steroiden zeigten 35 % ein positives Ansprechen (6/17, bei vier Patienten Therapieansprechen unbekannt). Innerhalb der Gruppen zeigte sich ein ähnliches Bild. Bei Patienten mit akuten Immunneuropathien (14/16, 87,5 %) und MMN (3/3, 100 %) war eine Behandlung mit Immunglobulinen mit Besserung assoziiert. Steroide wurden bei diesen Patientengruppen kaum verabreicht. Plasmapheresen (PPH) kamen nur bei akuten Immunneuropathien (Besserung bei 2/2 Patienten), in der definitiven CIDP-Kohorte (Besserung bei 3/5 Patienten) und bei anderen inflammatorischen Neuropathien (Besserung bei 2/5 Patienten) zum Einsatz (siehe Tabelle 5).

n		Definitive CIDP	wahrscheinliche CIDP	MMN	GBS + MFS	AIP	ANIP	gesunde Kontrollen	p
		13	4	3	16	22	23	40	
	Alter	50 ± 11	71 ± 7	44 ± 18	57 ± 20	52 ± 14	60 ± 13	56 ± 19	1,24*
	männlich %	54	75	100	44	64	61	45	0,354§
Symptomatik	Symmetrisch	10/13	3/4	1/3	13/16	13/22	17/23		0,329§
	Autonom	5/11	2/2	0/2	3/13	4/14	5/12		0,423 §
	Hirnnerven	3/13 (23%)	0/4 (0%)	0/3 (0%)	7/16 (44%)	6/22 (27%)	1/23 (4%)		0,0002§
Erste Lumbarpunktion	Erkrankungsdauer bei LP in Jahren	1,10 [2,3-0,17]	4,71 [1,30-5,01]	0,86 [0,50-5,02]	0,05 [0,02-0,07]	0,78 [0,07-1,57]	2,00 [0,77-5,24]		<0,0001&
	Liquorpleozytose	0/13	0/4	0/3	4/16 (12[6-92,25])	4/22 (7,35[6-13,43])	1/23 (17[17-17])		0,1 §
	Gesamteiweiß-erhöhung	10/13	2/4	2/3	11/16	11/22	14/23		0,716§
	Gesamteiweiß in mg/l	644 [560-846]	500,5 [439,75-927,25]	604 [196-672]	671,5 [485,75-956]	485,5 [365,50-719,25]	537 [412-780]		0,41&
	Isolierte OKB i.L.	1/12	0/4	0/3	2/16	2/22	1/23		0,879 §
Krankheitsschwere	INCAT Score initial	2 [2-2,45]	3 [1,5-4,5]	2 [2-7]	2,5 [2-4]	2 [2-3]	2 [1-3]		0,124&
	mRS initial	2[2-2,5]	2,5[2-3]	2[1-2]	2[1-3]	2[1-3]	2[1-2]		0,139&
	mRS max.	4[2-4,5]	2,5[2-3,75]	2[2-3]	2,5[2-4]	2,5[2-4]	2[2-2]		0,236&
Therapie	Ansprechen auf Steroide	4/13	2/4	0/1	2/2	5/13	2/5		0,496§
	Ansprechen auf ivIG	10/13	2/3	3/3	14/16	8/14	3/7		0,127§
	Ansprechen auf PE	3/5	0/0	0/0	2/2	2/5	0/0		0,747§
	Ansprechen auf andere Immuntherapien	2/6	0/0	0/0	1/1	1/5	0/1		0,65§
Verlauf	Verlauf in Jahren	5,20 [2,11-6,77]	5,92 [3,92-8,46]	1,59 [1,46-9,90]	1,08 [0,20-2,37]	3,84 [2,28-6,06]	5,24 [2,04-10,68]		0,0046&
	mRS letzter Verlauf	2 [2-4]	2,5 [1,25-3,75]	2 [1-3]	1,5 [1-2,75]	2 [2-4]	2 [2-2]		0,201&
	INCAT Score letzter Verlauf	2 [1-9,5]	3,5 [0,7-6,25]	2 [2-7]	2 [1-4]	3,5 [2-5,25]	2 [2-4]		0,566&

Tabelle 5: Vergleich der unterschiedlichen Kohorten

Mittelwert (MW)±Standartabweichung (SD); Median [Q1-Q2]; INCAT:Summe aus Armen und Beinen; mRS:Modifizierte Ranking Skala; Liquorpleozytose:ZZ>5/µl; Gesamteiweißerhöhung:>500 mg/l; * One-way ANOVA, Gruppe 1&2 zusammengefasst; § Fisher's Exact Test, two sided, Gruppe 1&2 zusammen gefasst; & Kruskall-Wallis, post-hoc mit Mann-Whitney U Test, two tailed, Gruppe 1&2 zusammen gefasst

3.2 Prävalenz neuronaler/glialer Autoantikörper

3.2.1 Insgesamt identifizierte neuronale/gliale Antikörper im Liquor und Serum

In einem zweiten Schritt untersuchte ich verblindet für die klinischen Informationen sämtliche vorhandene Liquor und Serumproben der Patienten inklusive aller vorhandenen Verlaufsproben. Von den 168 getesteten Liquor- und 165 Serumproben der Patienten und Kontrollen zeigten je 26 Auffälligkeiten in der immunhistochemischen Färbung, hinweisend auf das Vorliegen eines neuronalen/glialen Autoantikörpers (siehe Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2). Bei keinem der getesteten 40 Kontrollpatienten (jeweils Liquor und Serum) fand sich ein positiver Befund. Bei fast allen positiv getesteten Patienten ließen sich jeweils Antikörper im Liquor und im Serum nachweisen. Lediglich bei zwei Patienten aus der Gruppe der AIP zeigte sich jeweils nur Positivität im Serum und nicht im Liquor. Die GBS Patientin ohne vorhandenes Serum hatte einen positiven Liquorbefund. Insgesamt stammten 15 der positiven Liquorproben von 4 Patienten aus der Gruppe der definitiven CIDP, 6 Proben von 5 Patienten aus der Gruppe der akuten Immunneuropathien, 3 Proben von 3 Patienten aus der Gruppe der AIP und 2 Proben von 2 Patienten aus der Gruppe der ANIP (siehe Abbildung 3.1). Bei den positiven Serumproben stammten 14 Proben von 4 Patienten aus der Gruppe der definitiven CIDP, 5 Proben von 4 Patienten aus der Gruppe der akuten Immunneuropathien, 5 Proben von 5 Patienten aus der Gruppe der AIP und 2 Proben von 2 Patienten aus der Gruppe der ANIP (siehe Abbildung 3.2).

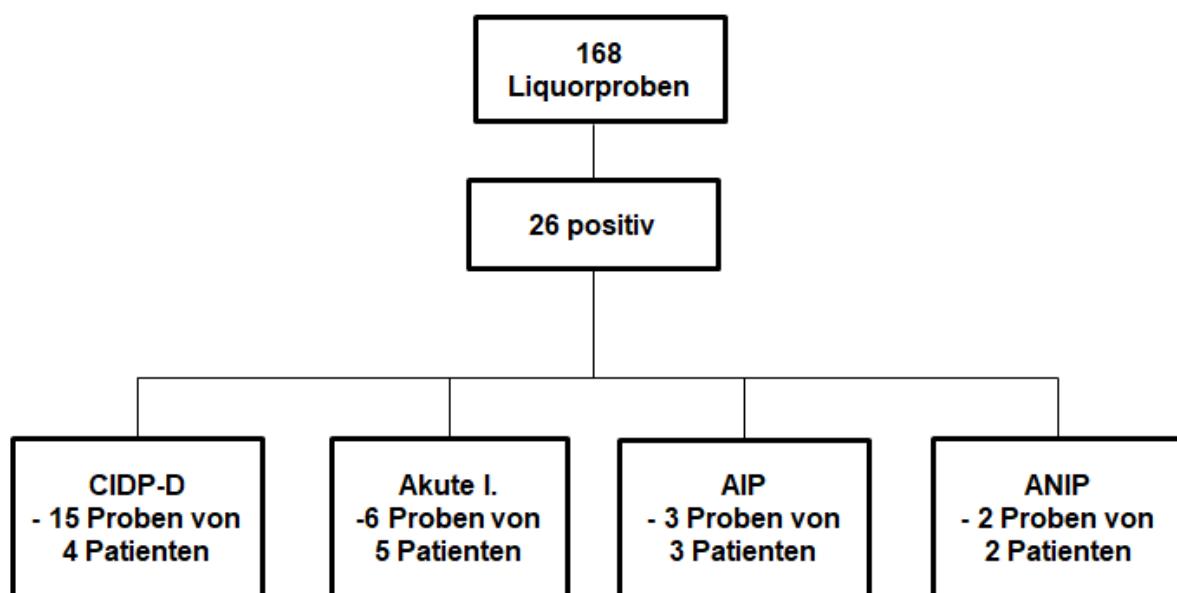


Abbildung 3.1: Antikörperverteilung der Liquorproben

CIDP-D=definitiv chronisch inflammatorische PNP; akute I.=akute Immunneuropathien; AIP=andere inflammatorische PNP; ANIP=andere nicht inflammatorische PNP

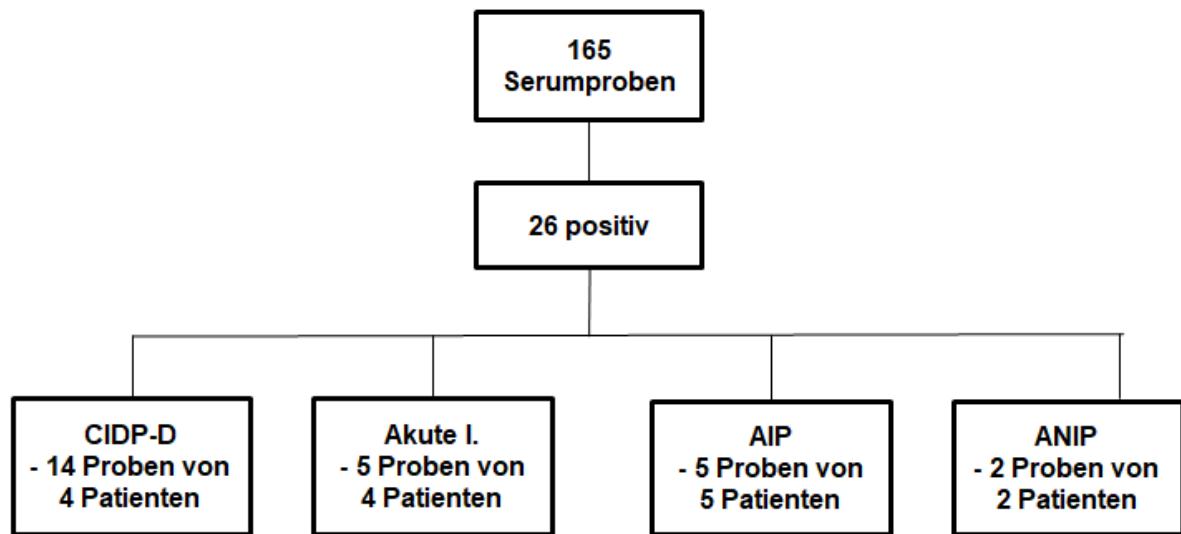
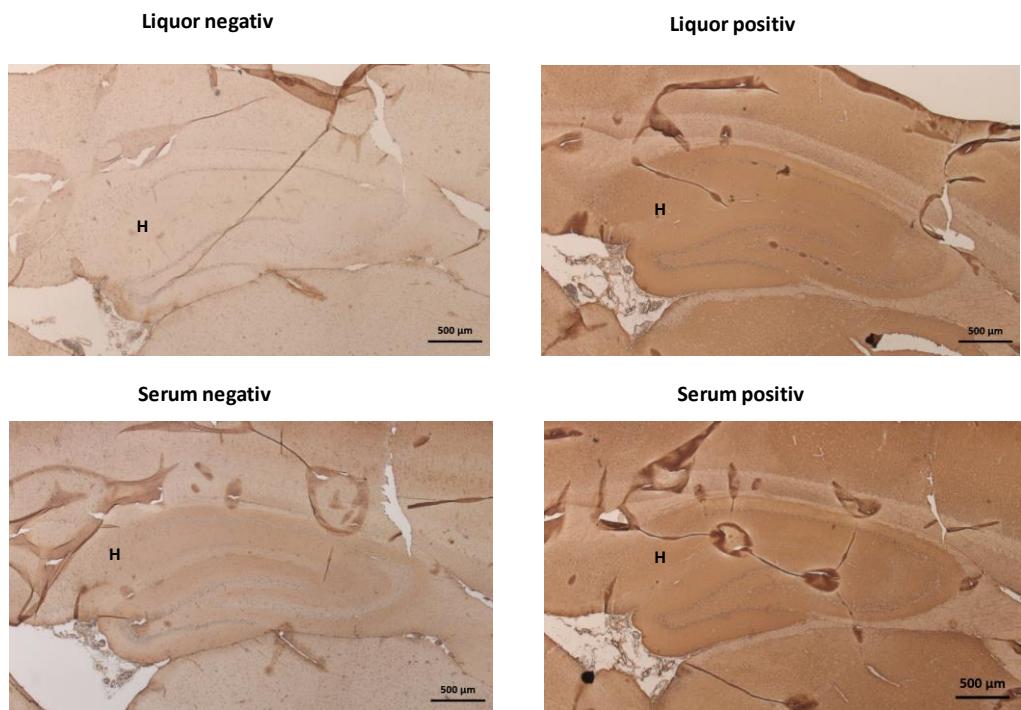


Abbildung 3.2: Antikörperverteilung der Serumproben

CIDP-D=definitiv chronisch inflammatorische PNP; akute I.=akute Immunneuropathie; AIP=andere inflammatorische PNP; ANIP=andere nicht inflammatorische PNP

(A)



(B)

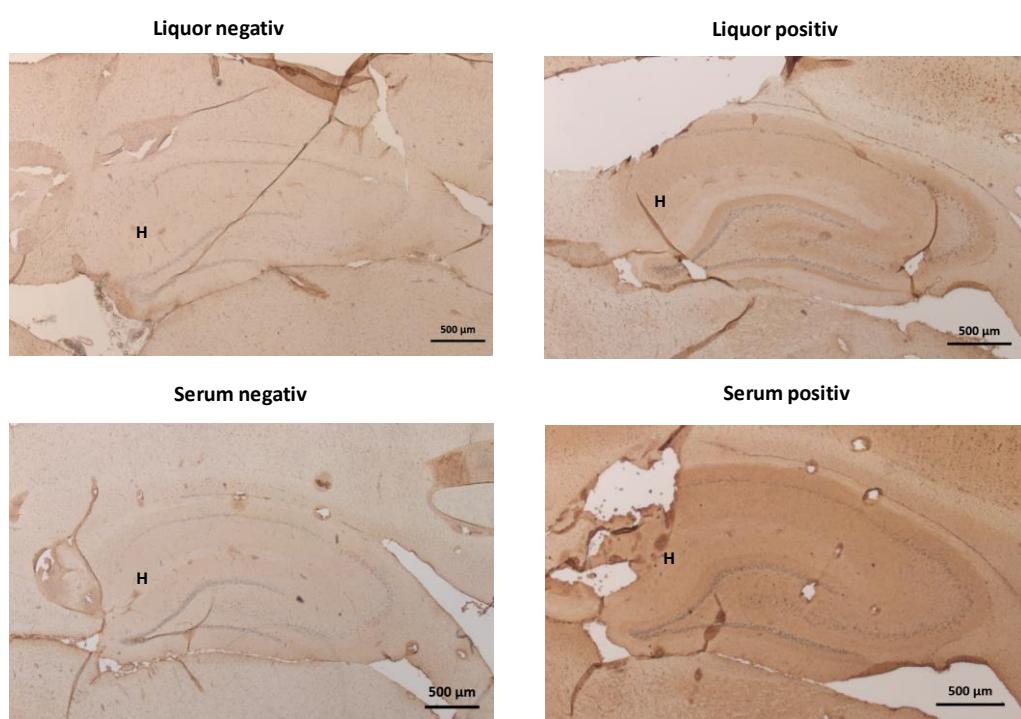


Abbildung 3.3: Beispielbefunde von Patienten mit nachweisbaren neuronalen Antikörpern im Serum und Liquor. Sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen

Sagitaler Schnitt eines Rattenhirns mit Darstellung des Hippocampus (H).

(A): Patient mit Neurofascin-155 Antikörpern im Liquor und Serum

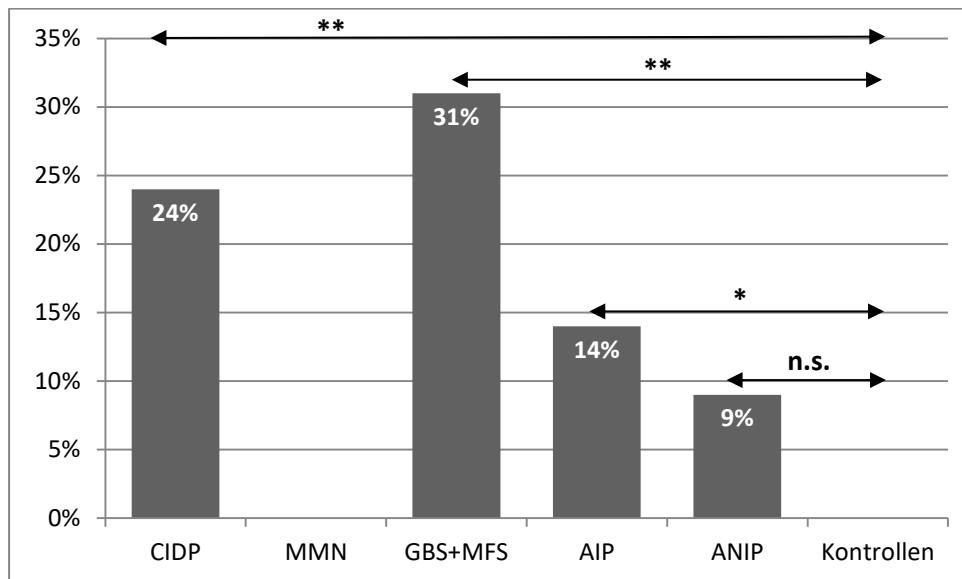
(B): Patient mit HNK-1 Antikörpern (Human-natural-killer-1) im Liquor und Serum

Die Rattenhirnschnitte wurden mit Patientenliquor und- serum (rechts) oder einer negativen Kontrollprobe (links) inkubiert und immunmarkiert. Das Patientenserum und der Patientenliquor reagieren mit dem Hippocampus (H). Es zeigt sich eine Neuropil-Färbung mit charakteristischem Muster. Die anschließenden Immunfluoreszenzen auf transfizierten HEK-Zellen identifizierten jeweils NF-155 Antikörper (bei A) und HNK-1 Antikörper (bei B) im Liquor und Serum der Patienten.

3.2.2 Prävalenz neuronaler/glialer Autoantikörper in den verschiedenen Krankheitsgruppen

Als nächstes untersuchte ich, ob es zwischen den einzelnen klinisch definierten Neuropathie-Gruppen und der Gruppe von Patienten ohne entzündliche und neuropathische Erkrankungen (Kontrollgruppe) signifikante Unterschiede in der Prävalenz neuronaler/glialer Autoantikörper gab. Bei Patienten mit CIDP (definitiv und wahrscheinlich, Liquor & Serum: 4/17, 24 %, $p=0,006$), Patienten mit akuten Immunneuropathien (GBS+MFS, Liquor: 5/16, 31 %, $p=0,0011$; Serum: 4/15, 27 %, $p=0,004$) und Patienten mit anderen inflammatorischen Polyneuropathien (Liquor: 3/22, 14 %, $p=0,0407$; Serum: 5/22, 23 %, $p=0,0041$) fanden sich signifikant häufiger neuronale Antikörper im Vergleich zu der Kontrollgruppe von Patienten ohne Neuropathien. Alle positiv getesteten Patienten mit einer CIDP waren als definitive CIDP klassifiziert worden. Patienten mit MMN zeigten keine Antikörperpositivität im Serum und im Liquor. Insgesamt fanden sich am häufigsten Antikörper im Liquor und Serum bei Patienten mit akuten Immunneuropathien (GBS+MFS; Liquor: 31 %; Serum 27 %) (Abbildung 3.4).

(A)



(B)

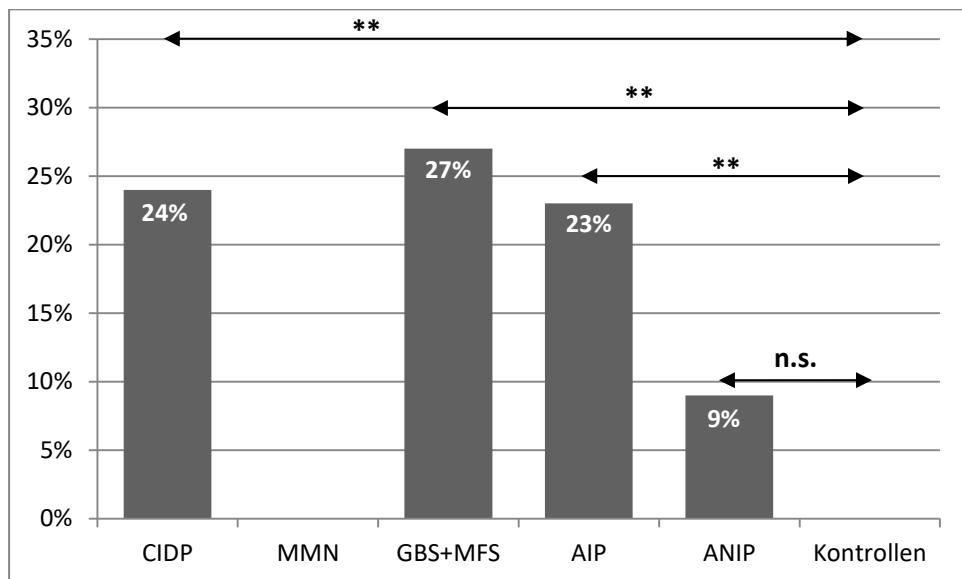


Abbildung 3.4: Prävalenz von hippocampalen Antikörpern bei Patienten nach klinischen Gruppen sortiert

(A): Antikörperprävalenz im Liquor; (B): Antikörperprävalenz im Serum

CIDP=Chronisch inflammatorische demyelinisierende PNP (definitiv CIDP+ wahrscheinlich CIDP zusammen);

MMN=Multifokale motorische Neuropathie; GBS=Guillain-Barré-Syndrom; MFS=Miller-Fisher-Syndrom

AIP=andere inflammatorische PNP; ANIP=andere nicht inflammatorische PNP; Statistik mit Fisher's Exact (n.s.=nicht signifikant; *p<0,05, **p<0,01)

3.2.3 Klinischer Vergleich zwischen Patienten mit oder ohne neuronale/gliale Autoantikörper

Letztlich handelt es sich bei der klinischen Kategorisierung um ein klassifikatorisches System mit einer gewissen Unschärfe. Beispielsweise kann eine CIDP anfangs klinisch nicht von einem GBS unterscheidbar sein, erst der willkürlich definierte längere Zeitraum der Krankheitsprogression bewirkt eine Reklassifikation in eine CIDP. In einem weiteren

Schritt untersuchte ich daher, ob das Vorhandensein neuronaler/glialer Autoantikörper in der gesamten Gruppe aller Patienten mit Neuropathien im Vergleich zu den Patienten ohne diese Antikörper mit Krankheitsausprägung oder Therapieansprechen assoziiert war.

Tabelle 6 vergleicht alle antikörperpositiven- mit allen antikörpernegativen Patienten (basierend auf den Testergebnissen im Liquor). Insgesamt konnten wir bei 14 Patienten im Liquor neuronale Antikörper mittels Immunhistochemie nachweisen. Bei 67 Patienten zeigte sich keine Antikörperpositivität. Die Antikörper positiven Patienten waren tendenziell etwas jünger zu Symptombeginn (MW:53, SD:18 versus (vs.) MW:56, SD:15) und etwas häufiger dem männlichen Geschlecht zugehörig (64 % vs. 58 %). Sie zeigten einen signifikant schnelleren Krankheitsbeginn, gemessen an dem Zeitraum des Symptombeginnes bis zur ersten Lumbalpunktion im UKSH. Die Erkrankungsdauer bis zu diesem Zeitpunkt lag im Mittel unter einem Monat (Median:0,08 Jahre, IQR:0,03-0,75), bei Patienten ohne Antikörper hingegen bei fast einem Jahr (Median:0,97 Jahre, IQR:0,25-3,71, p=0,017). Der Krankheitsverlauf zeigte sich nicht nur schneller, sondern auch fulminanter, mit signifikant höherem Behinderungsgrad zum Zeitpunkt des Krankheitshöhepunktes (mRS max Median:4, IQR:2-4,25 vs. mRS max. Median:2, IQR:2-4, p=0,02) und Beschwerdeverschlechterung beim letzten erhobenen Status. Bei den negativ getesteten Patienten verlief die Symptomatik konstanter. Es zeigte sich im Mittel keine bzw. eine leichte Verschlechterung der Beschwerden zum Krankheitshöhepunkt und es kam zu einer Stagnation, oder Besserung der Symptomatik im Verlauf. (mRS initial Median:2, IQR:1-3; INCAT initial Median:2, IQR:1-3; mRS max Median:2, IQR:2-4; mRS Verlauf Median:1, IQR: 1-3; INCAT Verlauf Median:2, IQR:1-4) (Abbildung 3.5).

In der ersten Lumbalpunktion zeigten sich signifikante Unterschiede in Bezug auf die Zellzahlerhöhung (>5/ μ l) und der Höhe des Gesamteiweißes. 36 % der positiv getesteten Patienten wiesen eine Liquorpleozytose auf, im Gegensatz dazu lediglich 6 % der Negativen (p=0,006). Das Gesamteiweiß war bei 85,7 % der positiv Getesteten signifikant erhöht (>500 mg/l, AK neg:56,7 %) und lag im Mittel bei ca.931 mg/l (AK neg:527 mg/l; p=0,0014). Oligoklonale Banden fanden sich in beiden Gruppen lediglich bei 7-8 %. Sowohl bei den antikörperpositiven, als auch bei den antikörpernegativen Patienten war das Beschwerdebild in den meisten Fällen durch eine symmetrische Verteilung der Symptome geprägt. Dennoch zeigten Patienten mit Antikörpern tendenziell häufiger ein symmetrisches Verteilungsmuster der Beschwerden, eine autonome Symptomatik und vor allem eine häufigere Hirnnervenbeteiligung (siehe Abbildung 3.6).

Im Hinblick auf die therapeutischen Ansätze wird ersichtlich, dass Patienten mit Antikörpern im Liquor tendenziell deutlich besser auf antikörperorientierte Immuntherapien (IVIG und PPH) ansprechen, was sich vor allem in der Therapie mit Immunglobulinen (10/12, 83,3 %) und Plasmapherese (4/4, 100 %) widerspiegelt. Eine Plasmapherese als Therapieoption

wurde jedoch lediglich bei etwa 29 % der positiven und 12 % der negativen Patienten durchgeführt. Sie führte allerdings bei 4 von 4 der behandelten positiven Patienten zum Erfolg, im Gegensatz dazu kam es nur bei etwa 3 der 8 negativ Getesteten zu einer Verbesserung der Symptomatik ($p=0,08$, siehe Tabelle 6 und Abbildung 3.7).

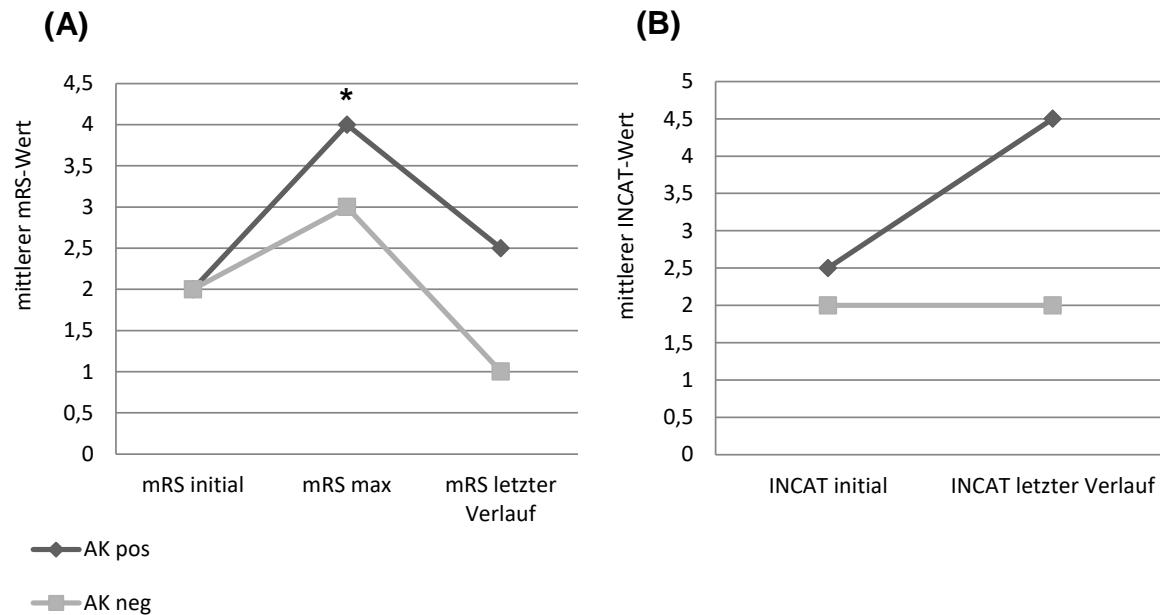


Abbildung 3.5: Krankheitsverlauf der Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor
 (A): Krankheitsverlauf anhand des mRS-Scores; (B): Krankheitsverlauf anhand des INCAT-Scores
 $*p<0,05$

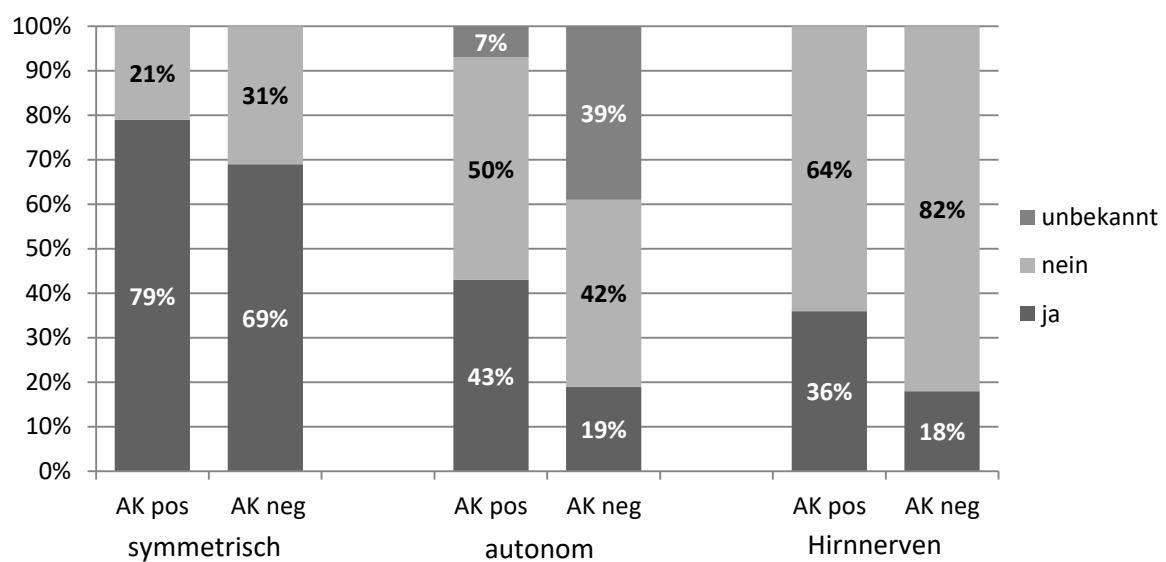


Abbildung 3.6: Klinische Symptomatik der Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung

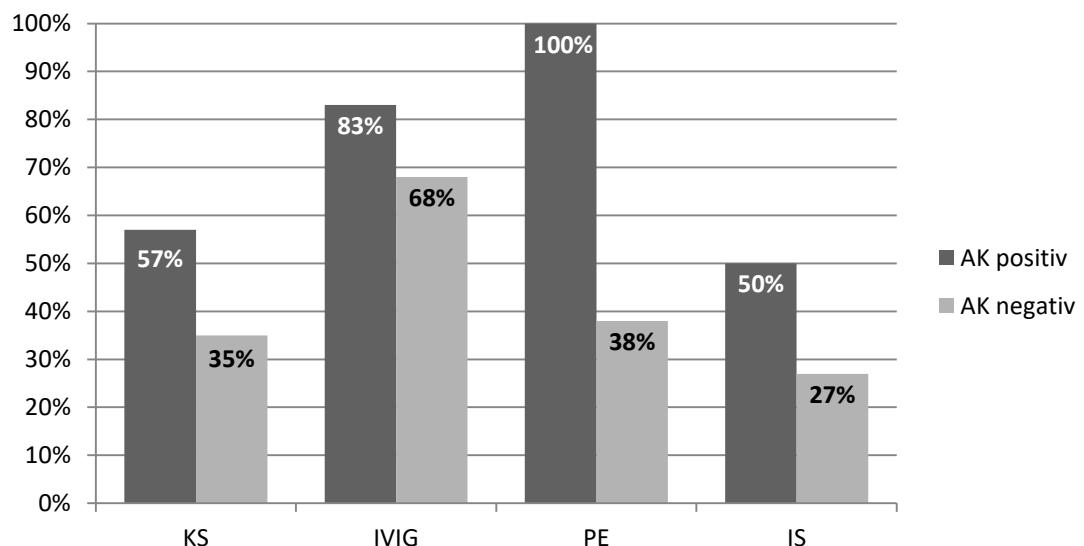


Abbildung 3.7: Therapieansprechen aller Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor
KS=Kortikosteroide, IVIG= Immunglobuline, PE=Plasmapherese, IS=Immunsuppressiva

n		Ak pos	Ak neg	p
		14	67	
Alter		53 ± 18	56 ± 15	0,44*
männlich %		64	58	0,77§
Symptomatik	symmetrisch	78,6 % (11/14)	68,7 % (46/67)	0,539§
	autonom	46,2 % (6/13), 1 n.b.	31,7 % (13/41), 26 n.b.	0,506§
	Hirnnerven	35,7 % (5/14)	17,9 % (12/67)	0,158§
Erste Lumbalpunktion	Erkrankungsdauer bei LP in Jahren	0,08 [0,03-0,75]	0,97 [0,25-3,71]	0,017\$
	Liquorpleozytose	35,7 % (5/14), 17[6-67,5]	6 % (4/67), 7,35[6-13,43]	0,006§
	Gesamteiweiß-erhöhung	85,7 % (12/14)	56,7 % (38/67)	0,068§
	Gesamteiweiß in mg/l	931 [638-1405]	527 [412-712]	0,0014\$
	Isolierte OKB i.L.	7,7 % (1/13), 1 n.b.	7,5 % (5/67)	1§
Krankheitsschwere	mRS initial	2 [1-2,25]	2 [1-3]	0,96\$
	INCAT Score initial	2,5 [2-3,25]	2 [1-3]	0,3\$
	mRS max.	4 [2-4,25]	2 [2-4]	0,02\$
Therapieansprechen	Kortikosteroide	57,1 % (4/7); 1 n.b.	35,3 % (11/31); 3 n.b.	0,4§
	Immunglobuline	83,3 % (10/12)	68,2 % (30/44); 1.n.b.	0,48§
	Plasmapherese (PE)	100 % (4/4)	37,5 % (3/8)	0,08§
	Immunsuppressiva (IS)	50 % (1/2)	27,3 % (3/11); 1 n.b.	1§
	andere Immuntherapie (PE od. IS)	83,3 % (5/6)	31,6 % (6/19); 1.n.b.	0,06§
Krankheitsverlauf	Verlauf in Jahren	2,13 [0,91-6,80]	3,97 [1,59-7,05]	0,32\$
	mRS letzter Verlauf	2,5 [1,75-4,25]	1 [1-3]	0,15\$
	INCAT letzter Verlauf	4,5 [2-9,25]	2 [1-4]	0,08\$

Tabelle 6: Vergleich der Antikörper positiven und Antikörper negativen Patienten im Liquor

MW±SD; Median[Q1-Q2]; INCAT:Summe aus Armen und Beinen; mRS:Modifizierte Ranking Skala; Liquorpleozytose:ZZ>5/µl; n.b.=nicht bekannt; * t-test; § Fisher's Exact Test, two sided; \$ Mann-Whitney-U-Test, two tailed

In der **Tabelle 7** ist der Vergleich von allen antikörperpositiven mit allen antikörpernegativen Patienten im Serum dargestellt. Hier ergaben sich sehr ähnliche Befunde. Bei 15 der 80 getesteten Patienten ließen sich Antikörper im Serum nachweisen. Mit Ausnahme von drei Patienten, waren sowohl Antikörper im Serum, als auch im Liquor vorhanden (siehe

Abschnitt 3.2.1). Im Hinblick auf die Symptomatik zeigt sich eine im Verhältnis noch häufigere, signifikante Hirnnervenbeteiligung der antikörperpositiven Patienten (siehe Abbildung 3.9). Der fulminantere Beginn der Erkrankung, sowie die schwerere Ausprägung der Symptomatik während des Krankheitshöhepunktes sind auch hier deutlich ersichtlich, erreichen allerdings keine Signifikanz (siehe Abbildung 3.8).

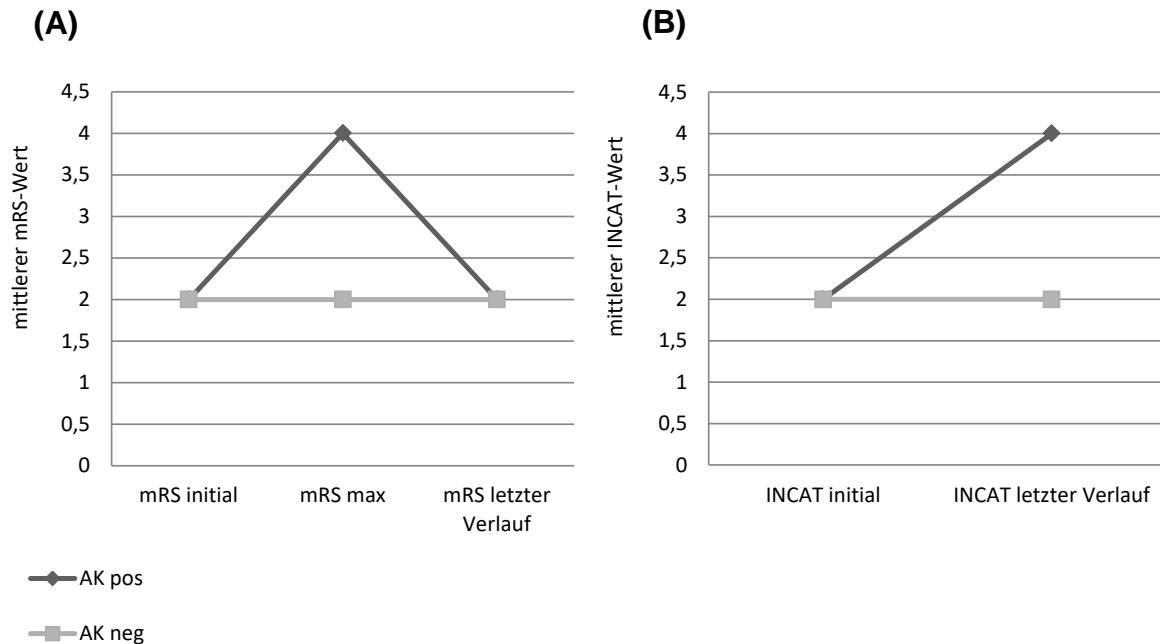


Abbildung 3.8: Krankheitsverlauf der Patienten mit und ohne Antikörper im Serum
(A):Krankheitsverlauf anhand des mRS-Scores; (B):Krankheitsverlauf anhand des INCAT-Scores

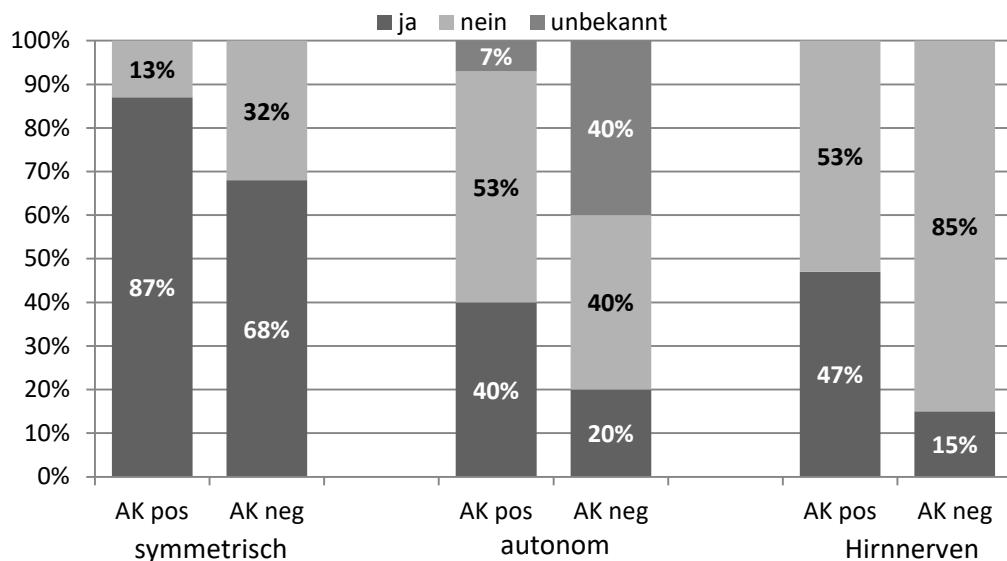


Abbildung 3.9: Klinische Symptomatik der Patienten mit und ohne Antikörper im Serum bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung.

	n	Ak pos	Ak neg	p
		15	65	
		53 ± 18	56 ± 15	0,58*
Symptomatik	männlich %	73	57	0,38§
	symmetrisch	86,7 % (13/15)	67,7 % (44/65)	0,209§
	autonom	42,9 % (6/14)	33,3 % (13/39)	0,535§
Erste Lumbalpunktion	Hirnnerven	46,7 % (7/15)	15,4 % (10/65)	0,0136§
	Erkrankungsdauer bei LP in Jahren	0,09 [0,06-3,80]	0,94 [0,24-3,54]	0,183§
	Liquorpleozytose	33,3 % (5/15) 8,7[6-17,5]	4,6 % (3/65) 6[6-15]	0,005§
	Gesamteiweiß-erhöhung	73,3 % (11/15)	58,5 % (38/65)	0,383§
	Gesamteiweiß in mg/l	826 [450-1270]	537 [414,5-714]	0,0014§
Krankheitsschwere	Isolierte OKB i.L.	13,3 % (2/15)	6,2 % (4/65)	0,313§
	mRS initial	2 [1-2]	2 [1-3]	0,928§
	INCAT Score initial	2 [2-3]	2 [1-3]	0,54§
Therapieansprechen	mRS max.	4 [2-4]	2 [2-4]	0,13§
	Kortikosteroide	50 % (4/8) 1 n.b.	36,7 % (11/30) 3 n.b.	0,69§
	Immunglobuline	83,3 % (10/12)	67,4 % (29/43), 1 n.b.	0,47§
	Plasmapherese (PE)	75 % (3/4)	42,9 % (3/7)	0,55§
	Immunsuppressiva (IS)	50 % (1/2)	27,3 % (3/11)	1,0§
Krankheitsverlauf	andere Immuntherapien (PE od. IS)	66,7 % (4/6)	33,3 % (6/18); 1 n.b.	0,192§
	Verlauf in Jahren	3,09[1,88-7,50]	3,92[1,53-7,01]	0,92§
	mRS letzter Verlauf	2 [1-4]	2 [1-3]	0,48§
	INCAT letzter Verlauf	4 [2-5]	2 [1-4]	0,238§

Tabelle 7: Vergleich der Antikörper positiven und negativen Patienten im Serum

MW±SD; Median[Q1-Q2]; INCAT:Summe aus Armen und Beinen; mRS:Modifizierte Ranking Skala; Liquorpleozytose:ZZ>5/µl; n.b.=nicht bekannt; * t-test; § Fisher's Exact Test, two sided; \$ Mann-Whitney-U-Test, two tailed

3.2.4 Analyse der klinischen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne neuronale/gliale Autoantikörper und einer klinischen CIDP

In einem weiteren Schritt untersuchte ich nun, ob sich diese Unterschiede auch in den klinisch definierten Subgruppen fanden. Zuerst untersuchte ich die chronischen Immunneuropathien. In **Tabelle 8** ist der Vergleich der antikörperpositiven- mit den

negativen CIDP-Patienten (definitiv und wahrscheinlich) im Liquor dargestellt. **Tabelle 9** zeigt den Vergleich nur bezogen auf Patienten mit einer definitiven CIDP. Bei 4 der 17 Patienten mit einer CIDP (definitiv+wahrscheinlich) konnten wir Antikörper im Liquor nachweisen. Dabei waren alle antikörperpositiven Patienten nach den EFNS-Kriterien der Gruppe der definitiven CIDP zugeordnet. Im Hinblick auf das Alter und die Geschlechtszugehörigkeit zeigte sich zwischen den antikörperpositiven- und den antikörpernegativen Patienten kein signifikanter Unterschied. Genau wie bei der Gesamtheit der Patienten mit Antikörpernachweis (siehe Tabelle 6) präsentierte sich die Mehrzahl der antikörperpositiven Patienten mit einem symmetrischen Verteilungsmuster der Beschwerden und einer häufigeren Hirnnervenbeteiligung. Interessant ist jedoch die Tatsache, dass eine autonome Symptomatik häufiger bei den antikörpernegativen Patienten auftrat (siehe Abbildung 3.11). In der ersten Lumbalpunktion im UKSH zeigte sich auch in der CIDP-Kohorte ein höheres Gesamteiweiß bei den Patienten mit Antikörpern. Allerdings fand sich im Vergleich zu der Gesamtheit der Patienten mit Antikörpern im Liquor (siehe Tabelle 6) bei keinem Patienten eine Liquorpleozytose. Im Hinblick auf die Therapie ist ersichtlich, dass die Patienten mit positiven Antikörpernnachweis ein tendenziell besseres Ansprechen auf Kortikosteroide (50 % vs. 31 %) und tendenziell ein besseres Ansprechen auf eine Plasmapherese zeigen (100 % vs. 33 %). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass insgesamt nur wenige Patienten mittels einer Plasmapherese und Immunsuppressiva therapiert wurden. Interessanterweise lässt sich bei der Therapie mit Immunglobulinen kein Unterschied feststellen (75 % vs. 75 %). In beiden Gruppen kam es bei dreiviertel der Patienten zu einer Beschwerdebesserung nach Medikamentengabe (siehe Abbildung 3.12). In Bezug auf den Krankheitsverlauf und der Krankheitsschwere zeigt sich, dass beide Patientengruppen einen ähnlichen Behinderungsgrad während der ersten Präsentation im UKSH aufwiesen (AK pos: INCAT initial:2,5, mRS initial:2; AK neg: INCAT initial:3, mRS initial:2) (siehe Abbildung 3.10), es sich bei den antikörperpositiven Patienten jedoch um einen rascheren Erkrankungsbeginn (Zeit bis zur ersten Lumbalpunktion im UKSH) handelte (2 Monate vs. 26 Monate). Im Verlauf kam es bei den Patienten mit Antikörpernnachweis zu einer deutlichen Verschlechterung der Symptomatik, wohingegen sich bei den negativen Patienten eine Stagnation der Beschwerden zeigte (AK pos: mRS letzter Verlauf:3,5, INCAT letzter Verlauf:7,5; AK neg: mRS letzter Verlauf:2, INCAT letzter Verlauf:2) (siehe Abbildung 3.10).

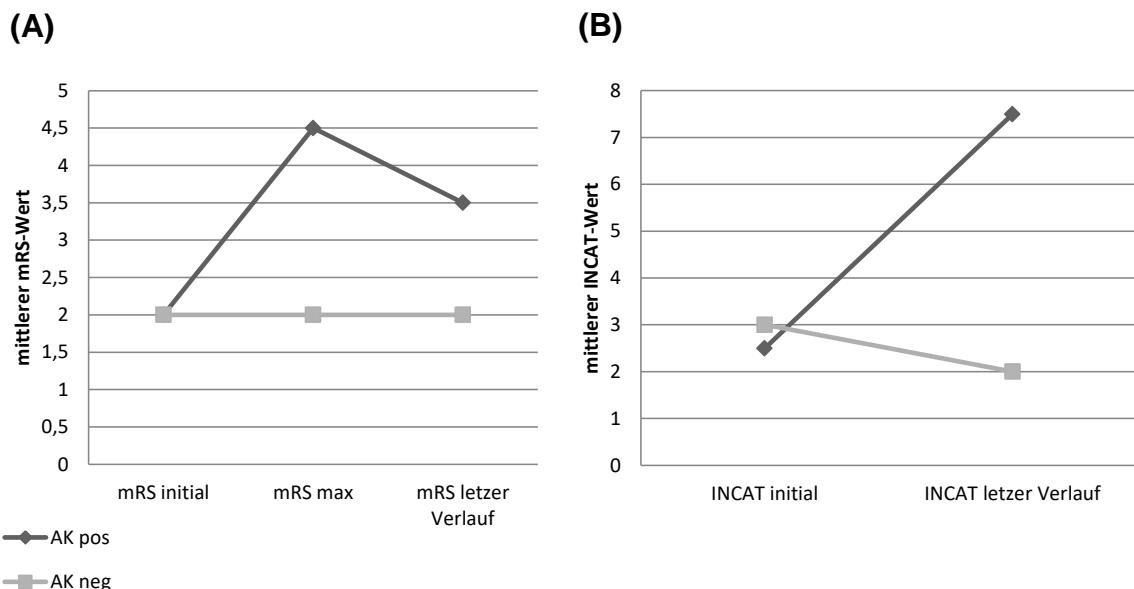


Abbildung 3.10: Krankheitsverlauf der CIDP-Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor
(A):Krankheitsverlauf anhand des mRS-Scores; (B):Krankheitsverlauf anhand des INCAT-Scores

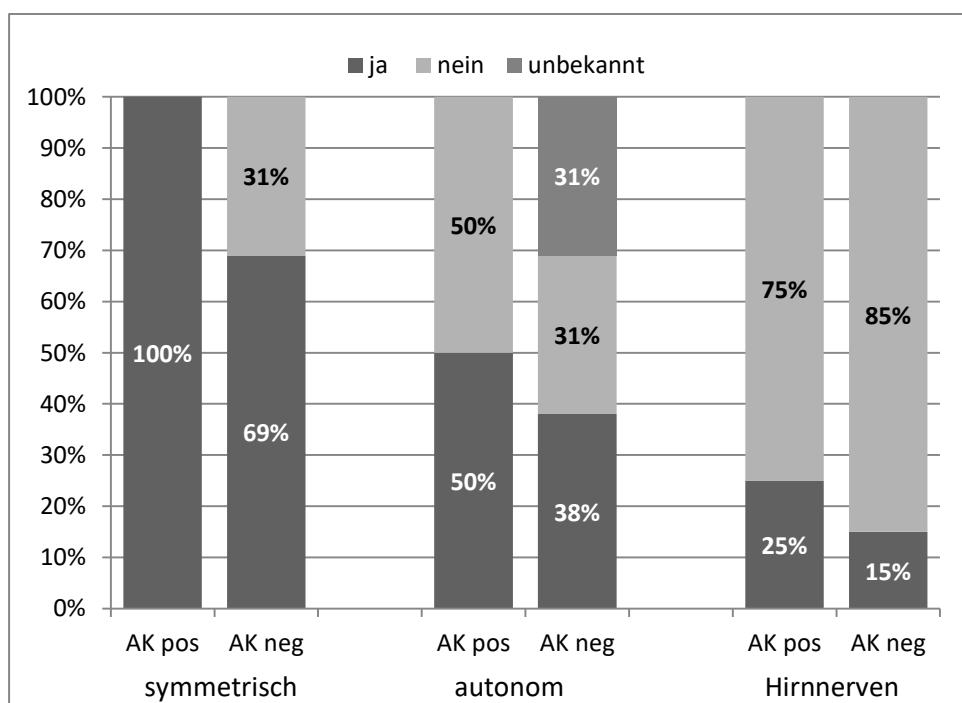


Abbildung 3.11: Symptomatik der CIDP-Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung

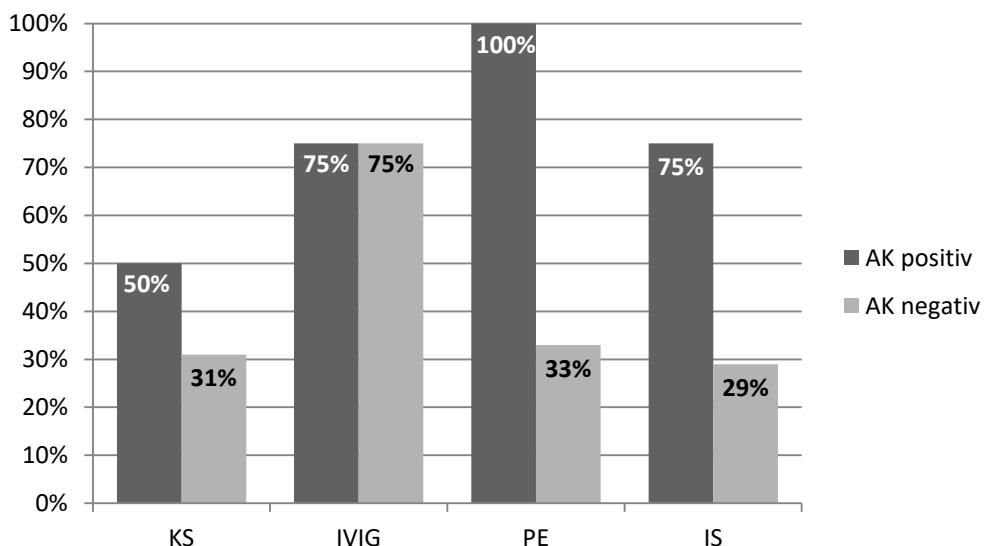


Abbildung 3.12: Therapieansprechen der CIDP-Patienten mit und ohne Antikörper im Liquor
KS=Kortikosteroide; IVIG=Immunglobuline; PE=Plasmapherese; IS=Immunsuppressiva

n		Ak pos	Ak neg	p
		4	13	
Alter		57±7	54±15	0,62*
männlich %		75	54	0,603§
Symptomatik	Symmetrisch	100 % (4/4)	69,2 % (9/13)	0,519§
	Autonom	50 % (2/4)	55,6 % (5/9) 4 n.b.	1§
	Hirnnerven	25 % (1/4)	15,4 % (2/13)	1§
Lumbalpunktion	Erkrankungsdauer bei LP in Jahren	0,17 [0,09-2,91]	2,15 [2,37-0,76]	0,13&
	Liquorpleozytose	0 % (0/4)	0 % (0/13)	1§
	Gesamteiweiß-erhöhung	100 % (4/4)	61,5 % (8/13)	0,261§
	Gesamteiweiß in mg/l	735 [626,75-3269,5]	632 [444,0-846,5]	0,307&
	Isolierte OKB i.L.	0 % (0/3)1 n.b.	7,7 % (1/13)	1§
Krankheitsschwere	INCAT Score initial	2,5 [2-3,75]	3 [1,5-5]	1&
	mRS initial	2 [2-2]	2 [2-3]	0,416&
	mRS max	4,5 [2,5-5]	2 [2-4]	0,2&
Therapieansprechen	Kortikosteroide	50 % (2/4)	30,8 % (4/13)	0,584§
	IVIG	75 % (3/4)	75 % (9/12) 1 n.b.	1§
	Plasmapherese (PE)	100 % (2/2)	33,3 % (1/3)	0,4§
	Immunsuppressiva (IS)	50 % (1/2)	25 % (1/4)	1§
	andere Immuntherapien (PE+IS)	75 % (3/4)	28,6 % (2/7)	0,242§
Krankheitsverlauf	Verlauf in Jahren	1,99 [1,22-5,45]	5,28 [4,2 -8,02]	0,045&
	mRS letzter Verlauf	3,5 [2-5]	2 [1,5-4]	0,228&
	INCAT letzter Verlauf	7,5 [2-10]	2 [1-7]	0,203&

Tabelle 8: Vergleich der AK- positiven und negativen Patienten mit CIDP (definitiv&wahrscheinlich) im Liquor

MW±SD; Median[Q1-Q2]; INCAT:Summe aus Armen und Beinen; mRS:Modifizierte Ranking Skala; Liquorpleozytose:ZZ>5/µl; n.b.=nicht bekannt;* t-test; § Fisher's Exact Test, two sided, & Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

n		Ak pos	Ak neg	p
		4	9	
	Alter	58±6,7	46±11	0,08*
	männlich %	75	44	1§
Symptomatik	Symmetrisch	100 % (4/4)	66,7 % (6/9)	0,49§
	Autonom	50 % (2/4)	37,5 % (3/8) 1.n.b.	1§
	Hirnnerven	25 % (1/4)	22,2 % (2/9)	1§
Lumbalpunktion	Erkrankungsdauer bei LP in Jahren	0,17 [0,09-2,91]	1,32 [0,76-3,80]	0,26&
	Liquorpleozytose	0 % (0/4)	0 % (0/9)	1§
	Gesamteiweiß-erhöhung	100 % (4/4)	66,7 % (6/9)	0,497§
	Gesamteiweiß in mg/l	735 [626,75-3269,5]	644 [393,5-846,5]	0,529&
	Isolierte OKB i.L.	0 % (0/3)1 n.b.	11,1 % (1/9)	1§
Krankheitsschwere	INCAT Score initial	2,5 [2-3,75]	2 [1,5-5,5]	0,965&
	mRS initial	2 [2-2]	2 [2-3,5]	0,587&
	mRS max	4,5 [2,5-5]	2 [2-4]	0,313&
Therapieansprechen	Kortikosteroide	50 % (2/4)	22,2 % (2/9)	0,53§
	IVIG	75 % (3/4)	77,8 % (7/9)	1§
	Plasmapherese	100 % (2/2)	33,3 % (1/3)	0,4§
	Immunsuppressiva (IS)	50 % (1/2)	25 % (1/4)	1§
	andere Immuntherapien (PE+IS)	75 % (3/4)	28,6 % (2/7)	0,24§
Krankheitsverlauf	Verlauf in Jahren	1,99 [1,22-5,45]	5,28 [4,2 -10,68]	0,076&
	mRS letzter Verlauf	3,5 [2-5]	2 [1,5-4]	0,224&
	INCAT letzter Verlauf	7,5 [2-10]	2 [1-8]	0,271&

Tabelle 9: Vergleich der AK-positiven und negativen Patienten mit definitiver CIDP im Liquor

MW±SD; Median[Q1-Q2]; INCAT:Summe aus Armen und Beinen; mRS:Modifizierte Ranking Skala; Liquorpleozytose:ZZ>5/µl; n.b.=nicht bekannt; * t-test; § Fisher's Exact Test, two sided; & Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

3.2.5 Analyse der klinischen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne neuronale/gliale Autoantikörper und einem klinischen GBS oder MFS

In einem nächsten Schritt untersuchte ich nun, ob sich diese Unterschiede auch bei den akuten Immunneuropathien zeigten. **Tabelle 10** stellt die antikörperpositiven den antikörpernegativen Patienten aus der Gruppe der akuten Immunneuropathien gegenüber. In dieser Gruppe konnten bei 5 von 16 Patienten neuronale Antikörper in der Immunhistochemie detektiert werden. Im Hinblick auf das Alter und die

Geschlechtsverteilung fand sich auch hier zwischen den antikörperpositiven- und den antikörpernegativen Patienten kein signifikanter Unterschied. Interessanterweise zeigte sich im Ausbreitungsmuster der Beschwerden kein wesentlicher Unterschied ($p=1$). Bei über dreiviertel der Patienten dominierte eine symmetrische Verteilung der Symptome, wobei diese bei den negativen Patienten sogar noch etwas häufiger vorkam. Über die Hälfte der antikörpernegativen Patienten zeigte eine Mitbeteiligung der Hirnnerven, wohingegen diese nur bei einem Fünftel der Patienten mit Antikörpern auftrat. Eine autonome Symptomatik wurde, genauso wie bei der Gesamtheit der antikörperpositiven Patienten (Tabelle 6), häufiger bei den Patienten mit Antikörpern diagnostiziert (siehe Abbildung 3.13). In der ersten Lumbalpunktion im UKSH sah man bei den antikörperpositiven Patienten im Mittel ein höheres Gesamteiweiß, ein im Verhältnis häufigeres Vorkommen von oligoklonalen Banden, und vor allem das häufigere Auftreten einer milden Liquorpleozytose. Diese wurde bei 3 von 5 Patienten mit-, und lediglich bei 1 von 11 Patienten ohne Antikörper nachgewiesen. Im Hinblick auf die Therapie ist hervorzuheben, dass im Gegensatz zu der Gesamtheit aller antikörperpositiven Patienten (Tabelle 6), Patienten mit Antikörpern ein gleiches bzw. sogar etwas schlechteres Therapieansprechen auf Immunglobuline aufwiesen. Die Behandlung mit anderen immuntherapeutischen Mitteln war in beiden Gruppen relativ gering. Wie auch bei der Gesamtheit der antikörperpositiven Patienten dargestellt (siehe Tabelle 6), zeigt sich der Krankheitsverlauf bei Patienten mit Antikörpern fulminanter, mit einem höheren Behinderungsgrad zum Krankheitshöhepunkt und beim letzten erhobenen Status (siehe Abbildung 3.14). Während Patienten ohne Antikörper mit einer etwas stärkeren Symptomatik im UKSH vorstellig wurden, kam es bei Ihnen im Verlauf im Mittel zu einer Verbesserung der Beschwerden.

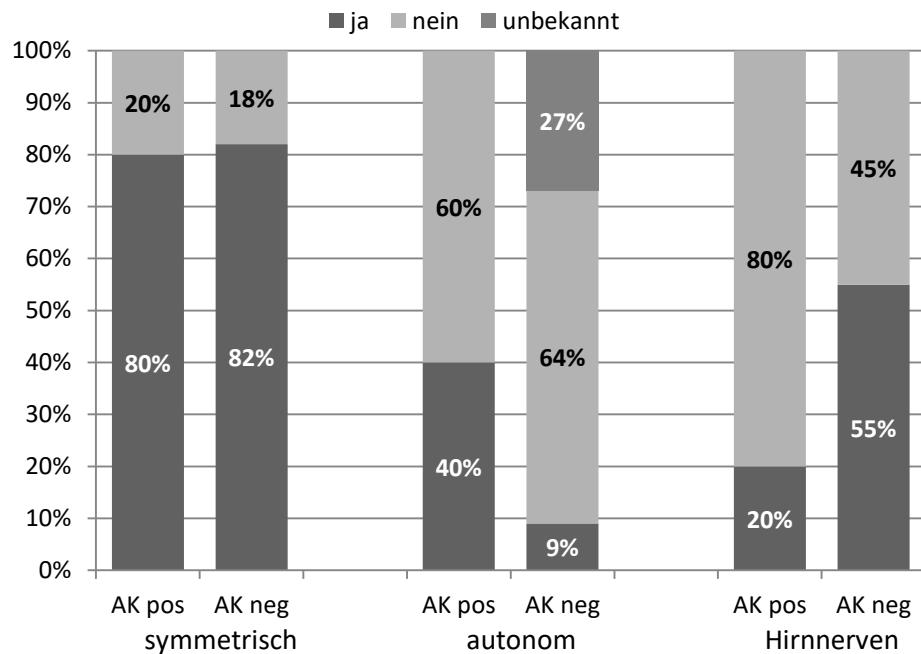


Abbildung 3.13: Symptomatik der Patienten mit akuten Immunneuropathien mit und ohne Antikörper im Liquor bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung

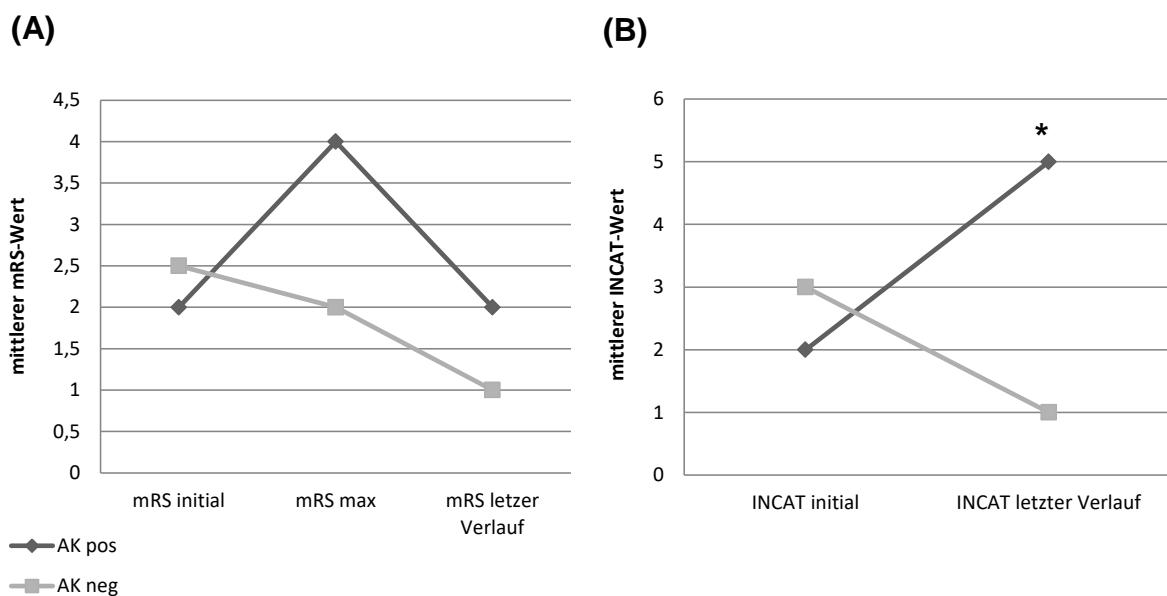


Abbildung 3.14: Krankheitsverlauf der Patienten mit akuten Immunneuropathien mit und ohne Antikörper im Liquor

(A):Krankheitsverlauf anhand des mRS-Scores; (B):Krankheitsverlauf anhand des INCAT-Scores

*p<0,05

n		Ak pos	Ak neg	p
		5	11	
	Alter	58±20	56±20	0,89*
	männlich %	40 (2/5)	45 (5/11)	1§
Symptomatik	Symmetrisch	80,0 % (4/5)	81,8 % (9/11)	1§
	Autonom	60,0 % (3/5)	12,5 % (1/8), 3 n.b.	0,217§
	Hirnnerven	20,0 % (1/5)	54,5 % (6/11)	0,308§
Lumbalpunktion	Erkrankungsdauer bei LP in Jahren	0,03[0,02-0,06]	0,06[0,02-0,26]	0,569\$
	Liquorpleozytose	60,0 % (3/5), 18[6-117]	9,1 % [1/11], 6[6-6]	0,062§
	Gesamteiweiß-erhöhung	80,0 % (4/5)	63,6 % (7/11)	1§
	Gesamteiweiß in mg/l	985[576,5-1130,5]	582[482-798]	0,211\$
	Isolierte OKB i.L.	20,0 % (1/5)	9,1 % (1/11)	1§
Krankheitsschwere	INCAT-Score initial	2[2-5]	3[1-4]	0,952\$
	mRS Beginn	2[1-3]	2,5[1,75-3,25]	0,569\$
	mRS max	4[2-4]	2[1-4]	0,363\$
Therapie	Kortikosteroide	0 % (0/0)	100 % (2/2)	1§
	IVIG	80,0 % (4/5)	90,9 % (10/11)	1§
	Plasmapherese (PE)	100 % (1/1)	100 % (1/1)	1§
	Immunsuppressiva (IS)	0 % (0/0)	100 % (1/1)	1§
	andere Immuntherapie (PE+IS)	100 % (1/1)	100 % (2/2)	1§
Verlauf	Verlauf in Jahren	2,17 [0,37-10,55]	0,92 [0,18-2,19]	0,497\$
	mRS letzter Verlauf	2[1-3,5]	1[1-2]	0,395\$
	INCAT-Score letzter Verlauf	5[2-7]	1[0-3]	0,041\$

Tabelle 10: Vergleich der AK- positiven und negativen Patienten mit akuten Immunneuropathien im Liquor

MW±SD; Median[Q1-Q2]; INCAT:Summe aus Armen und Beinen; mRS:Modifizierte Ranking Skala; Liquorpleozytose:ZZ>5/µl; n.b.=nicht bekannt * t-test; § Fisher's Exact Test, two sided; \$ Mann-Whitney-U-Test, two tailed

3.2.6 Analyse der klinischen Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne neuronale/gliale Autoantikörper und einer vermuteten inflammatorischen oder nicht-inflammatorischen Neuropathie

Als letzten Vergleich untersuchte ich nun, ob auch in der klinisch nicht eindeutig kategorisierbaren Gruppe der Patienten mit anderen inflammatorischen Neuropathien der Nachweis eines neuronalen/glialen Autoantikörpers ähnliche klinische Assoziationen hatte.

Tabelle 11 zeigt die Gegenüberstellung der antikörperpositiven- und negativen Patienten im Liquor aus der Gruppe der AIPN. Bei 3 der 19 Patienten konnten Antikörper nachgewiesen werden. In beiden Gruppen überwog die Anzahl an Männern und die Patienten mit Antikörpern waren im Mittel etwas jünger als Patienten ohne Antikörper (49 vs. 53). Im Hinblick auf die Symptomatik zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in dem Ausbreitungsmuster der Beschwerden. Sowohl bei den antikörperpositiven-, als auch bei den antikörpernegativen Patienten zeigte sich überwiegend eine symmetrische Verteilung. Genauso wie bei der Gesamtheit aller Patienten mit Antikörpern im Liquor (siehe Tabelle 6) war eine autonome Symptomatik bei den antikörperpositiven Patienten tendenziell häufiger vorhanden. Signifikante Unterschiede konnten in Bezug auf die Hirnnervenbeteiligung erhoben werden. Alle Patienten mit Antikörpernachweis wiesen eine Symptomatik der Hirnnerven auf, was lediglich bei 16 Prozent der antikörpernegativen Patienten der Fall war (Abbildung 3.15). Die erste Lumbalpunktion im UKSH zeigte, genau wie bei der Gesamtheit der Patienten mit Antikörpern im Liquor (siehe Tabelle 6), eine Zellzahlerhöhung und ein im Mittel höheres Gesamteiweiß. Bei einem Drittel der antikörperpositiven Patienten fanden sich eine Liquorpleozytose und ein Gesamteiweiß von im Mittel 882 mg/l im Gegensatz zu 466 mg/l bei den Patienten ohne Antikörper. Unterschiede fanden sich auch in Bezug auf die Krankheitsschwere. Bei Patienten mit AIPN und Antikörpernachweis zeigte sich eine schwerere Symptomatik, die im Verlauf jedoch nicht weiter voranschritt (siehe Abbildung 3.16). Im Hinblick auf die Therapie geht hervor, dass die Patienten mit Antikörpern tendenziell ein besseres Ansprechen auf immunmodulatorische Mittel aufwiesen. Bei allen Patienten, die mit Immunglobulinen behandelt wurden, kam es zu einer Symptomverbesserung, während nur die Hälfte der antikörpernegativen Patienten ein positives Ansprechen zeigte. Kortikosteroide führten bei 50 % der Patienten mit Antikörper, jedoch nur bei 36 % der Patienten ohne Antikörper zum Erfolg. Eine Plasmapherese oder andere Immunsuppressiva (IS) als Therapieoption wurde lediglich bei einem (PPH) bzw. bei keinem (IS) der Patienten mit Antikörper und bei 5(PPH) bzw. 9(IS) der Patienten ohne Antikörper durchgeführt. Allerdings zeigt sich auch hier in Bezug auf die Plasmapherese ein tendenziell besseres Therapieansprechen der antikörperpositiven Patienten.

In der Gruppe der Patienten mit klinisch als nicht inflammatorisch eingeschätzten Neuropathien (ANIP) detektierten wir bei 2 der 23 Patienten AK im Liquor und im Serum. Bei beiden Patienten handelte es sich um Männer. Der eine Patient hatte eine hereditäre PNP und war zu Symptombeginn 13 Jahre alt. Genau wie die Gesamtheit aller positiven Patienten (siehe Tabelle 6) präsentierte er sich mit einer symmetrischen Verteilung der Symptome, einem erhöhten Gesamteiweiß im Liquor (2936 mg/l), einem schweren fulminantem Krankheitsverlauf (INCAT initial:3, INCAT Verlauf:10, mRS initial:2, mRS max:5), sowie einem guten Ansprechen auf immunsuppressive Therapien (Kortikosteroide, IVIG). Allerdings zeigte er keine Beteiligung der Hirnnerven und des autonomen Nervensystem und wies eine normale Zellzahl im Liquor auf. Der andere positive Patient war zu Symptombeginn 59 Jahre alt und wurde klinisch als eine PNP eingeschätzt, die wahrscheinlich durch eine alkoholtoxische Genese bedingt war. Im Liquor waren eine Zellzahlerhöhung (17/ μ l) und ein erhöhtes Gesamteiweiß (1813 mg/l) auffällig. Im Gegensatz zu der Gesamtheit der antikörperpositiven Patienten (siehe Tabelle 6) präsentierte er sich mit einer asymmetrischen Verteilung und einem weniger fulminantem Verlauf (INCAT initial:1, INCAT Verlauf:1, mRS initial:1, mRS max:2). Außerdem zeigte sich keine Beteiligung der Hirnnerven und des autonomen Nervensystems. Eine immunmodulatorische Therapie wurde nicht durchgeführt.

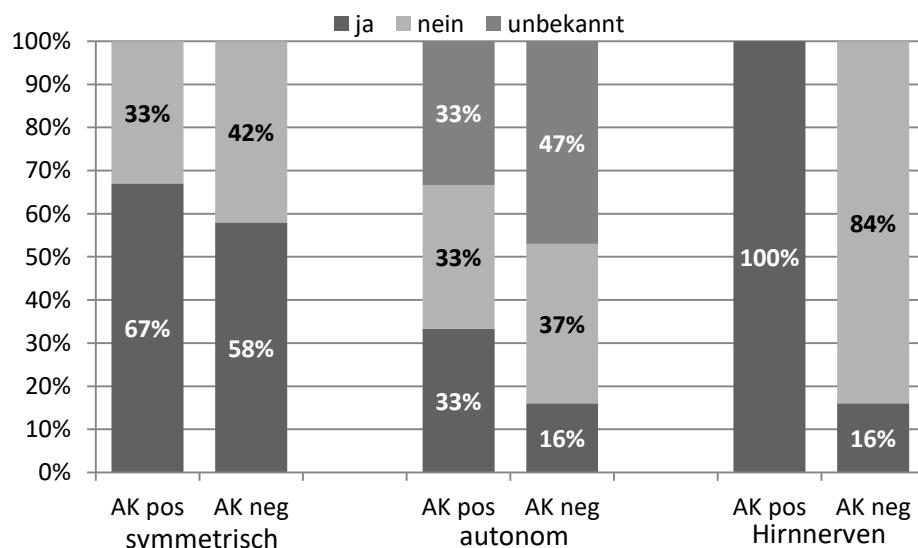


Abbildung 3.15: Symptomatik der Patienten mit anderen inflammatorischen Polyneuropathien mit und ohne Antikörper im Liquor bezüglich Symmetrie der Beschwerden, Vorhandensein von autonomen Beschwerden und Hirnnervenbeteiligung

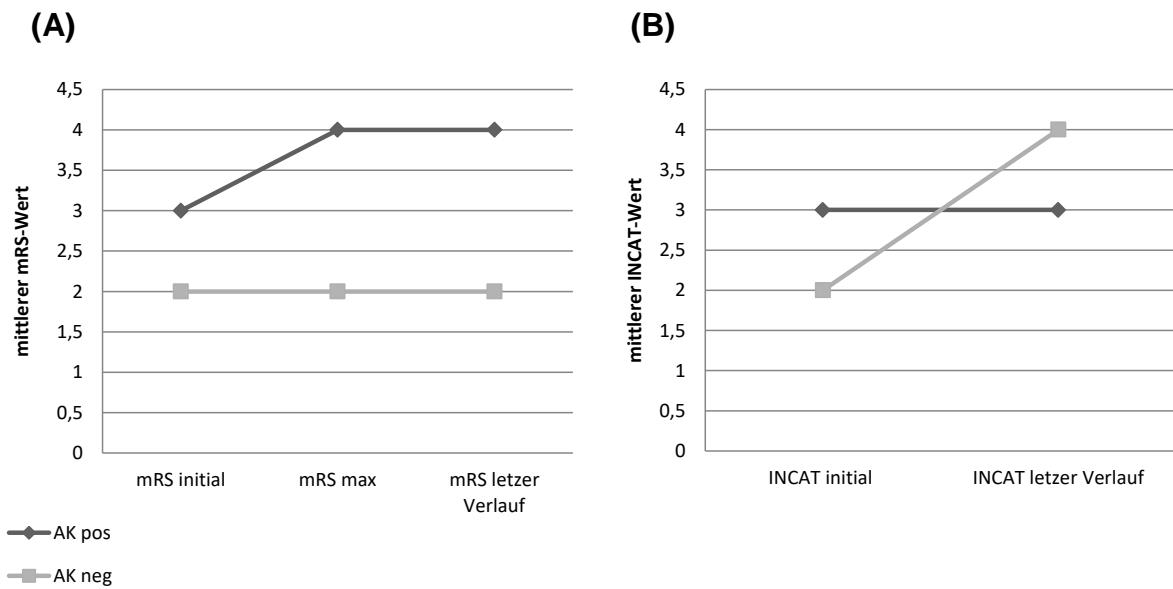


Abbildung 3.16: Krankheitsverlauf der Patienten mit anderen inflammatorischen PNP mit und ohne Antikörper im Liquor

(A):Krankheitsverlauf anhand des mRS-Scores; (B):Krankheitsverlauf anhand des INCAT-Scores

		AK pos	AK neg	p
	n	3	19	
	Alter	49±11	53±14	0,31*
	männlich %	67	63	1§
Symptomatik	Symmetrisch	66,7 % (2/3)	57,9 % (11/19)	1§
	Autonom	50 % (1/2) 1.n.b.	25 % 3/12, 7 n.b.	0,505§
	Hirnnerven	100 % (3/3)	15,8 % (3/19)	0,013§
Lumbalpunktion	Erkrankungsdauer bei LP in Jahren	0,08 [0,01-1,50]	0,89 [0,17-1,75]	0,65&
	Liquorpleozytose	33,3 % (1/3), 6[6-6]	15,8 % (3/19), 8,7[6-15]	0,47§
	Gesamteiweiß-erhöhung	66,7 % (2/3)	47,4 % (9/19)	1§
	Gesamteiweiß in mg/l	882 [236-980]	466 [370-669]	0,586&
	Isolierte OKB i.L.	0 % (0/3)	10,5 % (2/19)	1§
Krankheitsschwere	INCAT Score initial	3 [2-5]	2 [2-3]	0,416&
	mRS Beginn	3 [1-4]	2 [1-3]	0,533&
	mRS max.	4 [2-4]	2 [2-4]	0,634&
Therapie	Kortikosteroide	50 % (1/2)	36,4 % (4/11)	1§
	IVIG	100 % (2/2)	50 % (6/12)	0,473§
	Plasmapherese (PE)	100 % (1/1)	25 % (1/4)	0,4§
	Immunsuppressiva (IS)	0 % (0/0)	20 % (1/5), 1 n.b.	1§
	andere Immuntherapien (PE+IS)	100 % (1/1)	22,2 % (2/9)	0,3§
Verlauf	Verlauf in Jahren	3,09 [0,17-5,89]	3,92 [2,30-6,58]	0,532&
	mRS letzter Verlauf	4 [1-4]	2 [2-4]	0,827&
	INCAT letzter Verlauf	3 [2-4]	4 [2-6]	0,75&

Tabelle 11: Vergleich der Ak-positiven mit negativen Patienten mit AIDP im Liquor

MW±SD; Median[Q1-Q2]; INCAT:Summe aus Armen und Beinen; mRS:Modifizierte Ranking Skala; Liquorpleozytose:ZZ>5/µl;n.b.=nicht bekannt * t-test; § Fisher's Exact Test, two sided; & Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

3.3 Analyse der neuronalen/glialen Autoantikörper auf die Reaktivität mit bekannten juxtaparanodalen Antigenen

Im letzten Abschnitt widmete ich mich der Frage, ob sich die im Screeningtest identifizierten glialen/neuronalen Autoantikörper gegen bekannte juxtaparanodale Antigene richteten. Hierfür wurden zusammen mit unserem Kooperationspartner der Uniklinik Wien in einer Subgruppe bei 12 im Screeningtest positiven Liquores und 11 positiven Seren mittels indirekter Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen auf Neurofascin-155 und Contactin-1 Antikörper getestet. Außerdem wurden 4 im Screeningtest negative Liquores und 3 negative Seren getestet, welche ein negatives Ergebnis auf den transfizierten HEK-Zellen zeigten. Bei einem Patienten aus der Gruppe der definitiven CIDP konnten Antikörper gegen Neurofascin-155 im Liquor und im Serum nachgewiesen werden, bei keinem Patienten fanden sich Contactin-1 Antikörper. Ein weiterer Patient mit einer definitiven CIDP, IgM-MAG-Antikörpern und einem Paraprotein Typ IgM-Kappa im Serum wies ein anderes auffälliges Muster in der Immunhistochemie auf, woraufhin wir seine Liquor- und Serumproben mittels Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen auf HNK-1 Antikörper (Human natural killer-1) testen ließen. Dies erfolgte in Kooperation mit Prof. Francesc Graus und Dr. Lidia Sabater am IDIBAPS in Barcelona. Dabei konnten Antikörper gegen das neuronale Protein Human Natural Killer-1 (HNK-1) im Liquor und im Serum nachgewiesen werden, welches bisher nur bei Enzephalitiden beobachtet wurde (nicht-publizierte Kommunikation Francesc Graus).

Insgesamt fanden sich damit bei 2 von 14 Patienten mit positivem Screeningtest im Liquor und 2 von 15 Patienten mit positivem Screeningtest im Serum bekannte Zielantigene im Liquor und im Serum (siehe Abbildung 3.17).

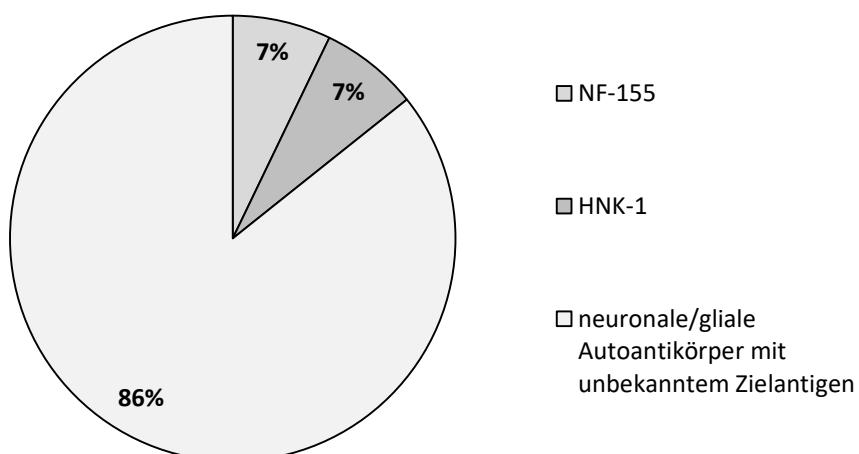


Abbildung 3.17: Verteilung der hippocampalen Antikörper im Liquor und im Serum
Bekannte neuronale Antikörper bezogen auf alle Patienten mit hippocampalen Antikörpern in der Immunhistochemie

3.4 Beschreibung der beiden Patienten mit Antikörpern gegen NF-155 und HNK-1

Tabelle 12 stellt die Symptomatik, die erste Lumbalpunktion im UKSH, die Krankheitsschwere und den Krankheitsverlauf, sowie das Therapieansprechen des Patienten mit Neurofascin-155 Antikörpernachweis und des Patienten mit HNK-1 Antikörpernachweis dar. Bei beiden Patienten handelte es sich um Männer aus der Gruppe der definitiven CIDP.

Der Neurofascin-155 positive Patient war zu Symptombeginn 63 Jahre alt und stellte sich mit einer symmetrisch verteilten Symptomatik vor, die sich subakut innerhalb von 3 Monaten entwickelte. Der initiale mRS-Score lag bei 2 und der INCAT-Score ergab bei Beteiligung von Armen (2) und Beinen (1) ein Wert von 3. Die erste Lumbalpunktion im UKSH zeigte sich im Hinblick auf eine Zellzahlerhöhung und dem Auftreten von isolierten oligoklonalen Banden unauffällig. Allerdings lag das Gesamteiweiß mit 621 mg/l über dem Normbereich. Im Verlauf kam es zu einer rasch progredienten Verschlechterung der Symptomatik mit Aufenthalt auf der Intensivstation. Zum Höhepunkt der Krankheit zeigte sich eine komplette Tetraplegie bis zum Locked-in-Syndrom mit Beatmungspflichtigkeit, Beteiligung aller Hirnnerven und schweren autonomen Störungen im Sinne von ausgeprägten Blutdruckschwankungen (mRS max:5). Therapieversuche mit Immunglobulinen, Glukokortikoiden und Immunsuppression (Abatacept) zeigten keine wesentliche Symptomverbesserungen. Lediglich durch eine Plasmapherese konnte eine kurzfristige Besserung erreicht werden. Auch beim letzten von uns erhobenen Status lag keine wesentliche Besserung seiner Symptomatik vor. Der INCAT- und mRS-Wert war maximal hoch bei einem Wert von 10 bzw. 5.

Bei dem Patienten mit HNK-1 Antikörpernachweis handelte es sich um einen bei Symptombeginn 56 Jahre alten Mann. Auch er präsentierte sich mit einem symmetrischen Ausbreitungsmuster mit autonomer Beteiligung, jedoch ohne Hirnnervenbefall. Die Diagnosestellung und erste Lumbalpunktion erfolgte in einem anderen Krankenhaus, sodass die Erkrankungsdauer bis zur ersten Lumbalpunktion im UKSH fast 4 Jahre betrug. Im Liquor fand sich auch bei diesem Patienten ein erhöhtes Gesamteiweiß von 826 mg/l ohne den Befund einer Liquorpleozytose oder isolierten oligoklonalen Banden. Es erfolgte eine Therapie mit Kortikosteroiden und Immunglobulinen. Bei deutlicher Symptomverbesserung durch Immunglobuline, ist das Ansprechen auf Kortikosteroide nicht eruierbar. Der Krankheitsverlauf zeigte sich im Gegensatz zu dem Neurofascin-155 positiven Patienten weniger fulminant und progredient. Der initiale mRS-Wert lag bei 2 und blieb zum Höhepunkt der Krankheit, sowie beim letzten erhobenen Status konstant. In Bezug auf den INCAT Score zeigte sich initial bei Beteiligung von Armen (2) und Beinen (2)

ein Wert von 4, mit leichter Verschlechterung der Symptomatik der Beine im Verlauf (INCAT Beine Verlauf:3).

		NF-155 Antikörper	HNK-1 Antikörper
Gruppe		definitive CIDP	definitive CIDP
Alter		63	56
Geschlecht		männlich	männlich
Sympot- matik	Symmetrisch	ja	ja
	Autonom	ja	ja
	Hirnnerven	ja	nein
Lumbalpunktion	Erkrankungsdauer bei LP in Jahren	0,25	3,8
	Liquorpleozytose	nein	nein
	Gesamteiweiß- erhöhung	ja	ja
	Gesamteiweiß in mg/l	621	826
	Isolierte OKB i.L.	nein	nein
Krankheits- schwere	INCAT Score initial	3	4
	mRS initial	2	2
	mRS max	5	2
Therapieansprechen	Kortikosteroide	Behandlung, keine Besserung	Behandlung, Ansprechen unbekannt
	IVIG	Behandlung, keine Besserung	Behandlung, Besserung
	Plasmapherese	Behandlung, Besserung	keine Behandlung
	Immunsuppressiva	Behandlung, keine Besserung	keine Behandlung
Krankheitsverlauf	Verlauf in Jahren	1	6,56
	mRS letzter Verlauf	5	2
	INCAT letzter Verlauf	10	5

Tabelle 12: Beschreibung der beiden Patienten mit bekannten Zielantigenen

3.5 Weitere Teilcharakterisierung der neuronalen/glialen Autoantikörper mit unbekanntem Zielantigen

Als letztes untersuchte ich zur Hypothesengenerierung, ob die im Screeningtest reaktiven Seren/Liquores mit der Oberfläche von hippocampalen Neuronen reagierten. In diesem Test negative Seren/Liquores beinhalten vermutlich Autoantikörper gerichtet gegen intrazelluläre Antigene oder gegen gliale Oberflächenantigene. Auch diese Untersuchung erfolgte in Kooperation mit dem Kooperationspartner in der Uniklinik in Wien. Es wurden von den je 26 positiven Liquor- und Serumproben jeweils vier mit einem suggestiv imponierenden immunhistochemischen Muster mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung nicht-permeabilisierter, vitaler embryonaler, hippocampaler Primärkulturneurone untersucht. Von diesen 8 Proben von 3 Patienten zeigten alle eine neuronale Oberflächenfärbung an. Bei einem der positiv Getesteten handelte es sich um den Patienten mit einer definitiven CIDP und HNK-1 Antikörpernachweis. Die anderen Proben stammten von einem anderen Patienten mit einer definitiven CIDP und von einem Patienten mit einer akuten Immunneuropathie. Abbildung 3.18 demonstriert die prozentuale Verteilung der Antikörper von allen Patienten, bei denen hippocampale Antikörper im Liquor/Serum nachgewiesen werden konnten. Von den insgesamt 81 Patienten konnten bei 14 (Liquor) bzw. 15 (Serum) Patienten Antikörper durch die sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen detektiert werden. Dabei handelte es sich bei mindestens 2 der positiv getesteten Patienten um bekannte Antikörper (Neurofascin-155, HNK-1) und bei mindestens 2 Patienten um andere neuronale Oberflächenantikörper. Die übrigen 10 Patienten (Liquor) bzw. 11 (Serum) detektieren daher vermutlich entweder gliale Oberflächenantikörper oder Antikörper gerichtet gegen intrazelluläre Antigene, die beide mit der in diesem Abschnitt verwendeten Methode nicht erfasst werden.

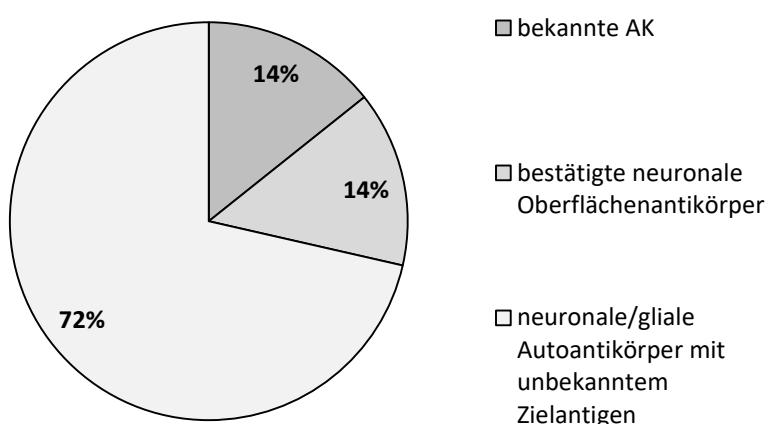


Abbildung 3.18: Vergleich aller Patienten mit hippocampalen Antikörpern im Liquor und Serum.

4 Diskussion

In dieser Arbeit haben wir uns die Tatsache zunutze gemacht, dass sich bekannte und unbekannte paranodale und juxtaparanodale Antikörper aufgrund ähnlicher molekularer Bausteine des ZNS und PNS gut mittels sekundärer Immunhistochemie auf Rattenhirnen darstellen lassen, (klinische Beobachtung PD Dr. Frank Leypoldt) und dieses Verfahren als Screeningmethode angewandt. Die indirekte Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen und die indirekte Immunfluoreszenz auf embryonalen Primärkulturneuronen ermöglichte die weitere spezifischere Zuordnung der Autoantikörper.

Wir beobachteten, dass erstens neuronale/gliale Antikörper signifikant häufiger bei Patienten mit einer CIDP, akuten Immunneuropathien und Patienten mit anderen inflammatorischen PNP im Vergleich zu der Kontrollgruppe im Screeningtest vorkommen. Zweitens konnte ich nachweisen, dass ein Teil der antikörperpositiven Patienten Immunreaktionen gegen bekannte paranodale und neuronale Antigene aufweisen, jedoch die Mehrheit meiner Patienten Antikörper gegen unbekannte Zielantigene hatten. Bei einem Patienten mit einer definitiven CIDP fanden sich Neurofascin-155 Antikörper und bei einem anderen HNK-1 Antikörper im Liquor und Serum. Die Seren und Liquores von 2 weiteren Patienten mit einer definitiven CIDP und einer akuten Immunneuropathie reagierten mit der Oberfläche von hippocampalen Neuronen. Drittens zeigen meine Daten, dass Patienten mit neuronalen/glialen Autoantikörpern unabhängig vom Zielantigen und von der klinischen Klassifikation rascher und schwerer erkrankten, stärkere Liquorveränderungen aufwiesen, tendenziell besser auf Steroide, Plasmapherese und Immunglobuline ansprachen und sich im Verlauf schlechter erholten als Patienten ohne Antikörper.

4.1 Neuronale/gliale Autoantikörpern bei Immunneuropathien

Mittels sekundärer Immunhistochemie auf Rattenhirnen als Screeningmethode konnten wir bei 4 von 17 (24 %) der CIDP-Patienten (im Liquor und Serum) bzw. 4 von 13 (30 %) der definitiven CIDP-Patienten, bei 5 von 16 (31 %, Liquor) bzw. bei 4 von 15 (27 %, Serum) der Patienten mit akuten Immunneuropathien, bei 3 von 22 (14 %, Liquor) bzw. 5 von 22 (23 %, Serum) der Patienten mit AIP und bei 2 von 23 (9 %, Liquor und Serum) der Patienten mit ANIP neuronale/gliale Antikörper detektieren. In der Gruppe der Patienten mit einer MMN und in der Kontrollgruppe mit anderen neurologischen Erkrankungen fanden sich keine Auffälligkeiten in der immunhistochemischen Färbung. Unsere Daten zeigen, dass neuronale/gliale Autoantikörper signifikant häufiger bei Patienten mit CIDP, akuten Immunneuropathien (GBS+MFS) und anderen inflammatorischen Neuropathien (nicht klassifizierbare Immunneuropathien, andere entzündliche Neuropathien) im Vergleich zu Kontrollpatienten ohne polyneuropathische Erkrankungen auftreten.

Die Evidenz von nodalen, paranodalen und juxtaparanodalen Autoantikörpern bei Immunneuropathien, wie dem GBS oder der CIDP, konnte bereits in vorherigen Studien

mittels unterschiedlicher Methodik gezeigt werden und untermauert unsere Ergebnisse. Allerdings wurden in den meisten Fällen nur die Seren und nicht wie in unserer Studie auch der Liquor der Patienten untersucht. Es hat sich jedoch gezeigt, dass bei fast allen Patienten, bei denen wir AK im Serum nachweisen konnten, auch AK im Liquor vorhanden waren. Lediglich bei zwei Patienten fanden sich ausschließlich Antikörper im Serum. Aufgrund dieser Tatsache gehen wir davon aus, dass die Antikörper sowohl im Serum, als auch im Liquor vorhanden sind. Devaux et al. untersuchten das Vorhandensein von nodalen und paranodalen Antikörpern im Serum bei Patienten mit einer CIDP (n=50) oder einem GBS (n=100 (AMAN n=50; AIDP n=50)), indem sie eine immunzytochemische Färbung von Maus-Ischiasnerven als Screeningmethode verwendeten. Sie beobachteten, dass 30 % der CIDP-Patienten und 43 % der GBS-Patienten eine IgG-Fixation an der paranodalen oder nodalen Zone zeigten. Als Zielantigene identifizierten sie mittels indirekter Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen bei 8 der 58 Patienten mit einer IgG-Fixation Neurofascin-186, Gliomedin oder Contactin. In einer weiteren Studie, die die gleiche Technik anwendete, zeigte das Serum von 2 von 7 Patienten mit einer kombinierten zentralen und peripheren Demyelination (CCPD) eine nodale und paranodale Färbung und das Serum von 4 von 16 Patienten mit einer CIDP eine diffuse Färbung des gesamten Ranzierschen Schnürrings auf Nager-Ischiasnerven. Mittels NF-155 transfizierten HEK-Zellen, konnten bei 5 der 7 CCPD-Patienten anti-Neurofascin-155 AK detektiert werden, jedoch bei keinem der CIDP-Patienten (Kawamura et al., 2013). Auch Mathey et. al., die bei jeweils 3 von 44 (7 %) CIDP-Patienten Antikörper gegen NF-155 und CNTN-1 mittels ELISA detektieren, zeigten, dass die Seren dieser Patienten an die paranodale Region von Nervenfasern banden (Mathey et al., 2017). Patienten mit einer MMN reagierten nicht auf peripheren Nerven, was den negativen Befund unserer MMN-Patienten in der Immunhistochemie unterstützt. Querol et al. verwendeten hippocampale Neurone, die Proteine des axoglialen Übergangs exprimieren, als Screeningmethode für axonale Antigene und berichteten, dass 4 Seren von insgesamt 46 CIDP-Patienten (8,6 %) mit den hippocampalen Neuronen reagierten und außerdem eine Reaktion auf die paranodale Region auf Rattenischiasnerven zeigten. Als Zielantigene identifizierten sie bei 2 der Patienten CNTN-1 und bei einem den Komplex aus CNTN-1 und CASPR-1 (Querol et al., 2013). Dieselbe Gruppe detektierte in einer weiteren Studie mittels ELISA und Immunzytochemie auf transfizierten HEK-Zellen bei 4 CIDP-Patienten IgG4-Antikörper gegen NF-155, welche alle eine paranodale Färbung auf Nervenfasern zeigten, sowie mit dem Neuropil von Rattenhirnen reagierten (Querol et al., 2014).

4.2 Bekannte Antigene

Bei 2 der 14 (14 %, Liquor) bzw. 2 der 15 (13 %, Serum) im Screeningtest positiven Patienten konnten wir Antikörper gegen bekannte Antigene (NF-155, HNK-1) mittels

indirekter Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen nachweisen, wobei beide Patienten aus der Gruppe der definitiven CIDP stammten. Antikörper gegen CNTN-1 konnten wir bei keinem der positiven Patienten detektieren.

Bei dem NF-155 positiven Patienten handelte es sich um einen 63 Jahre alten männlichen Patienten, dessen klinisches Bild durch einen schweren progredienten Krankheitsverlauf mit einer symmetrischen Verteilung der Symptomatik, einer autonomen Beteiligung, sowie einer Beteiligung der Hirnnerven charakterisiert war. Im Liquor war ein mit 621 mg/l mäßig erhöhtes Gesamteiweiß auffällig. Eine kurzfristige Besserung der Symptomatik konnte lediglich mit einer Plasmapherese erreicht werden, eine Therapie mit Kortikosteroiden und IVIg blieb ohne Erfolg. Der HNK-1 positive Patient war ebenso männlichen Geschlechts und zu Symptombeginn 56 Jahre alt. Das klinische Bild war gekennzeichnet durch ein symmetrisches Ausbreitungsmuster mit Befall des autonomen Nervensystems und im Liquor war lediglich das Gesamteiweiß moderat erhöht. Im Vergleich zu dem NF-155 positiven Patienten verlief die Erkrankung weniger fulminant und progredient und der Patient zeigte ein gutes Ansprechen auf Immunglobuline.

Während die Evidenz von Neurofascin-155 und CNTN-1 Antikörpern bereits in mehreren vorherigen Studien beschrieben worden ist, wurden Antikörper gegen das neuronale Protein Human Natural Killer-1 bisher nur bei Enzephalitiden beobachtet (nicht-publizierte Kommunikation Francesc Graus). Unsere Daten ergeben, dass mindestens 6 % (1 von 17) der Patienten mit einer CIDP (definitiv+wahrscheinlich) bzw. 8 % (1 von 13) mit einer definitiven CIDP Antikörper gegen NF-155 im Liquor und Serum aufweisen, jedoch keiner gegen CNTN-1. Die Prävalenz der anti-NF-155 Antikörper ist vergleichbar mit 2 Studien, bei denen bei 3 von 44 (7 %) (Mathey et al., 2017) und 38 von 533 (7 %) (Devaux et al., 2016) CIDP-Patienten solche Antikörper nachgewiesen wurden und etwas häufiger als bei 3 anderen Studien mit einer Antikörperprävalenz von 5 % (6/119, (Ng et al., 2012) und 4 % (2/53 (Querol et al., 2014) (9/246, (Delmont et al., 2017)). In einer Studie mit ähnlich kleiner Fallzahl wie in unserer Arbeit konnten bei keinem der 16 CIDP-Patienten NF-155 Antikörper detektiert werden (Kawamura et al., 2013). Höhere Prävalenzen berichteten Ogata et al., die bei 9 von 50 (18 %) der CIDP-Patienten und bei einem von 26 (4 %) der GBS-Patienten NF-155 Antikörper nachwiesen (Ogata et al., 2015). Auch eine kürzlich erschienene Studie beschreibt eine NF-155 Prävalenz von 10 % (4 von 40) der CIDP-Patienten (Burnor et al., 2018). Die Häufigkeit für Antikörper gegen CNTN-1 wird in der Literatur zwischen weniger als 1 % (Delmont et al., 2017; Koike et al., 2017) und bis zu 7,5 % (Doppler et al., 2015b) bei Patienten mit einer CIDP angegeben. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass bei der Detektion der Antikörper nicht mit denselben methodischen Mitteln gearbeitet wurden. Außerdem können Divergenzen zwischen den verschiedenen Literaturangaben und unserer Daten dadurch erklärt werden, dass sich die

Fallzahlen teilweise stark unterscheiden, die Unterteilung der Patienten in die verschiedenen Subgruppen der Immunneuropathien eine Schwierigkeit darstellt und nicht alle unsere Patienten mit positiven Screeningtest auf diese Autoantikörper getestet wurden.

4.3 Klinische Korrelation

Patienten mit positiven Screeningtest zeigen ein spezifisches klinisches Bild, welches mit einem schnelleren fulminanteren Krankheitsbeginn, einem schwereren Krankheitsverlauf, einer Zellzahlerhöhung und höherem Gesamteiweiß im Liquor, sowie einem tendenziell besserem Ansprechen auf antikörperorientierte Therapien im Vergleich zu den antikörpernegativen Patienten assoziiert ist. Vor allem unter einer Therapie mit IVIG (10/12, 83 %) und Plasmapherese (4/4, 100 %) kam es bei der Mehrzahl der Patienten zu einer Verbesserung der Symptome, während Kortikosteroide teilweise (57 %, 4/7), jedoch häufiger als in der antikörpernegativen Gruppe wirksam waren (35 %, 11/31). Werden die klinischen Assoziationen in den einzelnen Subgruppen betrachtet, zeigen sich in Bezug auf den Krankheitsverlauf und dem erhöhten Gesamteiweiß im Liquor ähnliche Unterschiede. Allerdings gibt es Abweichungen im Hinblick auf das Therapieansprechen und einer Liquorpleozytose. Während Patienten mit AIP und positiven Antikörperscreening ein besseres Therapieansprechen durch Immunglobuline zeigen als antikörpernegative Patienten (100 % vs. 50 %), gibt es innerhalb der CIDP-Patienten keinen Unterschied (75 % vs. 75 %). Patienten mit einer akuten Immunneuropathie und negativen Antikörpernachweis zeigen sogar ein etwas besseres Ansprechen im Vergleich zu den antikörperpositiven Patienten (90 % vs. 80 %). Trotzdem zeigt sich, dass Immunglobuline bei der Mehrzahl der Patienten tendenziell zu einer subjektiven Verbesserung der Symptomatik führen. Eine Liquorpleozytose findet sich häufiger in der antikörperpositiven Gruppe der akuten Immunneuropathien und den AIP, wohingegen keiner der CIDP-Patienten eine Zellzahlerhöhung aufweist. Der schwerere Krankheitsverlauf, sowie das erhöhte Eiweiß im Liquor stehen in Einklang mit anderen Beobachtungen aus der Literatur. Allerdings zeigt sich ein Widerspruch in Bezug auf das gute Ansprechen der Patienten auf Immunglobuline. In vielen Studien wird berichtet, dass Patienten mit bspw. Antikörpern gegen NF-155 oder Contactin-1 keine bzw. nur eine moderate Verbesserung der Symptomatik durch Immunglobuline erreichen (Burnor et al., 2018; Devaux et al., 2016; Miura et al., 2015; Ogata et al., 2015; Querol et al., 2013, 2014).

Im Hinblick auf die klinische Charakteristik der Patienten mit NF-155 Antikörpern, teilt unser NF-155 positive Patient ein ähnliches Bild mit vorher beschriebenen Patienten. Die Erkrankung nimmt häufig einen schweren und subakuten Verlauf, die Patienten zeigen ein schlechtes Ansprechen auf Immunglobuline, und haben ein erhöhtes Eiweiß im Liquor (Burnor et al., 2018; Devaux et al., 2016; Querol et al., 2014). Außerdem zeigt eine Studie, dass die Patienten, genau wie unser NF-155 Patient, von einer Therapie mit

Plasmapherese profitieren (Ng et al., 2012). In anderen Arbeiten wurde die Assoziation von NF-155 positiven Patienten mit einem Tremor ((Devaux et al., 2016; Ogata et al., 2015; Querol et al., 2014), und einem jüngeren Alter zu Symptombeginn (Devaux et al., 2016; Ogata et al., 2015) beschrieben, was bei unserem Patienten jedoch nicht der Fall war.

4.4 Limitationen der Arbeit

Die Fallzahlen dieser Studie sind mit 81 Patienten und 40 Kontrollpatienten relativ gering. Trotzdem können wir zeigen, dass Autoantikörper signifikant häufiger bei Patienten mit einer CIDP, akuten Immunneuropathien und anderen inflammatorischen PNP im Vergleich zu Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen auftreten. Problematisch gestaltet sich jedoch der klinische Vergleich innerhalb der verschiedenen Subgruppen, da aufgrund der kleinen Fallzahlen nur eine niedrige Trennschärfe (Power) vorhanden ist und deswegen lediglich von Tendenzen gesprochen werden kann. Eine größere Fallzahl ist nötig um signifikante klinische Assoziationen herzustellen und beurteilen zu können.

Eine weitere Limitation stellt die klinische Datenerhebung, sowie die klinische Kategorisierung der Patienten dar. Der retrospektive Charakter der Studie machte es teilweise schwierig objektive Daten zu erfassen und diese anschließend miteinander zu vergleichen. Beispielsweise wurden die Patienten durch verschiedene Ärzte betreut und untersucht, weswegen eine subjektive Komponente in der Diagnostik/klinischen Einschätzung und der Beurteilung des Therapieansprechens nicht auszuschließen ist. Des Weiteren erfolgten die Lumbalpunktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, da einige Patienten zunächst in anderen Krankenhäusern vorstellig wurden. Der Vergleich und die Beurteilung des Therapieansprechens wurden aufgrund der Tatsache erschwert, dass nicht alle Patienten mit den gleichen Therapien behandelt, oder mehrere Medikamente parallel eingesetzt wurden. Auch die Unterteilung der Patienten in die verschiedenen Subgruppen stellte eine Schwierigkeit dar. Bei der klinischen Kategorisierung handelt es sich letztlich um ein klassifikatorisches System mit einer gewissen Unschärfe. Beispielsweise kann sich eine CIDP anfangs wie ein GBS präsentieren und erst der Verlauf der Erkrankung über einen längeren Zeitraum zu einer Reklassifikation in eine CIDP führen. Um die Patienten dennoch möglichst in definierte Gruppen zu gliedern, haben wir uns streng an die EFNS-Kriterien gehalten und die Gruppe der CIDP-Patienten weiter in Subgruppen unterteilt (definitive oder wahrscheinliche CIDP).

Für das Screening auf bekannte Antikörper und Antikörper gegen bislang unbekannte Antigene im Liquor und Serum nutzen wir die sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen. Dabei handelt es sich bei der Beurteilung auf Antikörperpositivität um kein rein objektives Verfahren. Für die Verifizierung der Ergebnisse haben wir jedoch alle Proben mit nicht eindeutigem Resultat ein zweites Mal getestet und anhand dessen eine Aussage über das Vorhandensein von neuronalen/glialen Antikörpern getroffen. Für die

weitere Charakterisierung der Antikörper schickten wir alle Proben mit ausreichend vorhandenem Material an unseren Kooperationspartner der Universität Wien. Von den je 26 im Screeningtest positiven Liquor- und Serumproben wurden 12 positive Liquores und 11 positive Seren mittels indirekter Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen auf NF-155 und Contactin-1 untersucht, wobei bei einem Patienten NF-155 Antikörper im Liquor und Serum detektiert werden konnte. Eine Limitierung unserer Ergebnisse stellt die Tatsache dar, dass aufgrund von ungenügend Liquor- und Serummaterial nicht alle im Screeningtest positiven Proben mittels indirekter Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen auf NF-155 und CNTN-1 getestet werden konnten. Es bleibt unklar, ob diese Antikörper bei den nicht untersuchten Patienten eine Rolle spielen. Außerdem konnten aufgrund des Materialmangels nicht alle positiven Proben mittels indirekter Immunfluoreszenz auf embryonalen Primärkulturen für die Bestätigung von neuronalen Oberflächenantigenen untersucht werden. Von den jeweils 4 getesteten Liquor- und Serumproben, zeigten jedoch alle eine neuronale Oberflächenfärbung an. Ein weiterer Punkt ist, dass die im Screeningtest positiven Proben lediglich auf zwei spezifische Antikörper getestet wurden. Ziel nachfolgender Studien sollte es sein die Reaktion auf weitere bekannte Antikörper zu untersuchen.

4.5 Ausblick

Zusammenfassend demonstrieren die Daten, dass neuronale/gliale Autoantikörper in Subgruppen von Immunneuropathien, v.a. bei der CIDP und dem GBS, vermehrt vorkommen und mit einem spezifischen klinischen Phänotyp assoziiert sind. Dieser ist charakterisiert durch einen schweren Krankheitsverlauf, einer Liquorpleozytose und einem erhöhtem Gesamteiweiß im Liquor, sowie einem besseren Ansprechen auf antikörperorientierte Therapien. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit Beobachtungen aus vorherigen Studien, lediglich in Hinblick auf das Ansprechen auf Immunglobuline zeigen sich Differenzen. Können sich diese Ergebnisse und klinischen Assoziationen in größeren prospektiven Kohortenstudien bestätigen, dann könnten diese Antikörper als Krankheitsmarker in Subgruppen von Immunneuropathien dienen.

Die sekundäre Immunhistochemie auf Rattenhirnen erwies sich als eine aussagekräftige Screeningmethode für die Detektion von bekannten neuronalen/glialem Autoantikörpern sowie Antikörpern gegen bislang unbekannte neuronale/gliale Antigene. In größeren Kohortenstudien muss die Sensitivität und Spezifität dieser Methodik weiter untersucht werden. Bei einem kleinen Teil, der in der Screeningmethode positiven Patienten (14 %), konnten spezifische Antikörper detektiert und bei einem weiteren Teil (14 %) das Vorhandensein von AK gegen neuronale Oberflächenproteine bestätigt werden. Das Zielantigen der übrigen Antikörper ist gegenwärtig noch nicht charakterisiert. Weitere Studien sind nötig um Patienten mit Immunneuropathien auf diese spezifischen und auf

andere nodale, paranodale und juxtaparanodale Autoantikörper zu testen. Außerdem sollten Untersuchungen durchgeführt werden um das Verständnis des Pathomechanismus weiter zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Akute und chronische Immunneuropathien stellen eine wichtige Differentialdiagnose bei Patienten mit polyneuropathischen Beschwerden dar. Der Pathomechanismus, der den Erkrankungen zugrunde liegt, ist bislang noch nicht vollständig geklärt, allerdings konnten in der Vergangenheit bereits Antikörper in Patientenserien nachgewiesen werden. In letzter Zeit hat sich der Fokus vor allem auf die nodale, paranodale und juxtaparanodale Zone von peripheren Nerven gelegt und es konnten schon einige Antikörper gegen axogliale Zelladhäsionsmoleküle identifiziert werden. Allerdings bleibt unklar wie häufig solche bekannten Autoantikörper und andere Antikörper gegen bislang unbekannte Antigene in Subgruppen von Immunneuropathien vorkommen. Eine besondere Schwierigkeit bei der Identifizierung bereitet die Tatsache, dass keine „Screeningtests“ für solche Autoantikörper existieren. Problematisch ist außerdem das sehr heterogene Therapieansprechen sowie die Diagnosestellung, die vor allem auf einer klinischen Einschätzung beruht. Humorale Biomarker sind daher nötig, die dabei helfen können a) die Patienten in definierte Subgruppen zu gliedern, b) ein Therapieansprechen vorherzusagen und c) als prognostische Marker zu dienen.

Zielsetzung: Ziel dieser Arbeit war es daher erstens die Prävalenz von bekannten und unbekannten paranodalen und juxtaparanodalen Autoantikörpern in Subgruppen von Immunneuropathien zu bestimmen und zweitens klinische Assoziationen mit dem Vorhandensein von Antikörpern zu untersuchen.

Methodik: Es erfolgte die Untersuchung einer retrospektiv identifizierten Patientenkollektiv. Einschlusskriterium war, dass mindestens eine Liquor- und möglichst eine Serum-Probe mit genügend Material vorhanden waren. Die Patienten wurden anhand der Entlassungsdiagnose in Subgruppen gegliedert und klinische, elektrophysiologische und laborchemische Daten erfasst. Die Proben wurden zunächst mittels sekundärer Immunhistochemie auf fixierten Rattenhirnschnitten als Screeningmethode auf bekannte neuronale/gliale Antikörper, sowie auf Antikörper gegen bislang unbekannte neuronale/gliale Antigene getestet. Für die Charakterisierung der Antikörpern wurden anschließend alle im Screeningverfahren positive Proben mit ausreichend Material mittels indirekter Immunfluoreszenz auf transfizierten HEK-Zellen auf Neurofascin-155 und Contactin-1 getestet und mittels indirekter Immunfluoreszenz auf embryonalen Primärkulturneuronen für die Bestätigung von neuronalen Oberflächenantigenen untersucht.

Ergebnisse: Ich konnte 20 Patienten mit chronischen Immunneuropathien (Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie, Multifokal motorische Neuropathie), 16 mit akuten Immunneuropathien (Guillain-Barré-Syndrom, Miller-Fisher-Syndrom) und 21

mit anderen inflammatorischen Neuropathien (nicht klassifizierbare Immunneuropathien, andere entzündliche Neuropathien) identifizieren. Zusätzlich rekrutierte ich 23 Patienten mit klinisch als nicht entzündlich eingeschätzte Polyneuropathien und 40 Patienten mit nicht neuropathischen Erkrankungen als Kontrollgruppe. Die neuronale/gliale Antikörperprävalenz betrug 24 % (Liquor und Serum, $p=0,006$) bei Patienten mit einer chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie, 31 % (Liquor, $p=0,0011$) und 27 % (Serum, $p=0,006$) bei den akuten Immuneuropathien, 14 % (Liquor, $p=0,0407$) und 23 % (Serum, $p=0,0041$) bei den anderen inflammatorischen Neuropathien, 9 % (Liquor und Serum, $p=0,1295$) bei den klinisch als nicht entzündlich eingeschätzten Polyneuropathien, sowie 0 % bei den Patienten mit einer Multifokalen motorischen Neuropathie und den Kontrollpatienten ohne neuropathische Erkrankungen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Dauer und Schwere der Erkrankung, sowie Liquorparametern und tendenzielle Unterschiede im Therapieansprechen zwischen den antikörperpositiven- und negativen Patienten. Ein Teil der antikörperpositiven Patienten (14 %) hat jetzt schon bekannte Antikörper (Neurofascin-155, HNK-1), ein Teil Antikörper gegen bislang unbekannte Antigene.

Diskussion: Wir konnten zeigen, dass neuronale/gliale Autoantikörper in Untergruppen von Immunneuropathien vorkommen und mit spezifischen klinischen Merkmalen assoziiert sind. Sofern sich unsere Untersuchungen prospektiv in größeren Kohortenstudien bestätigen, könnten diese Autoantikörper als Krankheitsmarker dienen, die die Patienten in definierte Subgruppen gliedern, als prognostische Marker dienen und die dabei helfen die Patienten mit einer individuellen bestmöglichen Therapie zu versorgen.

6 Literaturverzeichnis

- Bosboom, W.M., Van den Berg, L.H., De Boer, L., Van Son, M.J., Veldman, H., Franssen, H., Logtenberg, T., und Wokke, J.H. (1999). The diagnostic value of sural nerve T cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 53, 837–845.
- Burnor, E., Yang, L., Zhou, H., Patterson, K.R., Quinn, C., Reilly, M.M., Rossor, A.M., Scherer, S.S., und Lancaster, E. (2018). Neurofascin antibodies in autoimmune, genetic, and idiopathic neuropathies. *Neurology* 90, e31–e38.
- Chevret, S., Hughes, R.A., und Annane, D. (2017). Plasma exchange for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD001798.
- Cifuentes-Diaz, C., Dubourg, O., Irinopoulou, T., Vigny, M., Lachkar, S., Decker, L., Charnay, P., Denisenko, N., Maisonobe, T., Léger, J.-M., et al. (2011). Nodes of ranvier and paranodes in chronic acquired neuropathies. *PLoS One* 6, e14533.
- Dalakas, M.C. (2013). Pathophysiology of autoimmune polyneuropathies. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 42, e181-192.
- Dalakas, M.C. (2015). Pathogenesis of immune-mediated neuropathies. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1852, 658–666.
- Dalakas, M.C. (2018). Advances in the diagnosis, immunopathogenesis and therapies of IgM-anti-MAG antibody-mediated neuropathies. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 11, 1756285617746640.
- Delmont, E., Manso, C., Querol, L., Cortese, A., Berardinelli, A., Lozza, A., Belghazi, M., Malissart, P., Labauge, P., Taieb, G., et al. (2017). Autoantibodies to nodal isoforms of neurofascin in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Brain* 140, 1851–1858.
- Devaux, J.J., Odaka, M., und Yuki, N. (2012). Nodal proteins are target antigens in Guillain-Barré syndrome. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 17, 62–71.
- Devaux, J.J., Miura, Y., Fukami, Y., Inoue, T., Manso, C., Belghazi, M., Sekiguchi, K., Kokubun, N., Ichikawa, H., Wong, A.H.Y., et al. (2016). Neurofascin-155 IgG4 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 86, 800–807.
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Krämer, H.H., Ng, J.K.M., Meinl, E., Villmann, C., Brophy, P., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G., Weishaupt, A., et al. (2015a). Contactin-1 and Neurofascin-155/186 Are Not Targets of Auto-Antibodies in Multifocal Motor Neuropathy. *PLoS One* 10, e0134274.
- Doppler, K., Appeltshauser, L., Wilhelm, K., Villmann, C., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G., Mäurer, M., Weishaupt, A., und Sommer, C. (2015b). Destruction of paranodal architecture in inflammatory neuropathy with anti-contactin-1 autoantibodies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 720–728.
- Hacke, W. (2016). *Neurologie* (Berlin Heidelberg: Springer).
- Hughes, R., Bensa, S., Willison, H., Van den Bergh, P., Comi, G., Illa, I., Nobile-Orazio, E., van Doorn, P., Dalakas, M., Bojar, M., et al. (2001). Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann. Neurol.* 50, 195–201.
- Hughes, R.A., Swan, A.V., und van Doorn, P.A. (2014). Intravenous immunoglobulin for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002063.

Hughes, R.A., Brassington, R., Gunn, A.A., und van Doorn, P.A. (2016). Corticosteroids for Guillain-Barré syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* 10, CD001446.

Kawamura, N., Yamasaki, R., Yonekawa, T., Matsushita, T., Kusunoki, S., Nagayama, S., Fukuda, Y., Ogata, H., Matsuse, D., Murai, H., et al. (2013). Anti-neurofascin antibody in patients with combined central and peripheral demyelination. *Neurology* 81, 714–722.

Koike, H., Kadoya, M., Kaida, K., Ikeda, S., Kawagashira, Y., Iijima, M., Kato, D., Ogata, H., Yamasaki, R., Matsukawa, N., et al. (2017). Paranodal dissection in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with anti-neurofascin-155 and anti-contactin-1 antibodies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 88, 465–473.

Masuhr, K.F., Masuhr, F., und Neumann, M. (2013). *Neurologie* (Stuttgart: Thieme).

Mathey, E.K., Park, S.B., Hughes, R.A.C., Pollard, J.D., Armati, P.J., Barnett, M.H., Taylor, B.V., Dyck, P.J.B., Kiernan, M.C., und Lin, C.S.-Y. (2015). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 973–985.

Mathey, E.K., Garg, N., Park, S.B., Nguyen, T., Baker, S., Yuki, N., Yiannikas, C., Lin, C.S., Spies, J.M., Ghaoui, R., et al. (2017). Autoantibody responses to nodal and paranodal antigens in chronic inflammatory neuropathies. *J. Neuroimmunol.* 309, 41–46.

Mattle, H., Mumenthaler, M., und Schroth, G. (2013). *Neurologie* (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).

Miura, Y., Devaux, J.J., Fukami, Y., Manso, C., Belghazi, M., Wong, A.H.Y., Yuki, N., und CNTN1-CIDP Study Group (2015). Contactin 1 IgG4 associates to chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with sensory ataxia. *Brain J. Neurol.* 138, 1484–1491.

Ng, J.K.M., Malotka, J., Kawakami, N., Derfuss, T., Khademi, M., Olsson, T., Linington, C., Odaka, M., Tackenberg, B., Pruss, H., et al. (2012). Neurofascin as a target for autoantibodies in peripheral neuropathies. *Neurology* 79, 2241–2248.

Notturno, F., Di Febo, T., Yuki, N., Fernandez Rodriguez, B.M., Corti, D., Nobile-Orazio, E., Carpo, M., De Lauretis, A., und Uncini, A. (2014). Autoantibodies to neurofascin-186 and gliomedin in multifocal motor neuropathy. *J. Neuroimmunol.* 276, 207–212.

Ogata, H., Yamasaki, R., Hiwatashi, A., Oka, N., Kawamura, N., Matsuse, D., Kuwahara, M., Suzuki, H., Kusunoki, S., Fujimoto, Y., et al. (2015). Characterization of IgG4 anti-neurofascin 155 antibody-positive polyneuropathy. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 960–971.

Peltier, A., und Donofrio, P. (2012). Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy: From Bench to Bedside. *Semin. Neurol.* 32, 187–195.

Querol, L., und Illa, I. (2015). Paranodal and other autoantibodies in chronic inflammatory neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* 28, 474–479.

Querol, L., Nogales-Gadea, G., Rojas-Garcia, R., Martinez-Hernandez, E., Diaz-Manera, J., Suárez-Calvet, X., Navas, M., Araque, J., Gallardo, E., und Isabel Illa (2013). Antibodies to contactin-1 in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: Contactin-1 in Aggressive CIDP. *Ann. Neurol.* 73, 370–380.

Querol, L., Nogales-Gadea, G., Rojas-Garcia, R., Diaz-Manera, J., Pardo, J., Ortega-Moreno, A., Sedano, M.J., Gallardo, E., Berciano, J., Blesa, R., et al. (2014). Neurofascin IgG4 antibodies in CIDP associate with disabling tremor and poor response to IVIg. *Neurology* 82, 879–886.

Rasband, M.N., und Peles, E. (2015). The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a020495.

Schafflick, D., Kieseier, B.C., Wiendl, H., und Meyer zu Horste, G. (2017). Novel pathomechanisms in inflammatory neuropathies. *J. Neuroinflammation* 14, 232.

Schmidt, B., Toyka, K.V., Kiefer, R., Full, J., Hartung, H.P., und Pollard, J. (1996). Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Muscle Nerve* 19, 474–487.

Sommer, C., Koch, S., Lammens, M., Gabreels-Festen, A., Stoll, G., und Toyka, K.V. (2005). Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology* 65, 1924–1929.

Sommer, C. et al. (2018). Therapie akuter und chronischer immunvermittelter Neuropathien und Neuritiden, S2e-Leitlinie; in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.

Stathopoulos, P., Alexopoulos, H., und Dalakas, M.C. (2015). Autoimmune antigenic targets at the node of Ranvier in demyelinating disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 143–156.

van Swieten, J.C., Koudstaal, P.J., Visser, M.C., Schouten, H.J., und van Gijn, J. (1988). Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke* 19, 604–607.

Trepel, M. (2012). *Neuroanatomie: Struktur und Funktion* (München: Elsevier, Urban & Fischer).

Van Asseldonk, J.-T.H., Franssen, H., Van den Berg-Vos, R.M., Wokke, J.H.J., und Van den Berg, L.H. (2005). Multifocal motor neuropathy. *Lancet Neurol.* 4, 309–319.

Van den Bergh, P.Y.K., Hadden, R.D.M., Bouche, P., Cornblath, D.R., Hahn, A., Illa, I., Koski, C.L., Léger, J.-M., Nobile-Orazio, E., Pollard, J., et al. (2010). European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripher: EFNS/PNS CIDP guideline - first revision. *Eur. J. Neurol.* 17, 356–363.

Vural, A., Doppler, K., und Meinl, E. (2018). Autoantibodies Against the Node of Ranvier in Seropositive Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy: Diagnostic, Pathogenic, and Therapeutic Relevance. *Front. Immunol.* 9, 1029.

Wandinger, K.-P., Leypoldt, F., und Junker, R. (2018). Autoantibody-Mediated Encephalitis. *Dtsch. Arzteblatt Int.* 115, 666–673.

Willison, H.J., Jacobs, B.C., und van Doorn, P.A. (2016). Guillain-Barré syndrome. *Lancet Lond. Engl.* 388, 717–727.

Yan, W., Nguyen, T., Yuki, N., Ji, Q., Yiannikas, C., Pollard, J.D., und Mathey, E.K. (2014). Antibodies to neurofascin exacerbate adoptive transfer experimental autoimmune neuritis. *J. Neuroimmunol.* 277, 13–17.

Yan, W.X., Taylor, J., Andrias-Kauba, S., und Pollard, J.D. (2000). Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Ann. Neurol.* 47, 765–775.

Yuki, N., und Hartung, H.-P. (2012). Guillain-Barré syndrome. *N. Engl. J. Med.* 366, 2294–2304.

Zifko, U. (2017). *Polyneuropathie: so überwinden Sie quälende Nervenschmerzen* (Berlin: Springer-Verlag GmbH Deutschland).

7 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater PD Dr. Frank Leypoldt für das Überlassen des Themas und die hervorragende Betreuung bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Junker für die Möglichkeit, dass ich die Dissertation in seinem Institut absolvieren konnte.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Romana Höftberger und Ihrem wissenschaftlichen Team aus dem Institut für Neurologie der Uniklinik Wien für die Durchführung der experimentellen Untersuchungen und dem Überlassen der Ergebnisse.

Für die Unterstützung während der experimentellen Phase im Labor und dem Bereitstellen der immunhistochemischen Schnitte möchte ich mich ganz herzlich bei Martina Jansen und Kim Kristin Falk bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Imre Goretzi für die hilfreichen Ratschläge bei der statistischen Auswertung, sowie bei Matthias Hundertmark bedanken.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, ohne die die Promotion und das gesamte Studium nicht möglich gewesen wäre.

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Hannah Hülst, versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation mit dem Thema: „juxtaparanodale Autoantikörper bei Immunneuropathien“, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, und dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe.

Des Weiteren versichere ich, dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift

Kongressabstract- und Posterpräsentation:

Hülst H, Falk K.K., Jansen M., Höftberger R., Wandinger K.P., Leypoldt F. (2016)

Neuronale Autoantikörper bei akuten und chronischen Immunneuropathien: Eine retrospektive Kohortenanalyse

89. Kongress der Gesellschaft für Neurologie vom 21. – 24. September in Mannheim
Poster 217