

Einfluss humoraler Faktoren auf die neuromuskuläre Transmission bei der chronischen inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP)

Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Simone Bertram

28. Januar 2010

Erstgutachter: Prof. Dr. Rainer Landgraf
Zweitgutachter: Prof. Dr. George Boyan
Tag der mündlichen Prüfung: 10. Januar 2011

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	1
1.1 Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)	1
1.1.1 Definition, Epidemiologie und klinische Kennzeichen der CIDP	1
1.1.2 Subtypen der CIDP	2
1.1.3 Therapie der CIDP	3
1.1.4 Ätiologie der CIDP	4
1.2 Immunologische Faktoren bei der CIDP	4
1.2.1 Allgemeine Mechanismen autoimmuner Neuropathien	4
1.2.2 Zellvermittelte Immunantwort bei der CIDP - Aktueller Stand der Forschung	5
1.2.3 Humorale Immunantwort bei der CIDP - Aktueller Stand der Forschung	8
1.3 Die motorische Endplatte	11
1.3.1 Aufbau der motorischen Endplatte	11
1.3.2 Die neuromuskuläre Transmission	14
1.3.3 Die Rolle des P/Q-Typ Calciumkanals bei der neuromuskulären Transmission	15
1.3.4 Die motorische Endplatte als Modell zur Untersuchung autoimmuner Erkrankungen	17
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Patienten und aufgereinigtes IgG	19
2.2 Elektrophysiologische Messungen	20
2.2.1 Präparation des Zwerchfells	20
2.2.2 <i>Macro-Patch-Clamp</i> -Technik	21
2.2.3 Versuchsablauf	24
2.2.4 Koinkubationsexperimente von CIDP-IgG mit IVIg	25
2.2.5 Applikation des monoklonalen Anti-P0-Antikörpers	25

2.3	<i>Calcium-Imaging</i>	25
2.4	Anti-Gangliosid-Antikörperbestimmung	27
2.5	<i>Westernblots</i>	27
3	Ergebnisse	29
3.1	Einfluss von CIDP-IgG auf die neuromuskuläre Transmission	29
3.1.1	Depolarisationsabhängigkeit des <i>quantal contents</i>	35
3.2	Postsynaptische Effekte von CIDP-IgG	36
3.3	Effekte von IVIg auf die CIDP-IgG-vermittelte präsynaptische Blockade	39
3.4	Einfluss von CIDP-IgG auf den Calciumeinstrom in kultivierte Neuronen des <i>Bulbus olfactorius</i>	42
3.5	Charakterisierung des Zielantigens bei der CIDP	46
3.5.1	Detektion von Anti-Gangliosid-Antikörpern durch ELISA	46
3.5.2	Identifizierung von Zielantigenen durch <i>Westernblots</i>	46
3.6	Einfluss von monoklonalen Antikörpern gegen das periphere Myelinprotein 0 auf die neuromuskuläre Transmission	48
4	Diskussion	52
4.1	Neuromuskuläre Blockade durch CIDP-IgG	52
4.1.1	Präsynaptische Blockade durch CIDP-IgG	52
4.1.2	CIDP-IgG hat keinen Einfluß auf die qEPSC-Amplitude	53
4.1.3	Mechanismus der präsynaptischen Blockade	54
4.2	Neutralisation der präsynaptischen Blockade durch IVIg	59
4.3	Klinische Bedeutung neuromuskulär blockierender Antikörper bei der CIDP	61
4.4	Charakterisierung des Zielantigens bei CIDP	63
4.4.1	CIDP-IgG zeigt keine Antikörperaktivität gegen Ganglioside	63
4.4.2	Spezifische Bindungen von CIDP-IgG an Proteine des Zwerchfells	65
4.4.3	P0 als mögliches Zielantigen	66
5	Zusammenfassung	67
6	Literatur	70
7	Danksagung	91
8	Lebenslauf	93
9	Veröffentlichungen	94
10	Erklärung	95

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau der motorischen Endplatte	13
2.1	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	22
2.2	Aufbau der <i>Macro-Patch-Clamp</i> -Elektrode	23
2.3	Originalableitung eines qEPSCs	24
3.1	Repräsentativer Zeitverlauf des <i>quantal contents</i> während der Applikation von Kontroll- und CIDP-IgG	29
3.2	Zeitverlauf des mittleren relativen <i>quantal contents</i> während der Applikation von Kontroll- und CIDP-IgG	31
3.3	Mittlerer relativer <i>quantal content</i> nach der Applikation von Kontroll- und CIDP-IgG, Gesamtansicht	33
3.4	Konzentrationsabhängigkeit der CIDP-IgG-induzierten Blockade	34
3.5	Depolarisationsabhängigkeit der CIDP-IgG-induzierten Blockade	35
3.6	Repräsentative Amplitudenverteilung der qEPSCs vor und während der Applikation von CIDP-IgG	36
3.7	Mittlere relative qEPSC-Amplitude nach der Applikation von Kontroll- und CIDP-IgG, Gesamtansicht	38
3.8	Repräsentativer Zeitverlauf des <i>quantal contents</i> während der Applikation von CIDP-IgG und CIDP-IgG koinkubiert mit IVIg	39
3.9	Zeitverlauf des mittleren relativen <i>quantal contents</i> während der Applikation von CIDP-IgG und CIDP-IgG koinkubiert mit IVIg	40
3.10	Mittlerer relativer <i>quantal content</i> mit und ohne Koinkubation von CIDP-IgG mit IVIg	42
3.11	Originalkurven <i>Calcium-Imaging</i>	43
3.12	Zusammenfassung der <i>Calcium-Imaging</i> -Daten	44
3.13	Identifizierung von Antigenen durch <i>Westernblots</i>	46
3.14	Repräsentativer Zeitverlauf des <i>quantal contents</i> während der Applikation von monoklonalen Anti-P0-Antikörpern	48
3.15	Zeitverlauf des mittleren relativen <i>quantal contents</i> während der Applikation von monoklonalen Anti-P0-Antikörpern	49
3.16	Mittlerer relativer <i>quantal content</i> nach der Applikation von monoklonalen Anti-P0-Antikörpern, Zusammenfassung	51
4.1	Mechanismen der präsynaptischen Blockade	55
4.2	Mögliche Wirkmechanismen von IVIg	61

Tabellenverzeichnis

1.1	Antikörper gegen periphere Myelinproteine bei der CIDP	8
1.2	Antikörper gegen Glykolipide bei der CIDP	11
2.1	Klinische Patientendaten	20
3.1	Mittlere Applikationszeit zum halbmaximalen CIDP-IgG-Effekt . . .	30
3.2	Mittlerer relativer <i>quantal content</i> und p-Werte nach der Applikation von CIDP-IgG	32
3.3	Mittlere relative qEPSC-Amplitude und p-Werte nach der Applikation von CIDP-IgG	37
3.4	Mittlerer relativer <i>quantal content</i> , mittlere relative Amplituden und p-Werte nach Applikation von CIDP-IgG koinkubiert mit IVIg	41
3.5	Zusammenfassung der <i>Calcium-Imaging</i> -Experimente	45
3.6	Nachweisbare Bindungen des CIDP-IgGs an Zwerchfellproteine	47
3.7	Mittlerer relativer <i>quantal content</i> , mittlere relative Amplituden und p-Werte nach Applikation von monoklonalen Anti-P0-Antikörpern . .	50

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholinrezeptor
AIDP	Akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
AMAN	Akute motorische axonale Neuropathie
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CIDP	Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
CMAP	<i>Compound muscle action potential</i>
CSF	Cerebrospinale Flüssigkeit
DML	Distale motorische Latenz
EAN	<i>Experimental auto-immune neuritis</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPP	Endplattenpotential
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
IgA	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2-Rezeptor
IVIg	Intravenöse Immunoglobuline
LEMS	Lambert-Eaton-Myasthenisches Syndrom
MEPP	Miniaturendplattenpotential
MFS	Miller-Fisher-Syndrom
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MMN	Multifokale motorische Neuropathie
MS	Multiple Sklerose
NBL	Neuroblastom
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
OD	Optische Dichte
P0	Peripheres Myelinprotein 0
P1	Peripheres Myelinprotein 1
P2	Peripheres Myelinprotein 2

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PMP22	Peripheres Myelinprotein 22
PNS	Peripheres Nervensystem
qEPSC	<i>Quantal excitatory postsynaptic current</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SGPG	Sulphatiertes Glucuronylparaglobosid
SNAP	<i>Synaptosome-associated protein</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)

1.1.1 Definition, Epidemiologie und klinische Kennzeichen der CIDP

Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) ist eine erworbene Erkrankung des peripheren Nervensystems. Die mittlere Prävalenz liegt bei 1-2 Fällen pro 100000 Erwachsenen (Lunn et al., 1999; McLeod et al., 1999), wobei Männer in einem Verhältnis von 2:1 häufiger betroffen sind als Frauen (McCombe et al., 1987; Trojaborg, 1998; McLeod et al., 1999). Die Krankheit kann zu jeder Lebenszeit auftreten, die Häufigkeit steigt jedoch mit zunehmendem Alter.

CIDP ist charakterisiert durch das Auftreten von symmetrischer Schwäche in den proximalen und distalen Muskeln, Sensibilitätsstörungen und den Verlust der Muskelreflexe. Des Weiteren weisen CIDP-Patienten häufig eine erhöhte Proteinkonzentration im Liquor auf. Die Symptome der CIDP entwickeln sich über mehrere Wochen hinweg, laut Definition über mindestens acht Wochen. Dies unterscheidet die CIDP von der akuten inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (AIDP oder Guillain-Barré-Syndrom), bei der die Progression der Muskelschwäche maximal vier Wochen in Anspruch nehmen darf. Die Krankheit folgt einem rezidivierenden oder einem chronisch progredienten Verlauf, wobei oft einem rezidivierenden ein sekundärer progredienter Krankheitsverlauf folgt (Bouchard et al., 1999). In diesem Zusammenhang wird die CIDP auch als peripheres Analog zur Multiplen Sklerose (MS) betrachtet.

Die Diagnose der CIDP wird durch elektrophysiologische Befunde gestützt, die auf eine Demyelinisierung der Nerven hinweisen. Patienten zeigen hierbei eine verminderte motorische Nervenleitgeschwindigkeit, die unterhalb von 75% des Normalwerts

liegt. Die distale motorische Latenz ist größer als 140% und die F-Wellen-Latenz größer als 120% des Normalwerts (Said, 2006). Nervenbiopsien von CIDP-Patienten zeigen inflammatorische Läsionen mit Infiltrationen von Makrophagen, Lymphozyten und Zytokinen, fortschreitende Demyelinisierung und axonale Degeneration bzw. axonalen Verlust. Ablagerungen von Immunglobulin (Ig) M, IgG und Komplementfaktoren auf der Oberfläche von Schwann-Zellen konnten beobachtet werden (Dalakas und Engel, 1980; Mazzeo et al., 2004).

1.1.2 Subtypen der CIDP

Das Krankheitsbild der CIDP weist hinsichtlich seiner klinischen, elektrophysiologischen und pathologischen Charakteristika eine hohe Variabilität zwischen den einzelnen Patienten auf. Dies führt zur Einteilung der CIDP in verschiedene Subtypen:

- Die klassische CIDP tritt am häufigsten auf und steht im Fokus der vorliegenden Arbeit.
- Bei der chronischen sensorischen demyelinisierenden Polyneuropathie treten entweder nur sensorische, jedoch keine motorischen Ausfälle auf oder auf die sensorischen Symptome folgen nach variabler Zeit auch motorische Beeinträchtigungen.
- Multifokale motorische Neuropathie (MMN) wird durch eine asymmetrische Muskelschwäche ohne sensorische Beeinträchtigungen charakterisiert.
- Multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie (Lewis-Sumner-Syndrom) hat sowohl Charakteristika von der klassischen CIDP als auch von der MMN.

Neben den hier genannten Varianten der CIDP existieren weitere seltene Subtypen, die sich aufgrund ihrer klinischen und elektrophysiologischen Merkmale von den Hauptgruppen unterscheiden.

Des Weiteren existieren zwischen den Varianten Unterschiede hinsichtlich des Erfolgs einzelner Therapien. Während Patienten mit klassischer CIDP und der multifokalen erworbenen demyelinisierenden sensorischen und motorischen Neuropathie gut auf Plasmapheresen, intravenöse Immunglobuline und Corticosteroide ansprechen,

erwiesen sich Plasmapheresen und Corticosteroide bei der MMN als weitgehend erfolglos (Nobile-Orazio, 2001).

1.1.3 Therapie der CIDP

Zur Behandlung der CIDP werden Plasmapheresen, intravenöse Immunglobuline (IVIg), Corticosteroide oder immunsuppressive Medikamente eingesetzt. Plasmapheresen führten bei bis zu 80%, IVIg bei bis zu 63% und Corticosteroide bei bis zu 65% der Patienten zu einer kurzzeitigen Abschwächung der Symptome (McCombe et al., 1987; Hahn et al., 1996; Mehndiratta et al., 2004). Mendell et al. (2001) konnten bei CIDP-Patienten, die mit IVIg behandelt wurden, eine signifikante klinische Verbesserung gegenüber der Placebogruppe feststellen. Ähnliches berichteten auch Hughes et al. (2001). Sowohl die Verabreichung von IVIg als auch von Corticosteroiden führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Symptomminde- rung bei den Patienten. Ein positiver Effekt von immunsuppressiven Medikamenten, wie beispielsweise Methotrexat, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Während Fialho et al. (2006) nach der Verabreichung von Methotrexat bei sieben von zehn CIDP-Patienten eine Gesundheitsverbesserung feststellten, konnte dies durch eine Studie der RMC Trial Group (Mahid-Rogers et al., 2009) nicht bestätigt werden. Ein positiver Effekt von Cyclosporinen und Cyclophosphamiden konnte in einzelnen Studien nachgewiesen werden (Mahattanakul et al., 1996; Good et al., 1998).

Plasmapheresen und die Verabreichung von IVIg und Corticosteroiden sind The- rapien, die immunmodulatorische Wirkungen haben. So dienen Plasmapheresen zur Beseitigung von pathogenen Antikörpern, Komplementfaktoren und Zytokinen aus dem Plasma des Patienten. IVIg wirkt auf Autoantikörper, Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Es neutralisiert pathogene Zytokine, hemmt die Komplementaktivität und moduliert die Phagozytose (Malik et al., 1996; Stangel et al., 1999; Yu und Lennon, 1999). Corticosteroide fördern die Apoptose von autoreaktiven T-Zellen im peripheren Nerven (Zettl et al., 1995) und hemmen die Freisetzung von proinflam- matorischen Zytokinen und Chemokinen und die Migration von Leukozyten zum Inflammationsherd.

1.1.4 Ätiologie der CIDP

Bis heute sind die Ursachen der CIDP ungeklärt, das gute Ansprechen auf immunmodulatorische Therapien lässt jedoch auf eine autoimmune Genese schließen. Während Plasmapheresen auf die Beseitigung von Autoantikörpern abzielen, ist der Effekt von Corticosteroiden hauptsächlich auf die zelluläre Immunität beschränkt (Brannagan, 2009). Dies und die Beobachtungen an Nervenbiopsien bestätigen die Annahme, dass sowohl zellvermittelte als auch humorale Immunmechanismen bei der Entstehung der CIDP eine Rolle spielen.

Des Weiteren konnten bei bis zu 32% der Patienten Infektionen oder Impfungen nachgewiesen werden, die dem Ausbruch der CIDP-Symptome vorausgingen (McCombe et al., 1987; Meléndez-Vásquez et al., 1997; Pritchard et al., 2002). Dies führte zur Theorie der „molekularen Mimikry“, die besagt, dass der Patient eine Immunantwort gegen einen infektiösen Organismus produziert, der zufällig gleiche Epitope besitzt, wie körpereigene Strukturen des Patienten. Daraus folgt eine fehlgeleitete Antwort des Immunsystems gegen den eigenen Körper, wie z.B. den peripheren Nerv. Es ist jedoch zu beachten, dass bisher keine Studie eine klare Assoziation zwischen vorherigen Infektionen und dem Ausbruch der CIDP nachweisen konnte.

1.2 Immunologische Faktoren bei der CIDP

1.2.1 Allgemeine Mechanismen autoimmuner Neuropathien

Lange Zeit wurde angenommen, dass dem peripheren Nervensystem (PNS) eine immunologisch „privilegierte“ Stellung zukommt und keine Zellen oder Faktoren des Immunsystems Zugang zum PNS haben. Diese Ansichten wurden jedoch revidiert, nachdem entdeckt wurde, dass der gesunde periphere Nerv mehrere residente, immunologisch relevante Zellen enthält und zirkulierende Lymphozyten fähig sind, in das PNS ein- und auszuwandern. Zusätzlich ist die Blut-Nerv-Schranke durchlässig für kleine zirkulierende Proteine, u.a. auch für IgG. Diese Beobachtungen zeigen, dass das PNS in aktive immunologische Prozesse einbezogen wird, angreifbar für Antikörper-vermittelte Erkrankungen ist und damit als Ziel für Autoimmunreaktionen in Frage kommt (Ho et al., 1998; Kiefer et al., 2001).

Verschiedene Mechanismen können bei einer Immunreaktion gegen körpereigene

Antigene des peripheren Nervens zur Schädigung führen. Residente Makrophagen exprimieren Klasse I und Klasse II MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle und übernehmen eine entscheidende Funktion als antigenpräsentierende Zellen (Monaco et al., 1992; Bonetti et al., 1993; Rizzuto et al., 1998; Kiefer et al., 2001). Auch Schwann-Zellen sind an der Antigenpräsentation beteiligt (Pollard et al., 1987; Scarpini et al., 1990; Kiefer et al., 2001). Durch die Erkennung des spezifischen Antigens werden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten aktiviert und zur Sekretion von Zytokinen stimuliert. Durch diese werden Makrophagen aktiviert, die durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen, Metalloproteinasen und proinflammatorischen Zytokinen zu unspezifischen Schädigungen von PNS-Strukturen, wie beispielsweise Myelin, und zum axonalen Verlust führen (Kieseier et al., 2004). Elektronenmikroskopische Beobachtungen zeigten, dass Makrophagen fähig sind, Myelin vom intakten Axon abzustreifen (Prineas, 1981) und durch Phagozytose abzubauen. Die Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen führt zur direkten Lyse der Zielzellen, die Antigene in Assoziation mit Klasse I MHC-Molekülen aufweisen. Des Weiteren werden antigenspezifische B-Lymphozyten zur Proliferation und Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen stimuliert. Autoantikörper wirken zum einen, indem sie durch ihre Bindung zu physiologischen Beeinträchtigungen des Zielantigens führen, ohne weitere Zell- oder Gewebeschäden hervorzurufen. Zum anderen kann ihre Bindung zur komplementvermittelten Lyse der Zielstruktur führen, indem Granulozyten und Monozyten aktiviert und die antikörperbeladenen Zielstrukturen phagozytiert werden.

Die folgenden Abschnitte liefern eine Zusammenfassung über die bisher erworbenen Erkenntnisse über die Beteiligung von zellvermittelten und humoralen Immunantworten bei der Pathogenese der CIDP.

1.2.2 Zellvermittelte Immunantwort bei der CIDP - Aktueller Stand der Forschung

Aufschluss über die Beteiligung von zellvermittelten Immunreaktionen gegen periphere Nervantigene an der Pathogenese der CIDP brachten Untersuchungen an Nervenbiopsien von CIDP-Patienten und an Tieren mit *experimental auto-immune neuritis* (EAN). EAN weist histologische Ähnlichkeiten mit CIDP und dem Guillain-

Barré-Syndrom (GBS) auf und dient als Modell zur Erforschung von Autoimmunerkrankungen des peripheren Nervens.

Damit das Immunsystem Zugang zum PNS bekommt, muss die Durchlässigkeit der Blut-Nerv-Schranke verändert werden. Hinweise auf Störungen der Blut-Nerv-Barriere bei CIDP-Patienten konnte eine Studie von Kanda et al. (2004) geben. Sie zeigte eine signifikant verminderte Expression des Proteins Claudin-5 und Lokalisationsunterschiede des Proteins ZO-1 im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Claudin-5 und ZO-1 sind an der Ausbildung von *tight junctions* zwischen den Endothelzellen der Blut-Nerv-Barriere und der Kontrolle der vaskulären Permeabilität beteiligt. Des Weiteren konnten erhöhte Serum- oder Liquor-Konzentrationen von löslichen Adhäsionsmolekülen (Previtali et al., 1998; Previtali et al., 2001), Chemokinen (Kieseier et al., 2002) und Matrix-Metalloproteinasen (Leppert et al., 1999) bei CIDP-Patienten nachgewiesen werden. Hartung et al. (1990; 1991) detektierten erhöhte Serumkonzentrationen von löslichen Interleukin-2-Rezeptoren (IL-2R) und Interleukin (IL)-2. Diese Beobachtungen reflektieren eine aktive T-Zell-Migration über die Blut-Nerv-Schranke.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollen trat bei CIDP-Patienten eine erhöhte Anzahl an aktivierten T-Zellen auf (Taylor und Hughes, 1989; Van den Berg et al., 1995; Schmidt et al., 1996). Vor allem T-Zellen des CD4⁺ und CD8⁺ Phenotyps wurden in CIDP beobachtet (Matsumuro et al., 1994; Van den Berg et al., 1995; Bosboom et al., 1999). Ebenso wurden Infiltrationen des peripheren Nervens durch Makrophagen nachgewiesen (Schmidt et al., 1996; Sommer et al., 2005). Die Expression von Klasse I und Klasse II MHC-Molekülen ist in Makrophagen hochreguliert (Pollard et al., 1986; Kiefer et al., 2001), was für eine erhöhte Antigenpräsentation spricht.

Sowohl T-Zellen als auch Makrophagen sezernieren den Tumornekrosefaktor α (TNF α). Dieses proinflammatorische Zytokin hat toxische Effekte auf Myelin, Endothelzellen und Schwann-Zellen (Selmaj und Raine, 1988). Misawa et al. (2001) fand bei 25% der getesteten CIDP-Patienten eine erhöhte TNF α -Konzentration im Serum. Eine intraneurale Injektion von TNF α führte in einer Studie von Redford et al. (1995) zur Demyelinisierung von Nervenfasern in Ratten und Mäusen und es konnte gezeigt werden, dass Anti-TNF α -Antikörper den Schweregrad von Symptomen in EAN reduzieren (Stoll et al., 1993). Einige Studien konnten eine Korrelation zwischen der TNF α -Konzentration im Serum bzw. Liquor und dem klinischen Schweregrad der CIDP nachweisen (Misawa et al., 2001), andere jedoch nicht (Meléndez-

Vásquez et al., 1997; Sivieri et al., 1997).

Des Weiteren wurden im Liquor von CIDP-Patienten erhöhte Konzentrationen von IL-6, -8 und -17 detektiert (Maimone et al., 1993; Mei et al., 2005). Diese proinflammatorischen Zytokine sind an der Stimulation der Antikörperausschüttung durch B-Zellen und der Induktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen beteiligt (IL-6). Sie rekrutieren Granulozyten und T-Zellen (IL-8), stimulieren die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (IL-17) und könnten so lokale Entzündungen bei der CIDP verstärken. Gleichzeitig zeigten CIDP-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere CSF-Konzentration von IL-4 und IL-5. Diese Zytokine hemmen die Aktivierung von Makrophagen und fördern die Entwicklung weiterer IL-4- und IL-5-sezernierender T-Zellen. In CIDP scheint ihre Funktion herabreguliert zu sein (Mei et al., 2005).

Hinweise auf eine entscheidende regulatorische Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) bei der Pathogenese der CIDP gab eine Studie von Andorfer et al. (2001). Anhand von Nervenbiopsien von CIDP-Patienten konnte nachgewiesen werden, dass NF- κ B hauptsächlich von Makrophagen exprimiert wurde und seine Expression im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant erhöht war. NF- κ B wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung von inflammatorischen, immunologischen und apoptotischen Reaktionen zugesprochen (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998; Tak und Firestein, 2001). Seine Aktivierung führt zu einer erhöhten Expression verschiedener Gene, die in einer vermehrten Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Matrix-Metalloproteinasen und Adhäsionsmolekülen resultiert (Barnes, 1997).

Bis heute ist nicht geklärt, gegen welches Antigen die T-Zell-Aktivität bei der CIDP gerichtet ist. Das periphere Myelinprotein 2 wird als potentiell Zielantigen der zellvermittelten Immunantwort diskutiert (Lin et al., 1982; Khalili-Shirazi et al., 1992; Sanvito et al., 2009), jedoch konnte dies nicht in allen Studien bestätigt werden (Zweiman et al., 1983; Taylor et al., 1991). Csurhes et al. (2005) konnte zwischen CIDP-Patienten und Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in der T-Zell-Reaktivität gegen die Myelinproteine 0 (P0), 1 (P1), 2 (P2) und 22 (PMP22) feststellen.

1.2.3 Humorale Immunantwort bei der CIDP - Aktueller Stand der Forschung

Die Beteiligung von Autoantikörpern an der Pathogenese der CIDP wird seit fast 30 Jahren diskutiert. Bis heute liefern Studien keine eindeutigen Befunde bezüglich des Zielantigens bei der CIDP. Die Tabellen 1.1 und 1.2 geben einen Überblick über die entsprechende Literatur.

Antigen	Positive CIDP-Patienten	Studie
Myelinproteine	22%	Latov et al. (1981)
	0%	Hughes et al. (1984)
	2%	McCombe et al. (1988)
	51%	Vedeler et al. (1988)
	25%	Allen et al. (2005)
P0	0% IgG, 16% IgM	Khalili-Shirazi et al. (1993)
	7,5% IgG, 5% IgM	Meléndez-Vásquez et al. (1997)
	29% IgG, 5% IgM	Yan et al. (2001)
P2	9%	Hughes et al. (1984)
	12% IgG, 34% IgM	Khalili-Shirazi et al. (1993)

Tabelle 1.1: Anteil der CIDP-Patienten, die in der jeweiligen Studie Antikörper gegen periphere Myelinproteine aufwiesen.

In frühen Experimenten wurden bei 0-51% der CIDP-Patienten Antikörper gegen peripheres Myelin nachgewiesen (Latov et al, 1981; Hughes et al., 1984; McCombe et al., 1988; Vedeler et al., 1988). Darauf folgende Studien fokussierten sich auf die peripheren Myelinproteine P0, P2 und PMP22, da sie in der Lage sind, EAN in Ratten zu induzieren (Milner et al., 1987; Gabriel et al., 1998; Zhu et al., 2001). Des Weiteren zeigte eine Studie von Yan et al. (2000), dass intraneural injiziertes Serum oder IgG von Patienten mit CIDP zu einer verminderten Leitfähigkeit der Nerven bei Ratten führte und Demyelinisierung induzierte. Dies deutete ebenfalls auf eine Beteiligung von Anti-Myelin-Autoantikörpern an der Pathogenese der CIDP hin. Allen et al. (2005) konnten durch *Westernblots* bei 25% der getesteten CIDP-Patienten IgG-

oder IgA-Antikörper gegen periphere Myelinproteine nachweisen. Am häufigsten trat eine Reaktion mit dem 28 kDa-Protein P0, dem Hauptstrukturprotein des peripheren Myelins, auf. Meléndez-Vásquez et al. (1997) wiesen durch *Immunoblots* in drei von 40 Patientenseren IgG- und in zwei von 40 IgM-Antikörper gegen das Protein P0 nach. Yan et al. (2001) beobachteten in *Westernblots* bei sechs von 21 Patientenseren IgG-Antikörper und bei einem von 21 Patientenseren IgM-Antikörper gegen P0. Eine weitere Studie konnte wiederum keine IgG-, jedoch IgM-Antikörper gegen P0 in fünf von 32 Patientenseren nachweisen. Hier traten außerdem bei 34% der Patienten IgM-Antikörper und bei 12% IgG-Antikörper gegen P2 auf und waren damit häufiger als Antikörper gegen P0 (Khalili-Shirazi et al., 1993). Inglis et al. (2007) konnten bei CIDP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen keine signifikant erhöhten IgG-Level gegen Einzelpeptide von P2 und P0 nachweisen. Das prozentuale Vorkommen von CIDP-Patienten mit Antikörperaktivität gegen Peptide der beiden peripheren Myelinproteine und ihr Titer lagen im Bereich der Kontrollgruppe. Ähnliche Beobachtungen machten auch Sanvito et al. (2009). Das Vorkommen von IgM-Antikörpern gegen Einzelpeptide von P0, P2 und PMP22 unterschied sich nicht signifikant zwischen CIDP-Patienten, gesunden Kontrollen und Patienten mit nicht-immunvermittelten Neuropathien. Die Reaktion von IgG-Antikörpern mit P0, P2 oder PMP22 trat häufiger auf als beim IgM, jedoch gab es auch hier keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollgruppen. Die verschiedenen Studien lassen bisher keine sichere Aussage über die Wichtigkeit von peripheren Myelinproteinen als Zielantigene bei der Pathogenese der CIDP zu und bedürfen weiterer Klärung.

Weitere Studien fokussierten sich bei der Suche potentieller Antigene der CIDP auf Ganglioside. Diese Klasse der Glykosphingolipide ist im Nervensystem der Vertebraten hoch angereichert und wurde bereits mit der Entstehung anderer Neuropathien, wie dem Miller-Fisher-Syndrom (MFS), in Zusammenhang gebracht (Chiba et al., 1992; Yuki et al., 1993; Buchwald et al., 1998; Buchwald et al., 2001). Die Funktion von Gangliosiden im Nervensystem konnte noch nicht vollständig geklärt werden, jedoch wird ihnen unter anderem eine wichtige Rolle bei der synaptischen Transmission zugesprochen. Während Studien bei 30-80% der Patienten mit einer multifokalen motorischen Neuropathie (MMN) Antikörper gegen das Gangliosid GM1 fanden (Hughes et al., 2006), konnte dies bei Patienten mit klassischer CIDP seltener beobachtet werden. Simone et al. (1993) konnten nur bei 10% der getesteten

CIDP-Patientenseren IgG-Antikörper, aber keine IgM-Antikörper gegen GM1 nachweisen. van Schaik et al. (1994) fanden bei 23% der CIDP-Patienten IgG-, bei 7% IgM- und bei 14% IgA-Antikörper gegen GM1. Yuki et al. (1996) detektierten nur bei 3% der Patienten IgG- und bei 17% IgM-Antikörper gegen GM1. Ähnliches berichteten auch Meléndez-Vásquez et al. (1997). Auch andere Ganglioside, wie das Hauptgangliosid des peripheren Myelins LM1, wurden untersucht, jedoch blieb auch ihre Beteiligung an der Pathogenese der CIDP ungeklärt. Das Vorkommen von Anti-LM1-Antikörpern variierte zwischen den Studien von 5-67% (Fredman et al, 1991; Ilyas et al., 1992; Meléndez-Vásquez et al., 1997).

Ebenso traten bei CIDP-Patienten Antikörper gegen Sulfatide, eine Hauptkomponente der sauren Glykosphingolipide im Myelin, nicht signifikant häufiger auf als bei Kontrollgruppen (Ilyas et al., 1991; Pestronk et al., 1991; Ilyas et al., 1992; Meléndez-Vásquez et al., 1997). Eine Ausnahme war die Studie von Fredman et al. (1991), mit 87% Anti-Sulfatid-Antikörper positiven CIDP-Patienten.

Widersprüchliche Ergebnisse ergab auch die Suche nach Autoantikörpern gegen das periphere Sphingolipid SGPG (Sulphatiertes Glucuronylparaglobosid). Während Ilyas et al. (1991; 1992) nur bei 0-7% der CIDP-Patienten Antikörper gegen SGPG nachweisen konnten, detektierten Yuki et al. (1996) bei 40% anti-SGPG-IgM-Antikörper. Welche Rolle die verschiedenen Sphingolipide bei der Entwicklung von CIDP spielen, bleibt zu klären und bedarf weiterer Forschung.

Während sich in den letzten Jahren eine Vielzahl von Studien auf Bestandteile des peripheren Myelins als Zielantigen der CIDP fokussierte, konnten Kwa et al. (2003) in Zellkulturen nachweisen, dass 26% der getesteten CIDP-Seren IgG-Antikörper gegen Strukturen humaner, nichtmyelinisierender Schwann-Zellen enthielten. Dies deutet darauf hin, dass nicht nur Myelinkomponenten, sondern auch andere Proteine als Antigene in Frage kommen und näher untersucht werden sollten.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass humorale Faktoren an der Pathogenese der CIDP beteiligt sind, in welchem Ausmaß bleibt jedoch zu klären. Die Variabilität der Studienergebnisse spiegelt auch die Variabilität des Krankheitsbildes zwischen einzelnen Patienten wider. Bisher ist es nicht gelungen, ein spezifisches Zielantigen zu identifizieren, das die Diagnose der CIDP unterstützen und zur Entwicklung neuer Therapien beitragen könnte. Vielmehr scheint eine Vielzahl von Bestandteilen des PNS als Angriffsort für Autoantikörper in Frage zu kommen.

Antigen	Positive CIDP-Patienten	Studie
Ganglioside		
GM1	10% IgG, 0% IgM	Simone et al. (1993)
	23% IgG, 7% IgM, 14% IgA	van Schaik et al. (1994)
	3% IgG, 17% IgM	Yuki et al. (1996)
	0% IgG, 15% IgM	Meléndez-Vásquez et al. (1997)
LM1	67% IgG	Fredman et al. (1991)
	13% IgG	Ilyas et al. (1992)
	10% IgG, 5% IgM	Meléndez-Vásquez et al. (1997)
Sulfatide	87% IgG	Fredman et al. (1991)
	7%	Ilyas et al. (1991)
	0%	Pestronk et al. (1991)
	0%	Ilyas et al. (1992)
	3% IgG, 0% IgM	Meléndez-Vásquez et al. (1997)
SGPG	7%	Ilyas et al. (1991)
	0%	Ilyas et al. (1992)
	3% IgG, 40% IgM	Yuki et al. (1996)

Tabelle 1.2: Anteil der CIDP-Patienten, die in der jeweiligen Studie Antikörper gegen Glykolipide aufwiesen.

1.3 Die motorische Endplatte

1.3.1 Aufbau der motorischen Endplatte

Die motorische Endplatte wird der Gruppe der chemischen Synapsen zugeordnet. Ihre Signaltransduktion erfolgt über den Transmitter Acetylcholin (ACh). Sie besteht aus drei Hauptkomponenten: der präsynaptischen Nervterminalen, dem synaptischen Spalt und der spezialisierten postsynaptischen Membran des Muskels (Abb. 1.1). Die Präsynapse ist gekennzeichnet durch die Anreicherung synaptischer Vesikel im Bereich der aktiven Zonen. Dies ist der Bereich der präsynaptischen Membran, in dem die Vesikel mit der Zellmembran fusionieren und Acetylcholin in den syn-

aptischen Spalt entlassen. Hier sind spannungsabhängige Calciumkanäle des P/Q- und N-Typs lokalisiert. Charakteristisch für die Präsynapse ist eine große Anzahl an Mitochondrien, die Energie für die Neurotransmittersynthese, den Ionentransport und den Transport von Acetylcholin in die Vesikel liefern. Der Mechanismus, der der Vesikelfusion unterliegt, involviert sowohl Proteine der Vesikelmembran als auch der präsynaptischen Membran. Die Vesikelexozytose hängt von der Bildung des SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Komplexes ab, in dem die Proteine Syntaxin-1 und SNAP 25 (*synaptosome-associated protein*) der präsynaptischen Membran mit dem Protein Synaptobrevin der Vesikelmembran interagieren. Die Erkennung des Calciumsignals zur Fusion wird durch Synaptotagmin, ein Ca^{2+} -bindendes Protein der Vesikelmembran, gewährleistet. Sobald Calcium in die Präsynapse einströmt, bindet Ca^{2+} an den Calciumsensor Synaptotagmin. Dies führt zu einer Konformationsänderung des SNARE-Komplexes, zur Fusion der Vesikel- und der präsynaptischen Membran und zur Freisetzung von Acetylcholinmolekülen in den synaptischen Spalt (Catterall und Few, 2008).

Der synaptische Spalt separiert die Plasmamembran der Nervenendigung und der Muskelfaser. Seine Breite beträgt etwa 50-70 nm und ermöglicht so eine schnelle Diffusion der Acetylcholinmoleküle von der Prä- zur Postsynapse. In der Basallamina, die den synaptischen Spalt durchspannt, ist eine große Anzahl von Acetylcholinesterasen verankert, die für die Hydrolyse von Acetylcholinmolekülen verantwortlich sind. Bis zu 50% der freigesetzten Transmittermoleküle werden hydrolysiert bevor sie die postsynaptischen Rezeptoren erreichen. Die restlichen Acetylcholinmoleküle binden an die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, dissoziieren und werden umgehend von Acetylcholinesterasen inaktiviert.

Die postsynaptische Region der motorischen Endplatte ist durch Einstülpungen der Membran gekennzeichnet (*junctional folds*), die zu einer Vergrößerung der postsynaptischen Oberfläche führen. Acetylcholinrezeptoren sind auf den Spitzen der Einstülpungen konzentriert (Flucher und Daniels, 1989). Während hier 15000-20000 Rezeptoren pro μm^2 lokalisiert sind, ist ihre Konzentration außerhalb der Synapsenregion um ein 1000-faches geringer. Innerhalb der postsynaptischen Membraneinstülpungen sind spannungsabhängige Natriumkanäle angereichert, die die Generierung von Aktionspotentialen gewährleisten (Caldwell et al., 1986; Flucher und Daniels, 1989).

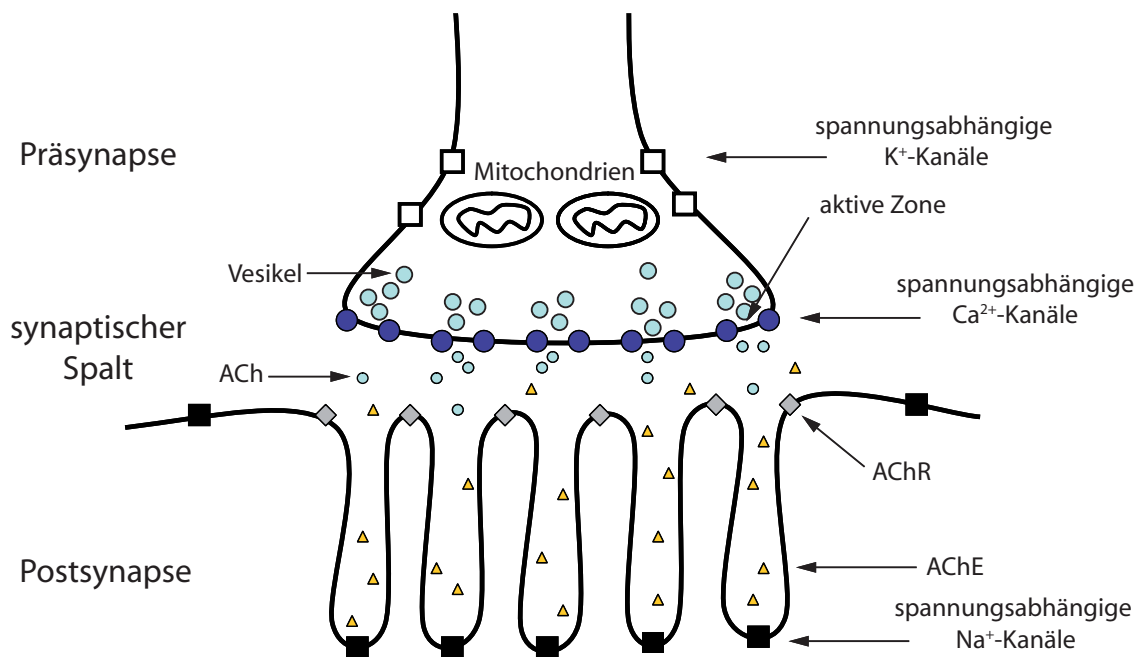


Abbildung 1.1: Allgemeiner Aufbau der motorischen Endplatte. Die Nervterminale enthält Mitochondrien zur Energiebereitstellung für die Acetylcholin synthese und die Verpackung von Acetylcholin in synaptische Vesikel. Sobald ein eintreffendes Aktionspotential die Nervenendigung depolarisiert, öffnen sich spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle und Vesikel fusionieren innerhalb der aktiven Zonen mit der präsynaptischen Membran. Die Transmittermoleküle werden in den synaptischen Spalt entlassen, der, ebenso wie die postsynaptischen Membraneinstülpungen, reich an Acetylcholinesterasen (AChE) ist. Auf den Spitzen der postsynaptischen Membraneinstülpungen sind Acetylcholinrezeptoren (AChR) hochkonzentriert lokalisiert. Anreicherungen von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen befinden sich stattdessen in der Tiefe der Einstülpungen.

Die Ausrichtung der präsynaptischen aktiven Zonen in Bezug auf die Einstülpungen der postsynaptischen Membran, sowie die hochkonzentrierte Lokalisation der Acetylcholinrezeptoren und die Verteilung der Acetylcholinesterasen im synaptischen Spalt und den Einstülpungen, gewährleisten eine effektive Interaktion zwischen Acetylcholinquanten und der postsynaptischen Membran. Die AcetylcholinKonzentration ist am höchsten in der Region, in der die Exozytose stattfindet und nimmt graduell mit der Diffusion über den synaptischen Spalt ab, was zum einen an einer Transmitterdiffusion aus dem synaptischen Spalt und zum anderen an ihrer Hydrolyse durch Acetylcholinesterasen liegt. Da sich die Acetylcholinrezeptoren auf den Spitzen der Membraneinstülpungen befinden, ist die Distanz, die Acetylcholinmoleküle überwinden müssen, gering. Daher ist ihre Konzentration (ca. 3 mM) beim Eintreffen an der Postsynapse ausreichend um die Rezeptoren zu aktivieren. Sobald die Transmittermoleküle von den Acetylcholinrezeptoren dissoziieren, diffundieren sie in den synaptischen Spalt und die postsynaptischen Membraneinstülpungen und werden dort von Acetylcholinesterasen hydrolysiert. Die Konzentration der Acetylcholinesterasen ist besonders hoch innerhalb der postsynaptischen Membraneinstülpungen. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Terminierung der Acetylcholinaktivität und verhindern eine repetitive Aktivierung der Rezeptoren durch das Acetylcholin.

1.3.2 Die neuromuskuläre Transmission

Der allgemeine Mechanismus, der der neuromuskulären Transmission zu Grunde liegt, kann folgendermaßen zusammengefasst werden: Ein eintreffendes Aktionspotential führt zu einer Depolarisation der präsynaptischen Nervenendigung und zur Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Der Einstrom von Calcium in die Nervterminale erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass transmittergefüllte Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusionieren und Acetylcholin in den synaptischen Spalt entlassen wird. Die Transmittermoleküle diffundieren über den synaptischen Spalt und binden an postsynaptische nikotinische Acetylcholinrezeptoren oder werden zuvor durch Acetylcholinesterasen hydrolysiert. Die Bindung des Transmitters führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren und zur Öffnung ihrer Ionenporen, die permeabel für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} -Ionen sind. Der Strom, der durch die Kanäle des Acetylcholinrezeptors fließt, wird als Endplattenstrom bezeichnet,

das Potential, das er generiert, als Endplattenpotential (EPP). Die Öffnungszeit der Kanäle beträgt etwa 1 ms. Der Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Postsynapse führt zur Depolarisation der Muskelfasermembran. Überschreitet diese Depolarisation einen Schwellenwert, werden spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet und ein Aktionspotential generiert. Dadurch kommt es zur Kontraktion der Muskelfaser.

Die physiologischen Studien von del Castillo und Katz (1954) beschrieben erstmals die Hypothese, dass die Freisetzung von Acetylcholin von der präsynaptischen Nervenendigung in Quanten erfolgt. Aufgrund von elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass diese Quanten in der Präsynapse in Form von Vesikeln vorliegen, die jeweils 6000-10000 Acetylcholinmoleküle enthalten und diese unabhängig von einander in den synaptischen Spalt entlassen. Die Antwort, die ein freigesetztes Quantum des Transmitters in der Postsynapse auslöst, wird als Miniaturendplattenpotential (MEPP) bezeichnet. Ein evoziertes Endplattenpotential stellt daher die additive Depolarisation dar, die durch eine synchrone Quantenausschüttung von mehreren hundert Vesikeln generiert wird (Martyn et al., 2009). Anhand der Amplituden der MEPPs lassen sich Rückschlüsse über die Grösse eines Quantums ziehen. Die Hauptverteilung der MEPP-Amplituden an einer einzelnen motorischen Endplatte entspricht typischerweise einer Gauss'schen Verteilung. Die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Quantenfreisetzung von der Präsynapse erfolgt, wird durch eine Poissonverteilung widergespiegelt. Dies ermöglicht die Berechnung der durchschnittlich freigesetzten Quanten pro Stimulus, des so genannten *quantal contents*, der als Indikator der präsynaptischen Funktion gilt.

1.3.3 Die Rolle des P/Q-Typ Calciumkanals bei der neuromuskulären Transmission

Die präsynaptische Freisetzung von Acetylcholinquanten ist abhängig vom Calciumeinstrom in die Nervenendigung (Katz und Miledi, 1965). Zahlreiche Studien konnten nachweisen, dass der P/Q-Typ Calciumkanal (auch bekannt als Cav2.1) für die Acetylcholinfreisetzung an der motorischen Endplatte verantwortlich ist und seine Hemmung durch ω -Agatoxin IVA zu einer fast vollständigen Blockade der Transmitterausschüttung führt (Katz et al., 1996; Protti et al., 1996; Urbano et al., 2008).

Elektrophysiologische Untersuchungen an Mäusen mit fehlender $\alpha 1A$ -Untereinheit des P/Q-Typ Calciumkanals zeigten, dass N- und R-Typ Calciumkanäle das Fehlen des P/Q-Typ Kanals teilweise kompensieren konnten, jedoch kam es im Vergleich zu Kontrollmäusen zu einer signifikanten Reduktion des *quantal contents* (Urbano et al., 2003).

Die Beteiligung von spannungsabhängigen Calciumkanälen, insbesondere des P/Q-Typ Calciumkanals, an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen konnte am Beispiel des Lambert-Eaton-Myasthenischen Syndroms (LEMS) nachgewiesen werden. Patienten mit dieser Autoimmunkrankheit besitzen Antikörper gegen P/Q-Typ Calciumkanäle (Lennon et al., 1995) und Subtypen von spannungsabhängigen Calciumkanälen. Diese Antikörper werden für die Zerstörung der präsynaptischen aktiven Zonen, in denen P/Q-Typ Calciumkanäle lokalisiert sind, und die daraus resultierende Veränderung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung in Form einer reduzierten Anzahl von freigesetzten Acetylcholinquanten pro Nervimpuls verantwortlich gemacht (Fukunaga et al., 1983; Fukuoka et al., 1987; Nagel et al., 1988). Weitere Studien konnten nachweisen, dass die Bindung der Autoantikörper an P/Q-Typ Calciumkanäle zu einer Reduktion ihrer Expression führte (Verschuuren et al., 1998). Eine Studie von Buchwald et al. (2005) zeigte, dass die Applikation von LEMS-IgG zu einer Reduktion der Quantenfreisetzung an der motorischen Endplatte von Mäusen führte. Dieser Effekt könnte aus einer direkten, Antikörper-vermittelten Blockade von Calciumkanälen resultieren.

P/Q-Typ Calciumkanäle werden auch mit der Pathogenese der akuten motorischen axonalen Neuropathie (AMAN), einer klinischen Variante des GBS, in Zusammenhang gebracht. Patienten mit dieser Neuropathie weisen charakteristischerweise IgG-Antikörper gegen die Ganglioside GM1 und GD1a auf. Eine Studie von Buchwald et al. (2007) deutet darauf hin, dass monoklonale Antikörper gegen GM1 und GD1a den Calciumeinstrom durch P/Q-Typ Calciumkanäle in kultivierte Neurone blockiert und zu einer Abnahme des *quantal contents* an der motorischen Endplatte von Mäusen führt. Dies könnte einen Mechanismus für eine Antikörper-vermittelte Muskelschwäche bei der AMAN darstellen und entscheidende Hinweise auf die Entstehung motorischer Schwächen in klinisch verwandten Autoimmunerkrankungen, wie GBS und CIDP, geben.

1.3.4 Die motorische Endplatte als Modell zur Untersuchung autoimmuner Erkrankungen

Um Einblicke in die Mechanismen, die der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu Grunde liegen, zu gewinnen, werden geeignete experimentelle Modelle benötigt. Im PNS kommen als mögliche Angriffsorte für pathogene Antikörper die Nervenwurzel, der Ranvier'sche Schnürring und die motorische Endplatte in Frage. Die motorische Endplatte gilt als ein etabliertes Modell zur Untersuchung neurologischer Autoimmunerkrankungen, da ihr die elektrische Isolierung durch Myelinscheiden und die Blut-Nerv-Schranke fehlen. Dies ermöglicht den freien Zugang von pathogenen Antikörpern und ihre direkte Interaktion mit der Synapse. Maßgebliche pathophysiologische Erkenntnisse über die Entstehung von Myasthenia gravis, LEMS, Neuromyotonie und GBS wurden durch Experimente an der motorischen Endplatte gewonnen. So konnten Autoantikörper gegen präsynaptische P/Q-Typ Calciumkanäle (LEMS), spannungsabhängige Kaliumkanäle (Neuromyotonie) oder postsynaptische Acetylcholinrezeptoren (Myasthenia gravis) als Ursache der ausgebildeten Muskelschwäche identifiziert und ihr Mechanismus genauer aufgeklärt werden (Goodman, 2008). Auch die Beteiligung von humoralen Faktoren an der Pathogenese des GBS und seiner Varianten konnte anhand von Studien an der motorischen Endplatte von Mäusen bestätigt werden (Buchwald et al., 1998; Buchwald et al., 2001). Ob humorale Faktoren auch bei der CIDP eine Rolle spielen, wird bis heute diskutiert. Aufgrund der erfolgreichen Forschungsergebnisse zum GBS und den oben genannten Autoimmunerkrankungen stellt die motorische Endplatte wahrscheinlich ebenfalls ein geeignetes Modell zur Aufklärung der bei der CIDP beteiligten Mechanismen, die der auftretenden Muskelschwäche zu Grunde liegen, dar. Mögliche Interaktionen von pathogenen Antikörpern mit Komponenten des PNS könnten dadurch aufgeklärt werden und zur Entwicklung neuer Therapien beitragen.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Hauptfragestellung dieser Arbeit war, ob und gegebenenfalls welche Rolle humorale Faktoren bei der Pathogenese von CIDP und der damit verbundenen Muskelschwäche spielen. Zur Aufklärung dieser Frage wurde der Effekt von IgG-Fractionen

von CIDP-Patienten auf die neuromuskuläre Transmission untersucht. Dies geschah an Zwerchfellpräparaten von Mäusen. Die motorische Endplatte stellt ein etabliertes Modell für die Untersuchung neurologischer Autoimmunerkrankungen dar, da sie aufgrund ihrer fehlenden Myelinscheiden und Blut-Nerv-Schranke gut zugänglich für Antikörper ist. Außerdem weist sie eine hohe Exprimierung an Gangliosiden auf, deren Beteiligung an der Entstehung anderer Autoimmunerkrankungen bereits nachgewiesen werden konnte. Mit Hilfe der *Macro-Patch-Clamp*-Technik sollte der Effekt von aufgereinigtem CIDP-IgG von zehn Patienten auf die prä- und postsynaptische Funktion charakterisiert werden. Zusätzliche *Calcium-Imaging*-Versuche in neuronalen Zellkulturen sollten Aufschluss über eine mögliche Interaktion von CIDP-IgG mit spannungsabhängigen Calciumkanälen geben.

Ein weiteres Ziel war die Identifizierung möglicher Antigene bei der CIDP. Bis heute konnte nicht eindeutig geklärt werden, gegen welche Strukturen die Autoantikörper gerichtet sind. Viele Studien weisen darauf hin, dass periphere Myelinproteine und Ganglioside als Antigene in Frage kommen, jedoch auch nur bei einer begrenzten Zahl der getesteten Patienten. In der vorliegenden Arbeit wurde das Material von CIDP-Patienten auf Anti-Gangliosid-Antikörper getestet und zusätzlich mit Hilfe von *Westernblots* analysiert.

Des Weiteren sollten mögliche Wirkmechanismen etablierter Therapien, wie die Interaktion zwischen therapeutisch eingesetzten Immunoglobulinen und den Antikörpern von CIDP-Patienten, untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und aufgereinigtes IgG

In allen Experimenten wurde aufgereinigtes IgG von Patienten mit klassischer CIDP verwendet. Die Diagnose erfolgte anhand klinischer Standardkriterien (Ad Hoc Subcommittee, 1991) am Universitätsklinikum Würzburg. Patienten im Alter von 19 bis 71 Jahren, davon neun männlich und zwei weiblich, wurden in diese Studie einbezogen. Klinische elektrophysiologische Untersuchungen zeigten bei allen Patienten deutliche Einschränkungen der Nervenleitgeschwindigkeit (NLG), der distalen motorischen Latenz (DML) oder des motorischen Summenaktionspotentials (CMAP, *compound muscle action potential*). Bei Patient 5 wurde zusätzlich zur CIDP ein IgG- λ -Plasmozytom mit assoziierter Amyloidose diagnostiziert. Patient 7 wies neben der CIDP eine IgG- λ -Paraproteinämie auf. Von Infektionen oder Impfungen, die dem Ausbruch der CIDP-Symptome vorausgingen, wurde bei Patient 3, 9 und 10 berichtet. Tabelle 2.1 fasst die wichtigsten Patientendaten zusammen.

Das Plasmafiltrat der Patienten wurde aus therapeutischen Plasmapheresen gewonnen. Für die hier durchgeführten Experimente wurde das Material der ersten Plasmapherese verwendet und die IgG-Fraktionen mittels Affinitätschromatographie aus dem Plasmafiltrat der Patienten isoliert. Durch mehrfaches Waschen und Dialyse wurden die IgG-Fraktionen von Komplementfaktoren und niedermolekularen Komponenten befreit und anschließend lyophilisiert. Die Aufbewahrung der IgG-Proben erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C .

Als Kontroll-IgG für die hier durchgeführten Experimente wurde das kommerziell erwerbliche IVIg Sandoglobulin (CSL Behring, Bern, Schweiz) verwendet. Sandoglobulin enthält aufgereinigtes menschliches Immunoglobulin, das aus einem Plasmapool von über 1000 gesunden Spendern gewonnen wird. Es besteht aus mindestens 95% IgG. Die Subklassenverteilung und die Struktur der Antikörper entsprechen physiologischen Verhältnissen.

Patient	Alter	Geschlecht	NLG [m/s]	DML [ms]	CMAP [mV]
1	71	w	42	8,8	0,6
2	23	m	nb	nb	nb
3	44	m	26	8,8	0,7
4	34	m	23	5,2	1,73
5	63	m	na	na	na
6	55	m	na	na	na
7	59	m	9	11,2	0,7
8	58	w	nb	nb	nb
9	19	m	10	8,8	0,3
10	60	m	12	14,8	0,13
11	58	m	na	na	na

Tabelle 2.1: Übersicht der klinischen Patientendaten. w = weiblich; m = männlich; NLG = Nervenleitgeschwindigkeit; DML = distale motorische Latenz; CMAP = motorisches Summenaktionspotential (*compound muscle action potential*); na = nicht ableitbar; nb = nicht bekannt. Die Normalwerte zur pathologischen Grenze sind: NLG ≥ 40 m/s, DML ≤ 6 ms, CMAP ≥ 5 mV, angegeben für den *Nervus tibialis*.

2.2 Elektrophysiologische Messungen

2.2.1 Präparation des Zwerchfells

Alle Experimente wurden an weiblichen 6-13 Wochen alten Mäusen des Stammes BALB/cAnNCrI durchgeführt (Charles River, Sulzfeld, Deutschland).

Für die Präparation des Zwerchfells wurden die Mäuse mit Isofluran (Abbott GmbH und Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) narkotisiert und mit einer Guillotine dekapitiert. Zur Freilegung des Bauchraums wurde mit einer Schere ein Schnitt entlang der Körperlängsachse durchgeführt und die Wirbelsäule unterhalb des Brustkorbs durchtrennt. Mit einem weiteren Schnitt ins Sternum wurde das Zwerch-

fell samt Rippenbogen entfernt und bei Raumtemperatur (22-25 °C) in Carbogenbegastem (95% O₂, 5% CO₂) Bretag-Puffer (Bretag, 1969) übertragen. Die Inkubationszeit bis zum Beginn der Messung betrug eine Stunde. Der Bretag-Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 107,7 mM NaCl, 3,48 mM KCl, 0,69 mM MgSO₄, 26,2 mM NaHCO₃, 1,67 mM NaH₂PO₄, 1,53 mM CaCl₂, 9,64 mM Natriumgluconat, 5,55 mM D-Glucose, 7,6 mM Saccharose (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Der pH-Wert lag bei 7,4.

2.2.2 *Macro-Patch-Clamp-Technik*

Zur Messung von exzitatorischen postsynaptischen Strömen (*quantal excitatory postsynaptic currents*, qEPSCs) an der motorischen Endplatte, wurde das präparierte Zwerchfell in einer Messkammer fixiert. Die Versorgung des Muskels mit frischem, Carbogenbegastem Bretag-Puffer wurde durch eine geschlossene Zirkulation gewährleistet. Das Zirkulationsvolumen betrug ca. 15 ml. Die Ableitung der qEPSCs erfolgte bei Raumtemperatur (22-25 °C) mit Hilfe der perfundierten *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode (Dudel, 1989). Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 2.1 und 2.2 dargestellt. Die Öffnung der Glaselektrode betrug im Durchmesser ca. 10 µm und umfasste damit einen kleinen Bereich der prä- und postsynaptischen Membran, sowie der terminalen Schwann-Zelle. Im Inneren beinhaltete sie zwei chlorierte Silberdrähte, einen zur Stimulation und einen zur Ableitung der qEPSCs. Zusätzlich war die *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode mit einem dünnen Schlauch ausgestattet, der es ermöglichte, die Spitze der Elektrode mit Elektrodenpuffer (in mM: 162 NaCl, 5,3 KCl, 0,67 NaH₂PO₄, 0,22 KH₂PO₄, 5,6 D-Glucose, 2 CaCl₂ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 15 HEPES (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland)) oder den zu untersuchenden, in Elektrodenpuffer gelösten Immunoglobulinen zu perfundieren. Dies geschah mittels Druckluft. Über einen zweiten Schlauch konnte die überschüssige Perfusionsflüssigkeit abfließen. Diese Methode machte es möglich, an einer gegebenen motorischen Endplatte gleichzeitig zu stimulieren, die Antworten abzuleiten und das zu untersuchende Material zu applizieren, ohne die Position der Elektrode zu verändern.

Sowohl dem Bretag- als auch dem Elektrodenpuffer wurde der Natriumkanalblocker Tetrodotoxin (TTX; 200 nM; Ascent Scientific Ltd., Bristol, Großbritannien) beigegeben, um Kontraktionen des Muskels zu verhindern. Die Elektrode wurde auf

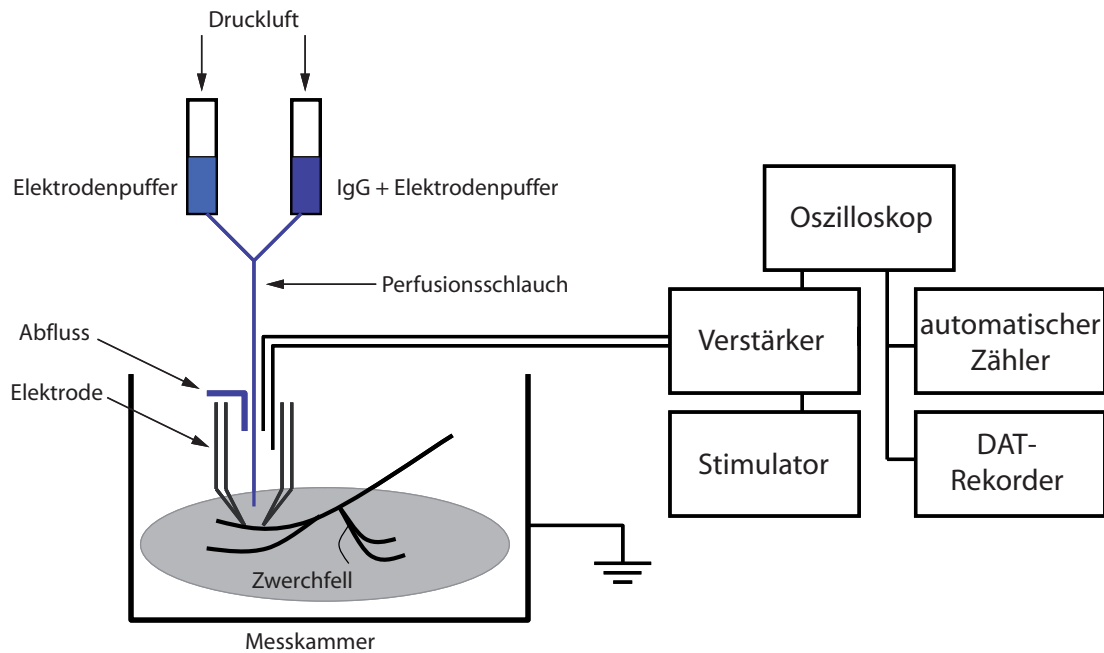


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Das präparierte Zwerchfell der Maus wird in einer Messkammer fixiert. Die *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode liegt auf dem Muskel auf und wird im Bereich einer motorischen Endplatte positioniert. Die Spitze der Elektrode kann über einen Schlauch mittels Druckluft mit Elektrodenpuffer oder IgG perfundiert werden. Die durch Stimulation erzeugten qEPSCs werden für jedes Stimulationsintervall von 2^8 Stimulationen gezählt und zur weiteren Bearbeitung gespeichert.

das Zwerchfell aufgesetzt und ihre Position solange verändert, bis evozierte Signale auf dem Oszilloskop (HAMEG Instruments, Mainhausen, Deutschland) registriert werden konnten. Die Stimulation erfolgte mit 5 Hz, wobei die Dauer jedes Stimulationspulses 1 ms betrug. Die abgeleiteten Signale wurden bei 5 kHz tiefpassgefiltert.

Zur Messung der präsynaptischen Aktivität wurde die Anzahl der freigesetzten qEPSCs innerhalb eines Zeitfensters von 6 ms nach Stimulation und pro Stimulationsintervall von 2^8 Stimulationen mit Hilfe eines automatischen Zählers bestimmt. Unter Verwendung der Poisson-Formel $m = \ln(n/n_0)$ konnte der sogenannte *quantal content* m berechnet werden, der als Maß für die präsynaptische Transmitterfreisetzung dient. Dabei galt n als Gesamtanzahl der Stimulationen pro Stimulationsintervall (2^8) und n_0 als Anzahl der Stimulationen pro Intervall, auf die keine Quantenfreisetzung folgte (*failures*). Abbildung 2.3 zeigt die Originalableitung eines

qEPSCs.

Zur Auswertung der qEPSC-Amplituden, die als Maß der postsynaptischen Funktion dienen, wurden die Daten mit einem DAT-Rekorder (Sony, Tokio, Japan) gespeichert und nach Abschluss des Experiments mit einem kommerziell erwerblichen Computerprogramm (ISO 2, Mfk, Niedernhausen, Deutschland) analysiert. Für die weitere statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA), Origin (MicroCal, Northhampton, USA) und SigmaStat (Systat Software, Inc., Point Richmond, USA) benutzt. Bei einer Normalverteilung der Daten wurde die statistische Signifikanz durch einen *Student's t-test*, ansonsten durch einen *Mann-Whitney Rank Sum Test* bestimmt. Als statistisch signifikant galt $p < 0,05$. Der Standardfehler wird in der vorliegenden Arbeit als SEM (*standard error of the mean*) angegeben.

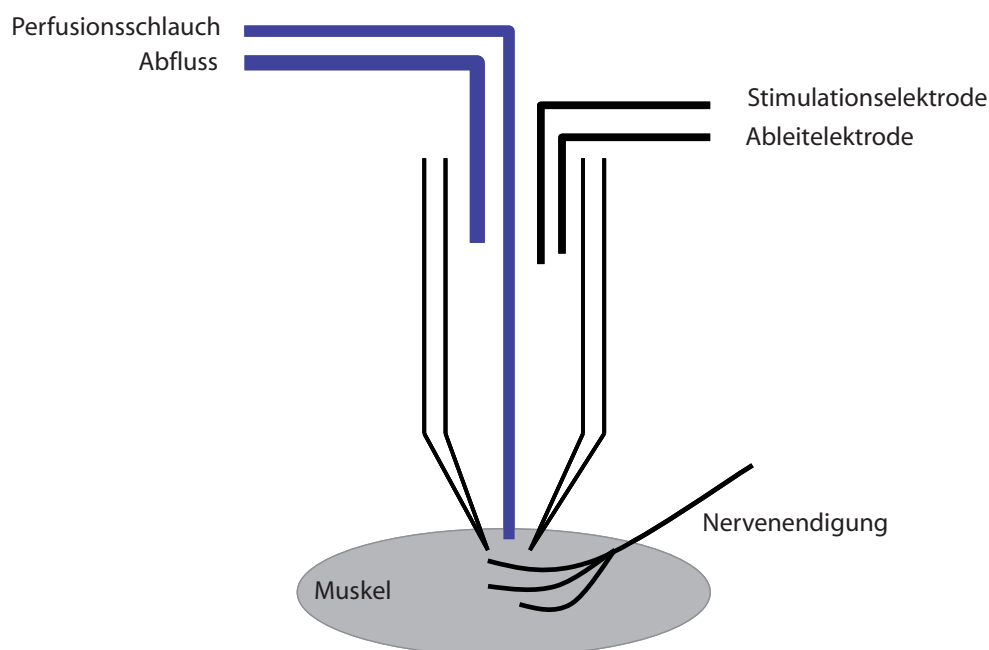


Abbildung 2.2: Die *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode ist mit zwei chlorierten Silberdrähten ausgestattet, einen zur Stimulation und einen zur Ableitung der qEPSCs. Zusätzlich enthält sie einen feinen Schlauch, der es ermöglicht, die Spitze der Glaselektrode mit der zu untersuchenden Substanz zu perfundieren. Ein weiterer Schlauch führt die überschüssige Flüssigkeit ab, so dass die Glaselektrode ständig mit frischem Material versorgt wird.

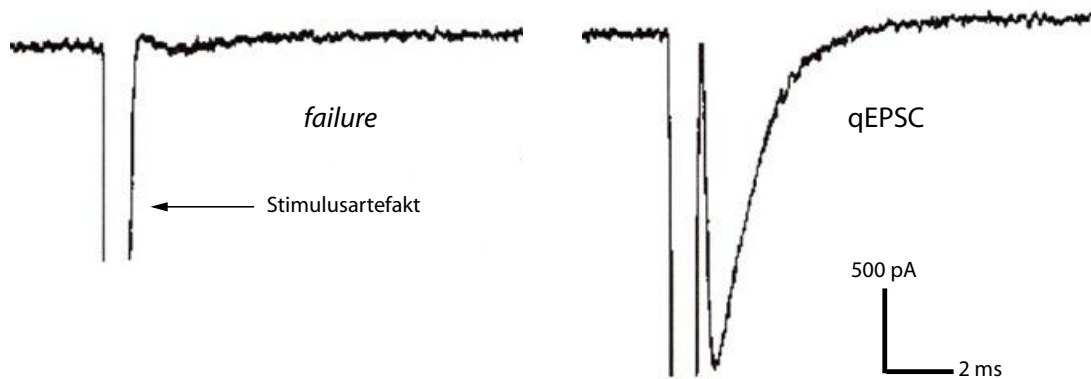


Abbildung 2.3: Originalableitung mit der *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode. Der Stimulationsstrom erzeugt ein zum Teil kompensiertes Stimulusartefakt, auf das ein qEPSC oder keine Quantenfreisetzung (*failure*) folgt. Die Amplitude eines qEPSCs gilt als Maß der postsynaptischen Funktion, der *quantal content* als Maß der präsynaptischen Transmitterfreisetzung.

2.2.3 Versuchsablauf

Zu Beginn jedes Experiments wurde die Elektrode optimal positioniert und der Stimulationsstrom ($0,1$ bis $0,9 \mu\text{A}$) so eingestellt, dass der *quantal content* bei ungefähr $0,5$ Quanten pro Puls lag. Damit war gewährleistet, dass nach Applikation des Patientenmaterials sowohl ein möglicher Abfall als auch ein Anstieg der Quantenfrequenz registriert werden konnte und genügend Spielraum in beiden Richtungen vorhanden war. An einer gegebenen motorischen Endplatte verblieben der *quantal content* und die mittlere Amplitude der qEPSCs unverändert. Zwanzig Minuten lang wurden die qEPSCs unter Kontrollbedingungen gezählt und aufgenommen (*Baseline*). Bei stabilen Bedingungen wurde anschließend das IgG appliziert.

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden IgG-Konzentrationen von 10 - 15 mg/ml verwendet, da diese im Bereich der physiologischen IgG-Konzentration im Blut lagen. Mit der IgG-Fraktion einiger CIDP-Patienten wurden zusätzliche Experimente mit 30 mg/ml durchgeführt. Die Verdünnung des IgGs erfolgte in Elektrodenpuffer.

2.2.4 Koinkubationsexperimente von CIDP-IgG mit IVIg

Die Verabreichung von IVIg stellt eine der erfolgreichsten Therapien bei CIDP-Patienten dar. Um eine direkte Wechselwirkung zwischen CIDP-IgG und IVIg experimentell nachzuweisen, wurden Untersuchungen mit der *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode durchgeführt. 15 mg Sandoglobulin (CSL Behring, Bern, Schweiz) und 15 mg CIDP-IgG von Patient 1 oder 3 wurden zusammen in 1 ml Elektrodenpuffer gelöst und 30 Minuten lang bei 36°C koinkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Lösung elektrophysiologisch untersucht. Der Versuchsablauf und die Auswertung erfolgten wie zuvor beschrieben (Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3).

2.2.5 Applikation des monoklonalen Anti-P0-Antikörpers

Dem peripheren Myelinprotein 0 (P0) wird eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der CIDP zugesprochen. In der vorliegenden Studie wurden mögliche Effekte von monoklonalen IgG-Antikörpern getestet, die gegen die extrazelluläre Domäne von P0 gerichtet sind. Mit Hilfe der *Macro-Patch-Clamp*-Technik wurden Effekte dieser Anti-P0-Antikörper (Astexx Ltd. und Co. KEG, Graz, Österreich) auf die neuromuskuläre Transmission am Zwerchfell der Maus untersucht. Der Versuchsablauf und die Auswertung erfolgten wie zuvor beschrieben (Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3). Es wurden Konzentrationen von 50 und 100 µg/ml verwendet.

2.3 Calcium-Imaging

Um zu untersuchen, ob das IgG von CIDP-Patienten einen Einfluss auf spannungsabhängige Calciumkanäle hat, wurden *Calcium-Imaging*-Experimente durchgeführt. Diese Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Dr. H. Hatt an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

Die Versuche wurden an kultivierten Neuronen des *Bulbus olfactorius* von neonatalen C57Bl/6 Mäusen (P1-P3) durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass P/Q-Typ Calciumkanäle entscheidend für die synaptische Transmission dieser Neurone sind (Isaacson und Strowbridge, 1998). Vorsichtig wurde der olfaktorische Bulbus aus den Mäusen entnommen, für 20 Minuten bei 37°C mit Trypsin behandelt, zweimal in

L-15 Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und mit einer sterilen Pasteurpipette mechanisch zertrennt. Die Zellen wurden mit 2 ml B27 und 500 μ l Glutamax (Zusatzstoffe zur Optimierung der Zellkultur) pro 100 ml *Neurobasal* Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA) resuspendiert, auf polylysinbeschichtete (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Zellkulturschalen mit einer Zelldichte von 200000 Zellen/cm² ausgesät und sieben bis zehn Tage kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch extrazelluläre Lösung und den Calcium-sensitiven Farbstoff Fura-2/AM (3 μ M; Molecular Probes, Eugene, USA) ersetzt. Die extrazelluläre Lösung bestand aus 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES und 10 mM D-Glucose. Der pH-Wert betrug 7,4. Die Zellen wurden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und dann weitere 60 Minuten den verschiedenen CIDP-IgGs ausgesetzt. Ihre Endkonzentration betrug 10 μ g/ml.

Die Zellen wurden mit einem Zeiss IM 100 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet für ratiometrisches *Imaging* (Tillvision, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) mit 32-facher Vergrößerung, untersucht. Alle Zellen im Sichtfeld wurden jede Sekunde für 75 ms mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm bestrahlt. Die durchschnittliche Pixelintensität innerhalb der benutzerdefinierten Region, also einer Zelle, wurde digitalisiert und abgespeichert. Das calciumabhängige Fluoreszenzsignal bei 510 nm Wellenlänge wurde als Verhältnis von F340/F380 angegeben. Um spannungsabhängige Calciumkanäle zu öffnen, wurden die Zellen drei Pulsen extrazellulärer Lösung mit hochkonzentriertem Kalium ausgesetzt. Die Lösung hatte folgende Bestandteile: 110 mM NaCl, 60 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES und 10 mM D-Glucose. Der pH-Wert betrug 7,4. Jeder Puls dauerte 7 s, zwischen den Pulsen lagen jeweils 100 s. Um eine Anreicherung von Kalium im Bad der Zellen zu verhindern, wurden sie zwischen den Applikationen konstant mit extrazellulärer Lösung umspült.

Für die statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) und SigmaStat (Systat Software, Inc., Point Richmond, USA) benutzt. Bei einer Normalverteilung der Daten wurde die statistische Signifikanz durch einen *Student's t-test*, ansonsten durch einen *Mann-Whitney Rank Sum Test* bestimmt. Als statistisch signifikant galt $p < 0,05$.

2.4 Anti-Gangliosid-Antikörperbestimmung

Da Ganglioside bei anderen Autoimmunerkrankungen potentielle Antigene darstellen, wurden die elektrophysiologisch untersuchten IgG-Fractionen von CIDP-Patienten auf Anti-Gangliosid-Antikörper getestet. Dies geschah durch ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Hierfür wurden 100 pmol der Ganglioside GM1, GD1a, GD1b, GT1b und GQ1b (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Matreya LLC, Pleasant Gap, USA) in 100% Ethanol verdünnt und in Mikrotiterplatten-*wells* gegeben. Nach der Evaporation wurden die *wells* mit 3% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in PBS für zwei Stunden bei 4°C geblockt. Es folgte ein Waschschrift. Das CIDP-IgG wurde in PBS gelöst, in die *wells* gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die gebundenen primären Antikörper mit einem Alkaline-Phosphatase-konjugierten zweiten Antikörper detektiert. Dazu diente ein monoklonaler *goat anti-human* IgG Antikörper (Jackson Laboratories, West Grove, USA). Die Inkubation betrug 90 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte ein weiterer Waschschrift. P-Nitrophenylphosphat (2 mg/ml) wurde in Puffer gelöst, der sich wie folgt zusammensetzte: 100 mM Trisbase, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂. Die Lösung wurde in die *wells* gegeben und 30 Minuten inkubiert. Danach wurde die optische Dichte (OD) bei Licht der Wellenlänge 405 nm gemessen. Um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurde die OD der Patientenprobe ohne Ganglioside von der OD der Patientenprobe mit Gangliosiden subtrahiert. Die Proben wurden als positiv gewertet, wenn die Extinktion bei einer Verdünnung von 1:100 einen Wert von 0,1 überschritt. Der Titer von positiven Proben wurde durch Verdünnungsreihen bis zu 1:12500 bestimmt.

2.5 Westernblots

Das Zwerchfell der Maus wurde entnommen und in Lysispuffer (0,1 M PBS, 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA), 5% Complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)) homogenisiert und durch Ultraschall (3 x 30 s; *output* 20%) weiter aufbereitet. Anschließend wurde das Homogenat 30 Minuten lang bei 13000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt mittels optischer Dichtemessung bestimmt. Die

Aufbewahrung erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C .

Für die *Westernblots* wurden 15%ige Acrylamidgele verwendet. Das Zwerchfellprotein ($600\ \mu\text{g}$) wurde für fünf Minuten bei 75°C denaturiert. Anschließend wurde das Gel mit $5,5\ \mu\text{l}$ Standardmarker (10-250 kDa; Bio-Rad, Hercules, USA) und Protein beladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für eine Stunde bei 200 V in Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,47 mM Natriumdodecylsulfat (SDS)). Anschließend wurden die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) transferiert. Dies erfolgte für eine Stunde bei 100 V in gekühltem Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol). Die Membran wurde in TBS-T (100 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, 0,1% Tween 20; pH 7,5; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen und mit 5% Milchpulverlösung bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler geblockt. Darauf folgten erneut drei Waschschrte mit TBS-T und das Auftragen der CIDP-Proben und des Kontroll-IgGs (*Surfblot*; Idea Scientific Company, Minneapolis, USA) auf die Nitrocellulosemembran. Die humanen IgGs wurden in 0,9% NaCl-Lösung (DeltaSelect GmbH, München, Deutschland) gelöst (10 mg/ml) und mit 5% Milchpulverlösung weiter verdünnt (1:1000 bis 1:100). Die Inkubation des primären Antikörpers betrug 2,5 Stunden bei 4°C . Im Anschluss wurde die Membran drei Mal für jeweils zehn Minuten mit TBS-T gewaschen. Als sekundärer Antikörper diente ein Peroxidase-konjugierter *sheep anti-human* IgG-Antikörper (1:1000; GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Seine Verdünnung erfolgte in TBS-T. Die Inkubation betrug 1,5 Stunden bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschrten mit TBS-T und einem mit destilliertem Wasser, wurde ECL (*Enhanced Chemiluminescence*)-Substrat (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) für vier Minuten auf die Membran aufgetragen. Anschließend erfolgte die Auflage und Entwicklung des Films (Fuji medical x-ray film, Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) in der Dunkelkammer.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von CIDP-IgG auf die neuromuskuläre Transmission

Um einen möglichen Effekt von aufgereinigtem CIDP-IgG auf die neuromuskuläre Transmission zu untersuchen, wurden mittels der *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode die IgG-Fractionen von Patient 1 bis 10 auf Zwerchfellpräparate von Mäusen appliziert und gleichzeitig qEPSCs abgeleitet. Die Berechnung des *quantal contents* erfolgte unter Verwendung der Poisson-Formel, wie unter Abschnitt 2.2.2 beschrieben.

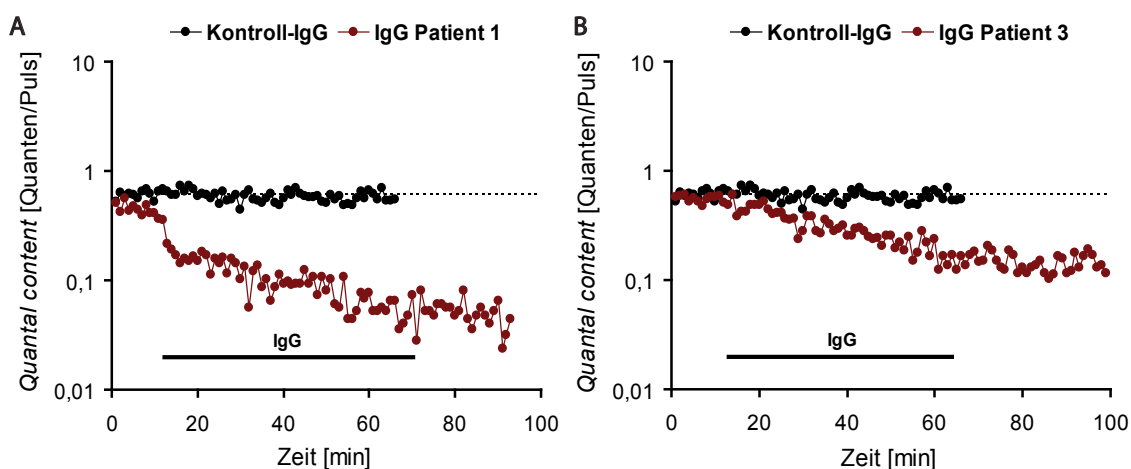


Abbildung 3.1: Repräsentativer Zeitverlauf des *quantal contents* während der Applikation des Kontroll- und des CIDP-IgGs von Patient 1 (A) und Patient 3 (B). Die Balken kennzeichnen die Zeitspanne der IgG-Applikation. Während die Reduktion des *quantal contents* nach der Applikation der CIDP-IgG-Fraktion von Patient 1 schnell, innerhalb von wenigen Minuten auftrat und sich anschließend langsam fortsetzte (A), entwickelte sie sich nach der Applikation des IgGs von Patient 3 kontinuierlich über die Zeit hinweg (B). Diese Effekte konnten nicht mit Elektrodenpuffer ausgewaschen werden.

Abbildung 3.1 stellt repräsentativ den zeitlichen Verlauf des *quantal contents* während der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 1 und Patient 3 und des Kontroll-IgGs dar. Während das Kontroll-IgG keinen Effekt auf den *quantal content* hatte, führte die Applikation des CIDP-IgGs zu einer deutlichen Reduktion. Dieser Effekt war irreversibel und konnte daher nicht mit Elektrodenpuffer ausgewaschen werden. Der zeitliche Verlauf dieser neuromuskulären Blockade variierte zwischen den IgG-Fractionen beider Patienten. Die IgG-Fraktion von Patient 1 rief innerhalb weniger Minuten eine massive Reduktion des *quantal contents* hervor, welche sich anschließend nur noch langsam fortsetzte (Abb. 3.1 A). Das CIDP-IgG von Patient 3 führte dagegen zu einer langsamen kontinuierlichen Abnahme des *quantal contents* (Abb. 3.1 B).

Patient	n	Applikationszeit \pm SEM [min] bis zum halbmaximalen CIDP-IgG-Effekt
1	5	3,4 \pm 0,4
2	6	10 \pm 0,9
3	5	13,2 \pm 3,2
4	5	6,8 \pm 2,2
5	5	3,2 \pm 0,2
6	6	10,3 \pm 1,2
7	6	6,2 \pm 1,4
8	3	11 \pm 2,3
9	2	4,5 \pm 2,5
10	5	4,6 \pm 1,5

Tabelle 3.1: Mittlere Applikationszeit \pm SEM des CIDP-IgGs pro Patient bis zum halbmaximalen Effekt. n = Anzahl der durchgeführten Applikationen.

Der Zeitverlauf des gemittelten relativen *quantal contents* während der Applikation des CIDP-IgGs aller zehn Patienten ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Graphen spiegeln die Variabilität des zeitlichen Verlaufs und des Ausmaßes der Antikörpervermittelten Blockade wider. Aufgrund des unterschiedlichen Zeitverlaufs des CIDP-IgG-Effekts konnten die IgG-Fractionen der verschiedenen CIDP-Patienten in zwei Gruppen eingeteilt werden (Tab. 3.1). Die mittlere Applikationszeit bis zum halbmaximalen CIDP-IgG-Effekt lag bei den IgG-Fractionen der Patienten 1, 5 und 10

3 Ergebnisse

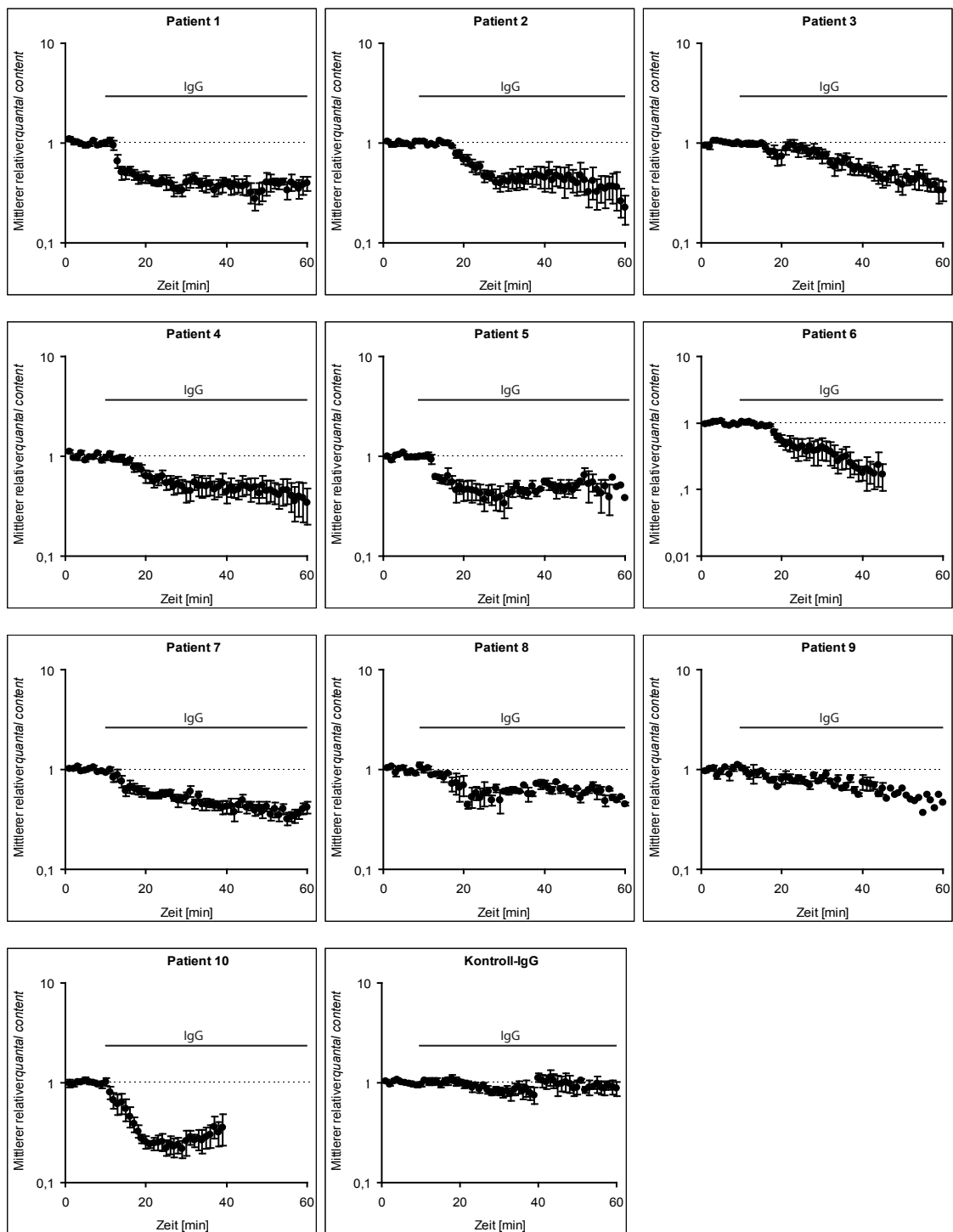


Abbildung 3.2: Zeitverlauf des gemittelten relativen *quantal contents* \pm SEM während der Applikation der CIDP-IgGs und des Kontroll-IgGs. Die Balken kennzeichnen die Zeitspanne der IgG-Applikation. Das IgG aller zehn CIDP-Patienten führte zu einer Reduktion des *quantal contents*, jedoch mit unterschiedlichem Zeitverlauf und Ausmaß. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in Tabelle 3.2 angegeben.

3 Ergebnisse

zwischen 3-5 Minuten und entsprach einer schnell auftretenden Abnahme des *quantal contents*. Bei den IgG-Fraktionen von Patient 2, 3, 6 und 8 betrug die mittlere Applikationszeit bis zum halbmaximalen Effekt dagegen 10-13 Minuten und entsprach einer signifikant (*Student-Newman-Keuls post-hoc-Tests*, $p < 0,05$) langsamer eintretenden neuromuskulären Blockade. Patient 9 wurde aufgrund der geringen Anzahl der Applikationen nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Die Applikationszeit der IgG-Fraktionen von Patient 4 und 7 bis zum halbmaximalen Effekt unterschied sich lediglich signifikant zu der IgG-Applikationszeit von Patient 3. Diese Beobachtungen geben erste Hinweise auf verschiedene Mechanismen der Interaktion von CIDP-Antikörpern mit der motorischen Endplatte.

Patient	n	<i>quantal content</i> ± SEM Applikation	p-Wert	<i>quantal content</i> ± SEM <i>wash-out</i>
Kontroll-IgG	7	0,83 ± 0,099	0,147	-
1	5	0,315 ± 0,074	0,003	0,471 ± 0,055
2	6	0,441 ± 0,076	0,011	0,528 ± 0,08
3	5	0,442 ± 0,02	0,005	0,286 ± 0,133
4	5	0,443 ± 0,141	0,041	(0,283)
5	5	0,364 ± 0,074	0,006	0,302 ± 0,144
6	6	0,27 ± 0,027	0,001	0,198 ± 0,076
7	6	0,354 ± 0,034	0,001	0,382 ± 0,21
8	3	0,362 ± 0,167	0,035	0,22 ± 0,15
9	2	0,663 ± 0,048	-	(0,332)
10	5	0,218 ± 0,051	< 0,001	0,553 ± 0,172

Tabelle 3.2: Mittlerer relativer *quantal content* und p-Werte nach der Applikation des Kontroll-IgGs und der CIDP-IgGs. Der für das Kontroll-IgG angegebene p-Wert beschreibt den statistischen Vergleich zwischen dem Effekt des Kontroll-IgGs vs. *Baseline*. Die für die CIDP-IgGs angegebenen p-Werte wurden aus dem Vergleich des CIDP- vs. Kontroll-IgG-Effekts berechnet. Die neuromuskuläre Blockade konnte nicht oder nur in geringem Maße mit Elektrodenpuffer ausgewaschen werden (*wash-out*). Bei den Patienten 4 und 9 wurde nur ein *wash-out* durchgeführt. n = Anzahl der durchgeführten Applikationen.

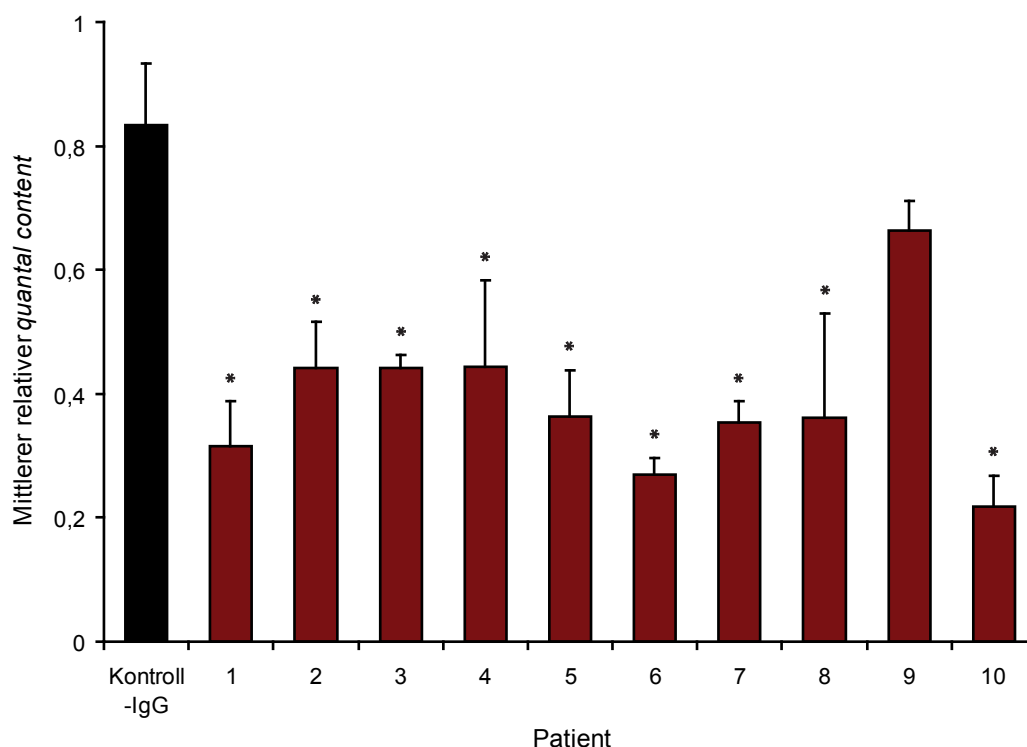


Abbildung 3.3: Mittlerer relativer *quantal content* \pm SEM nach der Applikation des Kontroll-IgGs und des CIDP-IgGs von zehn Patienten. Die Werte wurden auf die Kontrolle vor Applikation der Antikörper (*Baseline*) bezogen und auf eins normalisiert. IgG von gesunden Spendern hatte keinen signifikanten Effekt auf den *quantal content*. Die Applikation von CIDP-IgG führte im Vergleich zum Kontroll-IgG zu einer signifikanten Reduktion des *quantal contents*. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in Tabelle 3.2 angegeben.

Die Ergebnisse für alle zehn Patienten sind zusammenfassend in Tabelle 3.2 und Abbildung 3.3 dargestellt. Der Graph zeigt den gemittelten relativen, auf eins normalisierten *quantal content* nach Applikation des jeweiligen CIDP-IgGs und des Kontroll-IgGs zum Zeitpunkt des maximalen CIDP-IgG-Effekts. Verglichen mit dem *quantal content* unter Kontrollbedingungen (*Baseline*) kam es während der Applikation des Kontroll-IgGs zu einer Abnahme um 17%. Diese war jedoch nicht signifikant ($p = 0,147$). Das CIDP-IgG aller zehn Patienten verursachte, verglichen mit dem Kontroll-IgG, eine signifikante Reduktion des *quantal contents* ($p < 0,05$). Diese Reduktion variierte zwischen den Patienten (34 - 78%) und war abhängig von der eingesetzten IgG-Konzentration. Während die meisten CIDP-IgG-Fractionen bei

physiologischen Konzentrationen (10-15 mg/ml) eine deutliche Abnahme des *quantal contents* bewirkten, trat dieser Effekt durch andere CIDP-IgGs erst bei höheren Konzentrationen (30 mg/ml) auf (Patient 2, 6, 8 und 9). Dies spricht für eine Konzentrationsabhängigkeit der durch CIDP-IgG hervorgerufenen Effekte und unterstreicht ihre Antikörper-vermittelte Natur. Die Konzentrationsabhängigkeit ist exemplarisch für Patient 2 und 6 in Abbildung 3.4 dargestellt. Die neuromuskuläre Blockade konnte nicht oder nur in geringem Maße mit Elektrodenpuffer ausgewaschen werden (*wash-out*). Der gemittelte relative *quantal content* nach der Applikation des CIDP-IgGs und des *wash-outs* ist in Tabelle 3.2 aufgeführt. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte durch eine leichte Verschiebung der Elektrode auf dem Präparat verursacht wurden, wurde die Position nach jedem Experiment kontrolliert.

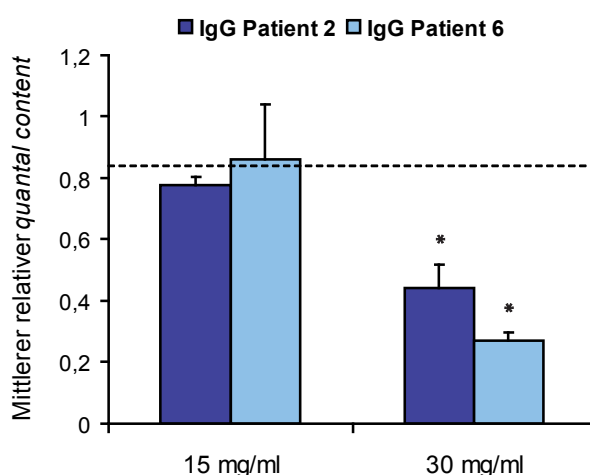


Abbildung 3.4: Mittlerer relativer *quantal content* \pm SEM nach der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 2 und 6 in Konzentrationen von 15 und 30 mg/ml. Die eingezeichnete Linie gibt den mittleren relativen *quantal content* nach Applikation des Kontroll-IgGs an. Während bei einer eingesetzten IgG-Konzentration von 15 mg/ml ($n = 2$) kein Effekt auf den *quantal content* beobachtet werden konnte, kam es bei einer IgG-Konzentration von 30 mg/ml ($n = 6$) zu einer signifikanten Reduktion des *quantal contents* im Vergleich zum Kontroll-IgG.

3.1.1 Depolarisationsabhängigkeit des *quantal contents*

Die durch das CIDP-IgG von Patient 1 hervorgerufene neuromuskuläre Blockade konnte durch eine Erhöhung des Stimulationsstroms reduziert werden (Abb 3.5 A). Vor der Applikation des CIDP-IgGs nahm der *quantal content* mit der Erhöhung des Stimulationsstroms ($-0,4$ bis $-0,9 \mu\text{A}$) zu und erreichte ab $-0,8 \mu\text{A}$ eine Sättigung mit 6,3 Quanten pro Puls. Nach der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 1 musste die motorische Endplatte deutlich stärker depolarisiert werden um ein qEPSC zu induzieren. Eine Sättigung wurde nicht erreicht. Bei einer Stimulation von $-1,0 \mu\text{A}$ lag der *quantal content* bei 1,8 Quanten pro Puls. Dieser Effekt war nach der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 3 deutlich geringer (Abb. 3.5 B). Der *quantal content* war im Vergleich zur Kontrolle bei Stimulationsströmen von $-0,2$ bis $-0,4 \mu\text{A}$ um 40 bis 50% geringer, jedoch erreicht er eine Sättigung bei $-0,5 \mu\text{A}$. Diese Daten zur Depolarisationsabhängigkeit beruhen auf Einzelexperimenten, weshalb keine statistische Auswertung erfolgen konnte.

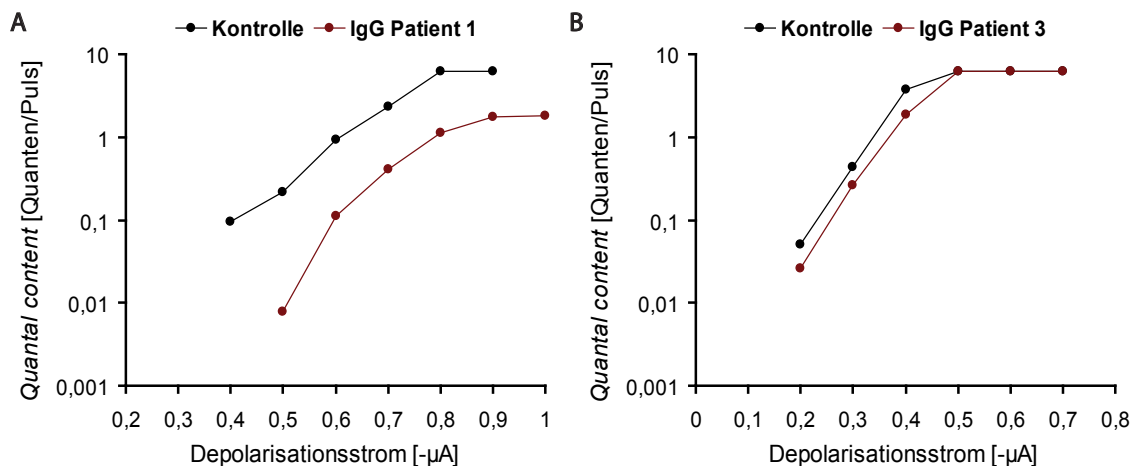


Abbildung 3.5: Depolarisationsabhängigkeit des *quantal contents* vor (Kontrolle) und nach der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 1 (A) und 3 (B). Aufgetragen ist der *quantal content* bei verschiedenen Stimulationsströmen. Nach der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 1 mussten deutlich größere Stimulationsströme aufgebracht werden, um ein qEPSC zu induzieren. Dieser Effekt war weniger deutlich nach der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 3.

Diese Beobachtungen gaben erste Hinweise darauf, dass die neuromuskuläre Blockade auf Interaktionen des CIDP-IgGs mit präsynaptischen Strukturen basierte.

Die Auswertung der qEPSC-Amplituden sollte weiter Aufschluß über den Mechanismus der neuromuskulären Blockade geben.

3.2 Postsynaptische Effekte von CIDP-IgG

Für die beobachtete Reduktion des *quantal contents* konnte eine verminderte Transmitterausschüttung verantwortlich sein oder aber die Amplituden der qEPSCs wurden durch postsynaptische Effekte der CIDP-IgGs so stark reduziert, dass sie nicht mehr vom Rauschen der Ableitung unterscheidbar waren und folglich nicht detektiert werden konnten. Um zu zeigen, dass die Abnahme des *quantal contents* auf einer Reduktion der freigesetzten Quanten basierte und nicht auf einer Amplitudenverminderung, wurden die Amplituden der qEPSCs unter Kontrollbedingungen (*Baseline*) und während der letzten zehn Minuten der IgG-Applikation gemessen.

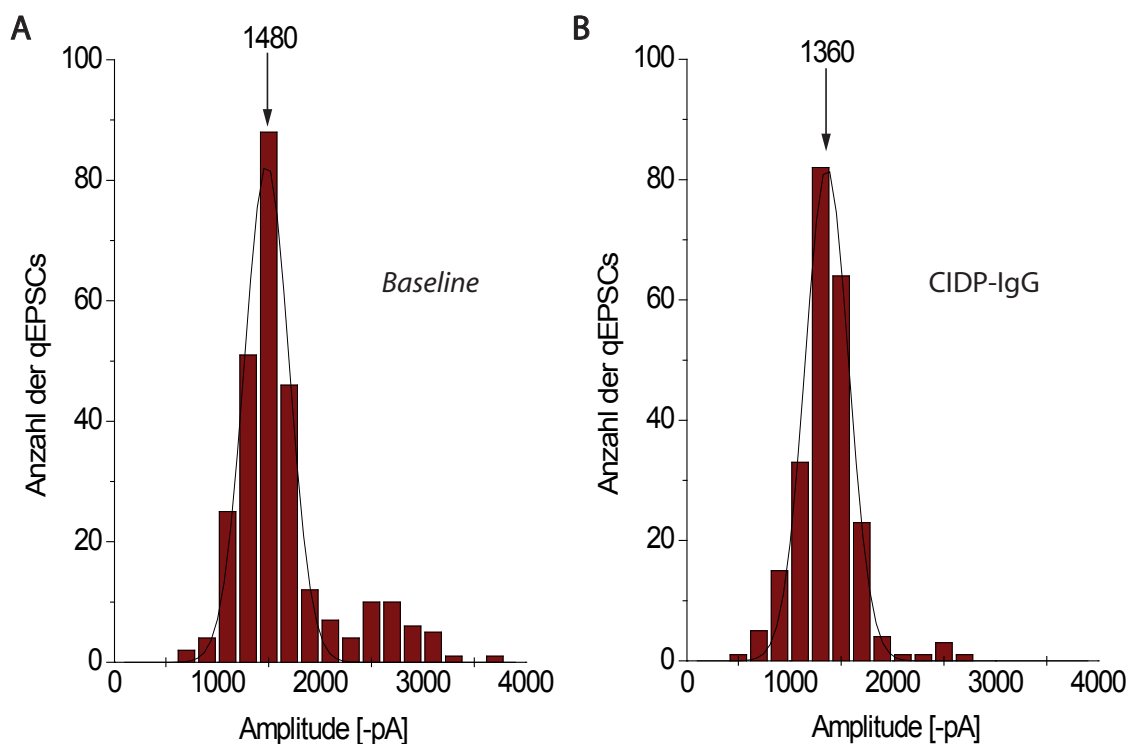


Abbildung 3.6: Repräsentative Amplitudenverteilung der qEPSCs vor (A) und während (B) der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 1. Aufgetragen ist die Amplitude in pA gegen die Anzahl der qEPSCs. Das CIDP-IgG hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Amplitude einzelner qEPSCs.

Die Verteilung der qEPSC-Amplituden vor und nach der Applikation des IgGs von Patient 1 ist repräsentativ in Abbildung 3.6 dargestellt. Die Histogramme zeigen die Anzahl der beobachteten qEPSCs für verschiedene Amplitudenbereiche. Die eingezeichnete Linie repräsentiert die Gauss'sche Verteilung und den Mittelwert der einzelnen Quanten. Auch die kleinsten postsynaptischen Ströme lagen deutlich über dem Rauschen der Ableitung.

Patient	n	relative Amplitude ± SEM	p-Wert IgG/ <i>Baseline</i>	p-Wert CIDP-/Kontroll-IgG
Kontroll-IgG	7	0,982 ± 0,028	0,548	-
1	5	0,923 ± 0,098	0,476	0,513
2	6	1,009 ± 0,022	0,695	0,476
3	5	0,907 ± 0,049	0,127	0,178
4	5	0,878 ± 0,041	0,04	0,053
5	5	0,942 ± 0,035	0,17	0,382
6	6	1,002 ± 0,051	0,97	0,731
7	6	0,867 ± 0,076	0,031	0,157
8	3	0,876 ± 0,104	0,355	0,199
9	2	1,015 ± 0,025	-	-
10	5	0,964 ± 0,048	0,5	0,733

Tabelle 3.3: Mittlere relative qEPSC-Amplitude und p-Werte nach der Applikation des Kontroll-IgGs und der zehn CIDP-IgGs. Die p-Werte sind sowohl für den Vergleich der IgG-Effekte vs. *Baseline*, als auch der CIDP- vs. Kontroll-IgG-Effekte angegeben. n = Anzahl der durchgeführten IgG-Applikationen.

Abbildung 3.7 zeigt zusammenfassend die gemittelte relative, auf eins normalisierte Amplitude der qEPSCs nach der Applikation des Kontroll-IgGs und des CIDP-IgGs der zehn Patienten. Die Daten sind zusätzlich mit den jeweiligen p-Werten in Tabelle 3.3 aufgeführt. Sowohl die Applikation des Kontroll-IgGs als auch die des CIDP-IgGs von acht Patienten führte im Vergleich zur *Baseline* zu keiner Beeinflussung der postsynaptischen Ströme. Die mittlere Amplitude blieb konstant ($p > 0,05$). Ausnahmen stellten Patient 4 und 7 dar, bei denen es zu einer signifikanten Abnahme der Amplituden um 12% ($p = 0,04$) bzw. 13% kam ($p = 0,031$). Vergleich man die relativen mittleren qEPSC-Amplituden nach Applikation der CIDP-IgGs mit denen

nach Applikation des Kontroll-IgGs, kam es bei keinem Patienten zu einem signifikanten Unterschied (Tab. 3.3). Durch die unveränderten qEPSC-Amplituden nach der Applikation des IgGs konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Reduktion des *quantal contents* aus einer Antikörper-vermittelten präsynaptischen Blockade resultierte und nicht durch technische Probleme, wie beispielsweise einer Verschiebung der Elektrode während der Messung, verursacht wurde.

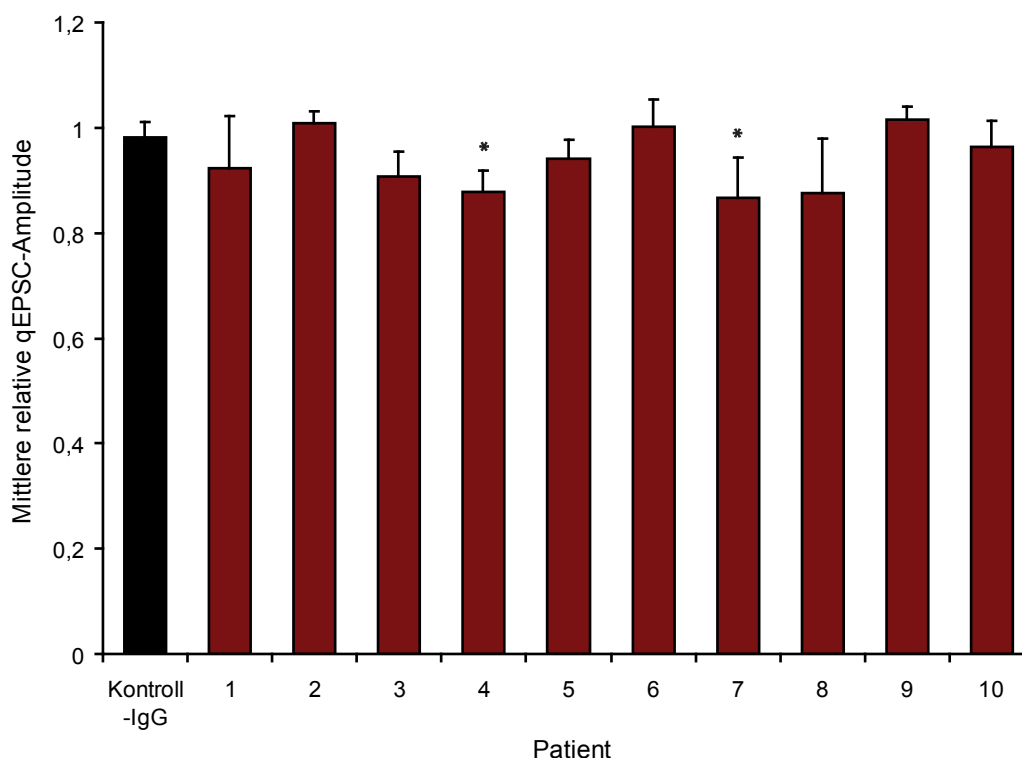


Abbildung 3.7: Mittlere relative Amplitude \pm SEM der qEPSCs nach Applikation des Kontroll-IgGs und des CIDP-IgGs der zehn Patienten. Die Daten sind relativ zur Kontrolle vor Applikation der Antikörper (*Baseline*) dargestellt und auf eins normalisiert. Die Antikörper hatten keinen signifikanten Einfluss auf die mittlere qEPSC-Amplitude. Ausnahmen waren Patient 4 und 7. Verglichen mit dem Effekt nach Applikation des Kontroll-IgGs hatte kein CIDP-IgG einen signifikanten Effekt auf die mittlere relative qEPSC-Amplitude.

Die Ergebnisse zeigen, dass IgG von Patienten mit CIDP nicht mit postsynaptischen Komponenten, wie dem Acetylcholinrezeptor, interagiert. Folglich kann die beobachtete Abnahme des *quantal contents* durch CIDP-IgG auf eine Interaktion der Antikörper mit präsynaptischen Strukturen zurückgeführt werden.

3.3 Effekte von IVIg auf die CIDP-IgG-vermittelte präsynaptische Blockade

Nachdem vorangegangene Studien zeigen konnten, dass IVIg durch GBS- und LEMS-IgG verursachte neuromuskuläre Blockaden aufheben konnte (Buchwald et al., 2002; Buchwald et al., 2005), wurde untersucht, ob dies auch für die CIDP zutrifft. Hierfür wurden exemplarisch die IgG-Fractionen von Patient 1 und 3 untersucht. Das IgG von Patient 1 wurde zuvor der Gruppe zugeordnet, die eine schnelle präsynaptische Blockade an der motorischen Endplatte hervorrief. Dagegen wurde das IgG von Patient 3 der Gruppe zugeordnet, die eine langsame kontinuierliche Abnahme des *quantal contents* verursachte. Das CIDP-IgG beider Patienten und das IVIg wurden gemeinsam in einer Endkonzentration von jeweils 15 mg/ml bei 36°C inkubiert und anschließend mittels der *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode auf die motorische Endplatte appliziert.

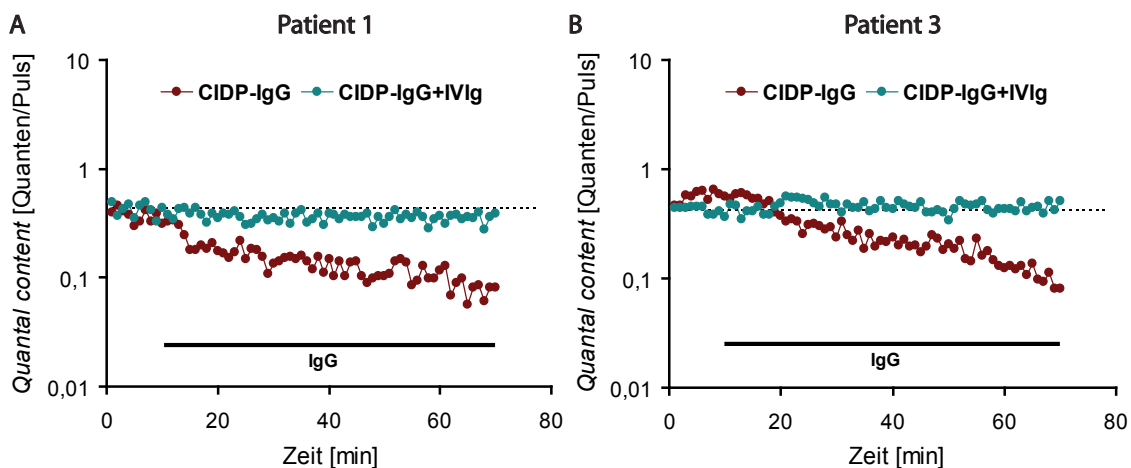


Abbildung 3.8: Repräsentativer Zeitverlauf des *quantal contents* während der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 1 (A) und 3 (B), mit und ohne vorherige Koinkubation mit IVIg. Die Balken kennzeichnen die Zeitspanne der IgG-Applikation. Das CIDP-IgG beider Patienten führte zu einer Reduktion des *quantal contents*. Wurde es vor der Applikation mit IVIg koinkubiert, wurde diese präsynaptische Blockade neutralisiert.

Der repräsentative Zeitverlauf des *quantal contents* mit und ohne vorheriger Koinkubation des CIDP-IgGs von Patient 1 (Abb. 3.8 A) und 3 (Abb. 3.8 B) mit IVIg ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Während die IgG-Fractionen beider Patienten zu einer

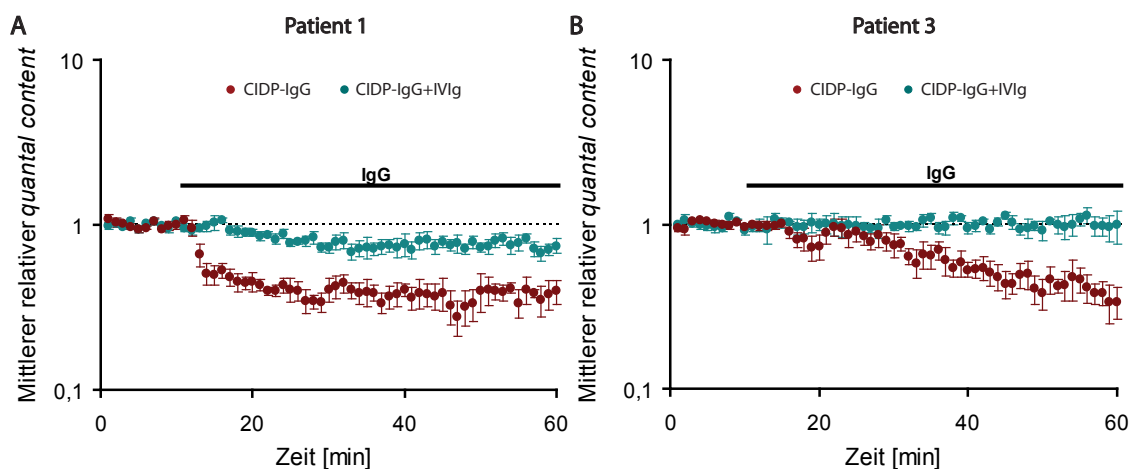


Abbildung 3.9: Zeitverlauf des gemittelten relativen *quantal contents* \pm SEM während der Applikation des CIDP-IgGs von Patient 1 (A) und 3 (B), mit und ohne vorherige Koinkubtion mit IVIg. Die Balken kennzeichnen die Zeitspanne der IgG-Applikation. Die Koinkubation von IVIg mit dem CIDP-IgG von Patient 1 resultierte in einer deutlichen Reduktion der präsynaptischen Blockade, die mit dem CIDP-IgG von Patient 3 in einer vollständigen Neutralisation dieses Effekts.

Reduktion der Transmitterfreisetzung führte, konnte eine solche präsynaptische Blockade mit einer vorangegangenen Koinkubation mit IVIg nicht beobachtet werden. Der Zeitverlauf des gemittelten relativen *quantal contents* aller durchgeführten Experimente ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Verglichen mit der *Baseline* führte auch das mit IVIg koinkubierte CIDP-IgG von Patient 1 zu einer leichten Reduktion des *quantal contents*. Diese war jedoch deutlich geringer als ohne Koinkubation mit IVIg (Abb. 3.9 A). Dagegen neutralisierte IVIg die präsynaptische Blockade, verursacht durch das CIDP-IgG von Patient 3, vollständig (Abb. 3.9 B).

Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 3.4 und Abbildung 3.10 aufgeführt. Das IgG von Patient 1 bewirkte im Vergleich zum Kontroll-IgG innerhalb von fünf Minuten eine signifikante Reduktion der Transmitterausschüttung ($p = 0,003$). Wurde das CIDP-IgG vor der Applikation mit IVIg koinkubiert, konnte kein signifikanter Unterschied mehr zum Kontroll-IgG festgestellt werden ($p = 0,472$). Die präsynaptische Blockade wurde fast vollständig neutralisiert. Der CIDP-IgG-Effekt mit und ohne vorherige Zugabe von IVIg war signifikant verschieden ($p = 0,001$). Die mittlere Amplitude der qEPSCs blieb sowohl im Vergleich zur *Baseline* ($p = 0,476$ ohne Koinkubation, $p = 0,772$ mit Koinkubation) als auch zum Effekt der Kontroll-

3 Ergebnisse

Patient	n	relativer <i>quantal content</i> ± SEM	relative Amplitude ± SEM
1			
CIDP-IgG	5	0,315 ± 0,074 p = 0,003	0,923 ± 0,098 p = 0,513
CIDP-IgG + IVIg	5	0,74 ± 0,049 p = 0,472	1,01 ± 0,026 p = 0,531
3			
CIDP-IgG	5	0,442 ± 0,02 p = 0,005	0,907 ± 0,049 p = 0,178
CIDP-IgG + IVIg	4	1,013 ± 0,105 p = 0,279	0,923 ± 0,05 p = 0,28
Kontroll-IgG	7	0,834 ± 0,099 p = 0,147	0,982 ± 0,028 p = 0,548

Tabelle 3.4: Mittlerer relativer *quantal content*, mittlere relative qEPSC-Amplituden und p-Werte mit und ohne vorherige Koinkubation von CIDP-IgG mit IVIg. Die für die CIDP-IgGs angegebenen p-Werte beschreiben den statistischen Vergleich zwischen dem CIDP- vs. Kontroll-IgG-Effekt. Die für das Kontroll-IgG angegebenen p-Werte wurden aus dem Vergleich des Kontroll-IgG-Effekts vs. *Baseline* berechnet. n = Anzahl der durchgeführten IgG-Applikationen.

IgG-Applikation (p = 0,513 ohne Koinkubation, p = 0,531 mit Koinkubation) von der Applikation der CIDP-Antikörper unbeeinflusst.

Das IgG des Patienten 3 verursachte, verglichen mit dem Kontroll-IgG, eine signifikante Reduktion des *quantal contents* (p = 0,005). Die Koinkubation des IgGs mit IVIg führte zu einer vollständigen Neutralisation der beobachteten präsynaptischen Blockade. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Effekt des Kontroll-IgGs und des mit IVIg koinkubierten CIDP-IgGs ermittelt werden (p = 0,279). Gleichzeitig war der durch CIDP-IgG hervorgerufene Effekt ohne Koinkubation mit IVIg signifikant größer als der Effekt nach Applikation des CIDP-IgGs koinkubiert mit IVIg (p = 0,016). Die mittlere Amplitude der qEPSCs blieb im Vergleich zur *Baseline* sowohl während der Applikation des CIDP-IgGs (p = 0,127) als auch des CIDP-IgGs koinkubiert mit IVIg (p = 0,217) unverändert. Auch im Vergleich zum Effekt des Kontroll-IgGs auf die mittlere qEPSC-Amplitude konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p = 0,178 ohne Koinkubation, p = 0,28 mit Koinkubation).

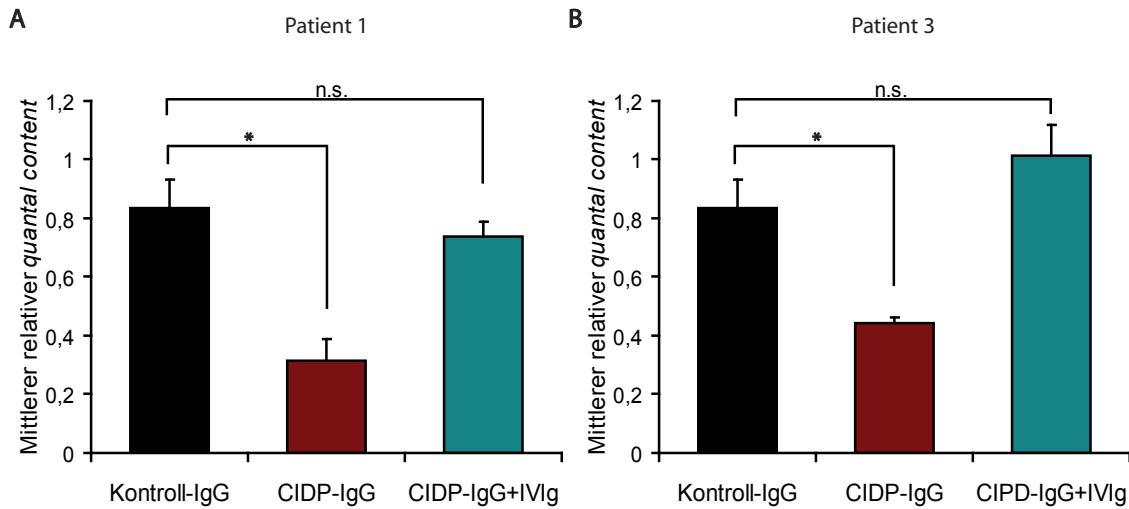


Abbildung 3.10: Mittlerer relativer *quantal content* \pm SEM nach der Applikation des Kontroll-IgGs und CIDP-IgGs von Patient 1 (A) und 3 (B) mit und ohne vorherige Koinkubation mit IVIg. Ohne Koinkubation führte das CIDP-IgG beider Patienten, verglichen mit dem Kontroll-IgG, zu einer signifikanten Abnahme des *quantal contents*. Wurde das CIDP-IgG vor der Applikation mit IVIg koinkubiert, wurde diese präsynaptische Blockade neutralisiert. n.s. = nicht signifikant

Die Experimente sprechen für eine direkte Interaktion des IVIGs mit den CIDP-IgGs beider Patienten und spiegeln den Erfolg, mit dem IVIg in der Therapie von CIDP eingesetzt wird, wider. Der neutralisierende Effekt des IVIGs war unabhängig vom Zeitverlauf der durch das CIDP-IgG induzierten präsynaptischen Blockade und konnte exemplarisch sowohl für die Patientengruppe mit schnell blockierenden als auch für die Patientengruppe mit langsam blockierenden Antikörpern nachgewiesen werden.

3.4 Einfluss von CIDP-IgG auf den Calciumeinstrom in kultivierte Neurone des *Bulbus olfactorius*

Zur weiteren Charakterisierung der präsynaptischen Blockade wurde untersucht, ob CIDP-IgGs die Funktion von spannungsabhängigen Calciumkanälen verändern. Hierzu wurden *Calcium-Imaging*-Experimente an kultivierten Neuronen des *Bulbus olfactorius* durchgeführt. Die Zellen wurden drei Pulsen extrazellulärer Lösung

mit hohem Kaliumgehalt ausgesetzt, die eine ausreichende Depolarisation des Membranpotentials verursachten und zur Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle führten. Der Effekt der IgG-Fractionen von Patient 1-5 und 10-11 wurde untersucht.

Abbildung 3.11 zeigt das calciumabhängige Fluoreszenzsignal (F340/F380) einer unbehandelten (Kontrolle) und einer mit CIDP-IgG des Patienten 10 inkubierten Zelle. Im Vergleich zur Kontrolle führte die Inkubation mit dem CIDP-IgG zu einer deutlichen Reduktion der Signalamplitude. Dies spricht für einen verminderten Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle. Abbildung 3.12 zeigt zusammenfassend die gemittelten relativen Amplituden unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation der Zellen mit den CIDP-IgG-Fractionen für die Depolarisationspulse 1 bis 3. Alle Werte sind relativ zur mittleren ersten Amplitude der Kontrolle angegeben. Die CIDP-IgGs hatten unterschiedliche Auswirkungen auf den Calciumeinstrom.

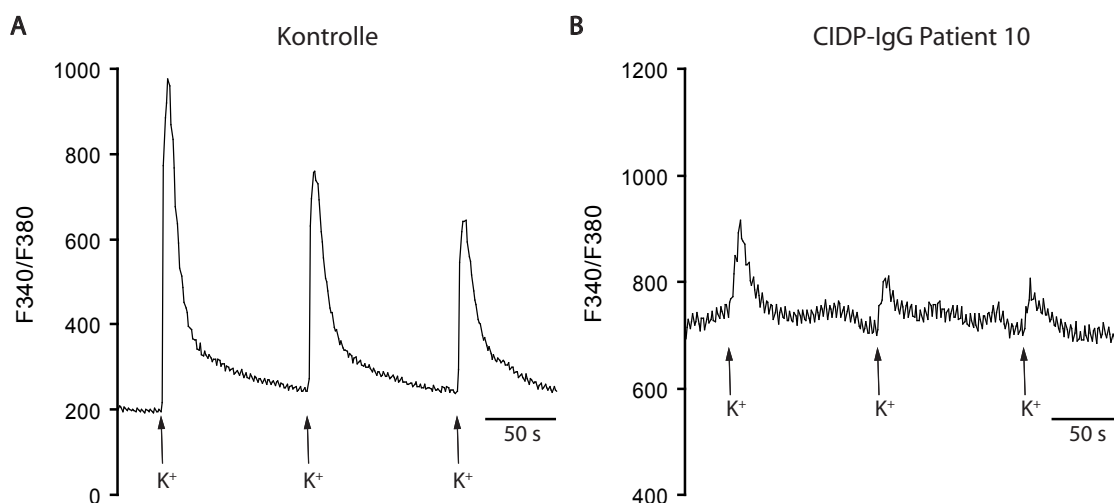


Abbildung 3.11: Repräsentativer Zeitverlauf des calciumabhängigen Fluoreszenzsignals F340/F380 von einer unbehandelten (A) und einer mit CIDP-IgG (Patient 10) inkubierten Zelle (B). Die K^+ -induzierten Depolarisationspulse sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Inkubation mit CIDP-IgG führte zu einer deutlichen Reduktion der Signalamplituden. Dieser Effekt spricht für eine Interaktion des CIDP-IgGs von Patient 10 mit spannungsabhängigen Calciumkanälen.

Das IgG von Patient 1 und 10 verursachte eine starke, signifikante ($p < 0,001$) Reduktion der Fluoreszenzsignalamplituden. Die IgG-Fraktion von Patient 2 führte zu einer signifikant kleineren Signalamplitude nach dem ersten ($p = 0,002$) und

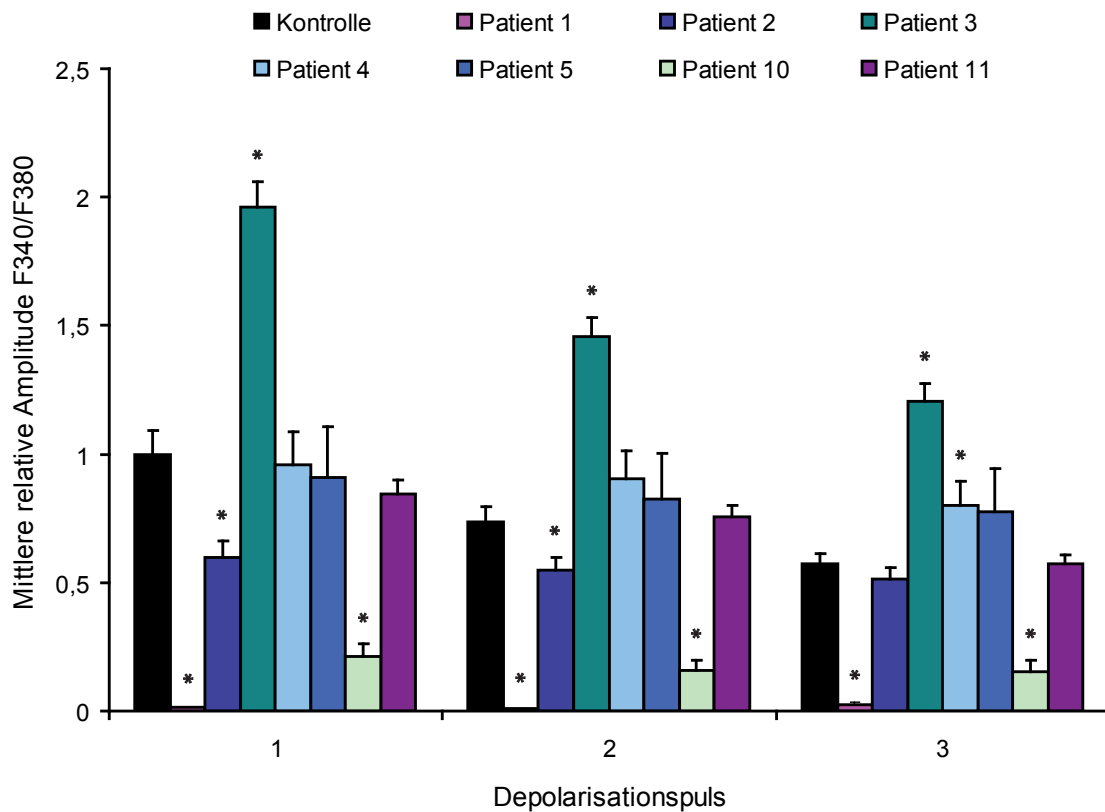


Abbildung 3.12: Gemittelte relative Signalamplitude \pm SEM unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen CIDP-IgG-Fraktionen für die Depolarisationspulse 1 bis 3. Die Werte sind relativ zur mittleren ersten Amplitude der Kontrolle angegeben. Die Inkubation der Zellen mit den IgG-Fraktionen der Patienten 1 und 10 führte zu einer signifikanten Reduktion der Amplituden, was für einen verminderten Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle spricht. Das IgG von Patient 2 führte, verglichen mit der Kontrolle, nach der ersten und zweiten Depolarisation zu einer signifikanten Abnahme des calciumabhängigen Fluoreszenzsignals. Das IgG von Patient 3 bewirkte dagegen eine signifikante Erhöhung der Signalamplituden. Dies konnte auch nach der dritten Depolarisation bei Zellen festgestellt werden, die zuvor mit dem IgG von Patient 4 inkubiert wurden. Keinen signifikanten Einfluß hatten die IgG-Fraktionen der Patienten 5 und 11. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist in Tabelle 3.5 angegeben.

Patient	n	relative Signalamplitude \pm SEM	p-Wert
1. Depolarisationspuls			
Kontrolle	15	$1 \pm 0,09$	-
1	71	$0,01 \pm 0,003$	$p < 0,001$
2	51	$0,6 \pm 0,07$	$p = 0,002$
3	16	$1,96 \pm 0,1$	$p < 0,001$
4	20	$0,96 \pm 0,13$	$p = 0,804$
5	23	$0,91 \pm 0,13$	$p = 0,083$
10	13	$0,21 \pm 0,05$	$p < 0,001$
11	72	$0,85 \pm 0,05$	$p = 0,206$

Tabelle 3.5: Mittlere relative Signalamplitude \pm SEM und p-Werte unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen CIDP-IgG-Fraktionen. Die Werte beschreiben das relative calciumabhängige Fluoreszenzsignal (F340/F380) nach dem ersten Depolarisationspuls.

zweiten ($p = 0,039$) Depolarisationspuls, die Amplituden nach dem dritten Puls unterschieden sich dagegen nicht signifikant ($p = 0,43$) von denen unter Kontrollbedingungen. Die Inkubation der Zellen mit dem IgG der Patienten 5 und 11 hatte keinen Effekt auf das calciumabhängige Fluoreszenzsignal ($p > 0,05$). Überraschenderweise führte die Inkubation der Neurone mit der CIDP-IgG-Fraktion des Patienten 3 zu einer signifikant ($p < 0,001$) größeren Signalamplitude bzw. erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration, obwohl es an der motorischen Endplatte eine reduzierte Transmitterfreisetzung verursachte. Tabelle 3.5 fasst die mittleren relativen Signalamplituden nach der Inkubation mit allen IgG-Fraktionen für den ersten Depolarisationspuls zusammen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die durch CIDP-IgG hervorgerufene präsynaptische Blockade nur partiell auf eine Verminderung des Calciumeinstroms zurückgeführt werden könnte. Die Variabilität der Effekte zwischen den IgG-Fraktionen der Patienten spricht dafür, dass der reduzierten präsynaptischen Quantenfreisetzung an der motorischen Endplatte unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen. Dies steht im Einklang mit dem beobachteten variablen Zeitverlauf der präsynaptischen Blockade und spiegelt die Heterogenität des Krankheitsbildes wider.

3.5 Charakterisierung des Zielantigens bei der CIDP

3.5.1 Detektion von Anti-Gangliosid-Antikörpern durch ELISA

Gangliosiden wird in der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle als Zielantigen zugesprochen. Um zu testen, ob die elektrophysiologisch getesteten IgG-Fractionen der CIDP-Patienten Antikörper gegen Ganglioside enthielten und damit an der präsynaptischen Blockade beteiligt sein könnten, wurde das Patientenmaterial mit Hilfe von ELISA untersucht. Keine der IgG-Fractionen zeigte eine Antikörperaktivität gegen die Ganglioside GD1a, GD1b, GM1, GQ1b und GT1b. Damit kann ihre Beteiligung an der Entstehung der präsynaptischen Blockade ausgeschlossen werden. Patient 7 wurde in diese Untersuchung nicht einbezogen.

3.5.2 Identifizierung von Zielantigenen durch *Westernblots*

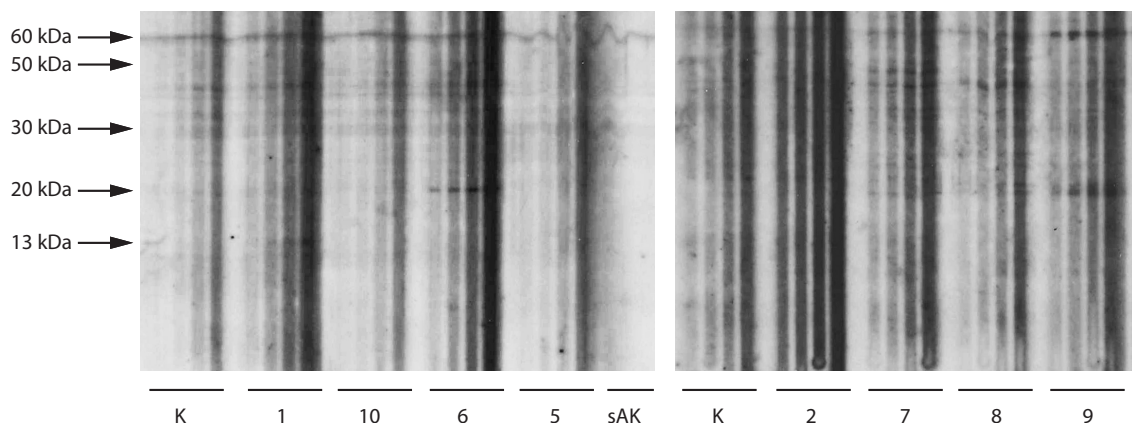


Abbildung 3.13: Exemplarische *Westernblots* zum Nachweis von CIDP-IgG-Bindungen an Zwerchfellproteine von Mäusen. Pro Patient sind vier verschiedene Antikörperverdünnungen abgebildet, die durch Balken gekennzeichnet sind. Antikörperaktivität gegen Proteine des Zwerchfells konnten bei fünf Patienten im Bereich von 13, 20, 30 oder 50 kDa nachgewiesen werden. Unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers traten im Bereich von 30 bis 60 kDa auf. K = Kontroll-IgG; sAK = nur sekundärer Antikörper auf Zwerchfellproteinen.

Mit Hilfe von *Westernblots* sollte aufgeklärt werden, gegen welche Komponenten

der motorischen Endplatte die humorale Antwort gerichtet ist. Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch zwei *Westernblots*, die mit den IgG-Fractionen der Patienten 1-2 und 5-10 durchgeführt wurden. Trotz der Verwendung verschiedener sekundärer Antikörper in unterschiedlichen Verdünnungen konnten unspezifische Bindungen an Zwerchfellproteine nicht verhindert werden. Diese lagen im Bereich von 30-60 kDa (Abb. 3.13, sAK). Bindungen des primären Antikörpers innerhalb dieses Bereichs konnten daher nicht eindeutig identifiziert werden. In Tabelle 3.6 sind die Banden aufgelistet, die sich eindeutig von unspezifischen Bindungen abhoben. Das Kontroll-IgG und fünf CIDP-IgGs wiesen keine eindeutig spezifische Bande auf. Bei fünf CIDP-IgGs kam es zu einer Antikörperaktivität gegen Zwerchfellproteine. Bei der IgG-Fraktion von Patient 1 trat eine schwache Bande bei 13 kDa auf. Die IgG-Fractionen von Patient 3, 6 und 9 zeigten eine Bande im Bereich von 20 kDa, die von Patient 3, 6 und 7 im Bereich von 48-50 kDa. Zusätzlich konnte bei Patient 3 eine Bande bei 30 kDa identifiziert werden.

Patient	Bande [kDa]
Kontroll-IgG	keine Bande
1	13
2	keine Bande
3	20, 30, 50
4	keine Bande
5	keine Bande
6	20, 50
7	48
8	keine Bande
9	20
10	keine Bande

Tabelle 3.6: Nachweisbare Bindungen des CIDP-IgGs und Kontroll-IgGs an Zwerchfellproteine, die sich deutlich von unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers abhoben.

3.6 Einfluss von monoklonalen Antikörpern gegen das periphere Myelinprotein 0 auf die neuromuskuläre Transmission

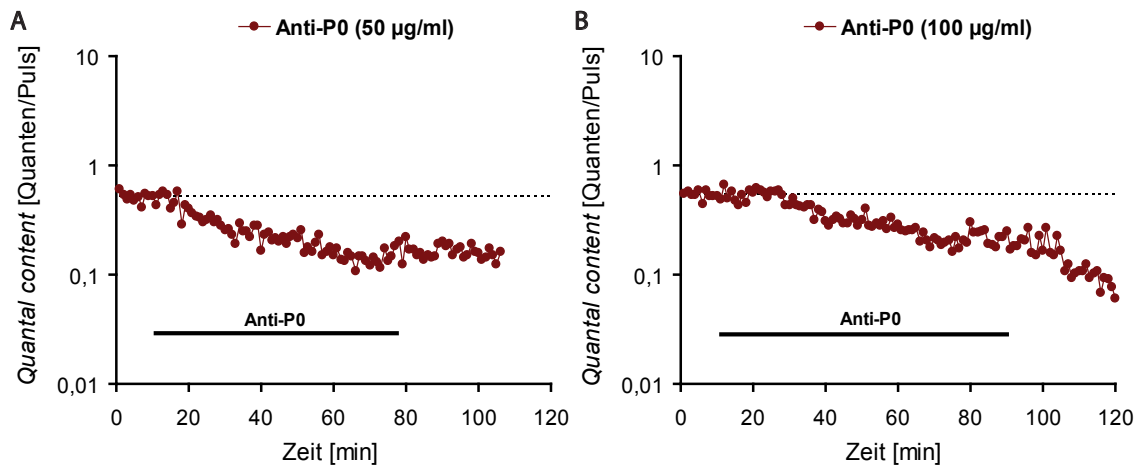


Abbildung 3.14: Repräsentativer Zeitverlauf des *quantal contents* während der Applikation von monoklonalen Anti-P0-Antikörpern in Konzentrationen von 50 (A) und 100 (B) $\mu\text{g/ml}$. Die Balken kennzeichnen die Zeitspanne der Antikörperapplikation. Monoklonale Anti-P0-Antikörper führten zu einer langsamen, irreversiblen Reduktion der Transmitterausschüttung an der motorischen Endplatte.

Bei der CIDP wird die Beteiligung von Autoantikörpern gegen periphere Myelinproteine, insbesondere gegen P0, kontrovers diskutiert. Die Untersuchung des Effekts von monoklonalen Anti-P0-Antikörpern auf die neuromuskuläre Transmission könnte Parallelen zur durch CIDP-IgG hervorgerufenen präsynaptischen Blockade aufweisen und damit eine Verbindung zwischen CIDP und P0 als Zielantigen herstellen. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung von monoklonalen Antikörpern gegen P0 auf die Funktion der motorischen Endplatte mit Hilfe der *Macro-Patch-Clamp*-Technik untersucht.

Abbildung 3.14 stellt repräsentativ den zeitlichen Verlauf des *quantal contents* während der Applikation des monoklonalen Anti-P0-Antikörpers dar. Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen betragen 50 (Abb. 3.14 A) und 100 (Abb. 3.14 B) $\mu\text{g/ml}$. Die Applikation des IgG Anti-P0-Antikörpers führte zu einer langsamen, signifikanten Abnahme des *quantal contents*. Dieser Effekt konnte nicht mit Elek-

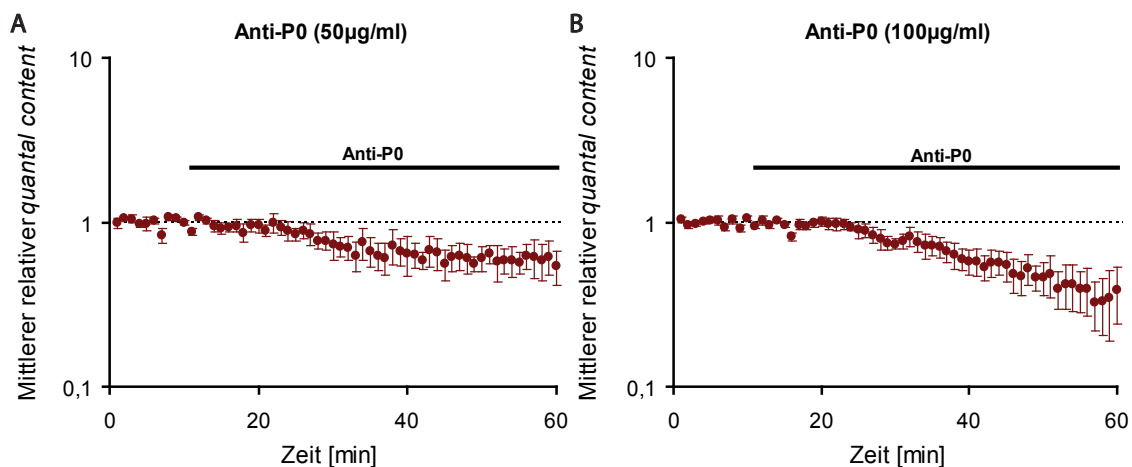


Abbildung 3.15: Zeitverlauf des gemittelten relativen *quantal contents* \pm SEM während der Applikation des monoklonalen Anti-P0-Antikörpers in Konzentrationen von 50 (A) und 100 (B) $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Balken kennzeichnen die Zeitspanne der Antikörperapplikation. Die Anzahl der durchgeführten Experimente ist Tabelle 3.7 aufgeführt.

trodenpuffer ausgewaschen werden. Der Zeitverlauf des gemittelten relativen *quantal contents* aller Experimente nach der Applikation des Anti-P0-Antikörpers ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Die Applikation von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti-P0-Antikörpern führte zu einer ausgeprägteren Blockade der neuromuskulären Transmission als die von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dies spricht für eine Konzentrationsabhängigkeit der Blockade und damit für ihre Antikörper-vermittelte Natur. Die mittlere Applikationszeit bis zum halbmaximalen Effekt lag zwischen 21-23 Minuten. Der Zeitverlauf des *quantal contents* und das Ausmaß der präsynaptischen Blockade waren vergleichbar mit denen der CIDP-Patienten mit langsam blockierenden Antikörpern, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben.

Eine Zusammenfassung der Daten ist in Tabelle 3.7 und Abbildung 3.16 aufgeführt. Bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde der gemittelte relative *quantal content* im Vergleich zur *Baseline* um 48% ($p = 0,026$), bei 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ um 60% ($p = 0,006$) reduziert. Die Amplituden der qEPSCs unterschieden sich nach der Applikation des monoklonalen Antikörpers nicht signifikant von der *Baseline*, was dafür spricht, dass der beobachtete Effekt nicht auf einer Interaktion der Antikörper mit postsynaptischen Strukturen beruhte, sondern präsynaptischen Ursprungs war.

Einerseits zeigen die Ergebnisse, dass CIDP-IgGs und monoklonale Anti-P0-Anti-

3 Ergebnisse

Anti-P0	n	relativer <i>quantal content</i> ± SEM	relative Amplitude ± SEM
50 µg/ml	4	0,515 ± 0,118 p = 0,026	1,02 ± 0,024 p = 0,468
100 µg/ml	5	0,4 ± 0,111 p = 0,006	0,89 ± 0,061 p = 0,144

Tabelle 3.7: Mittlerer relativer *quantal content*, mittlere relative qEPSC-Amplituden und p-Werte nach der Applikation von Anti-P0-Antikörpern in Konzentrationen von 50 und 100 µg/ml. n = Anzahl der durchgeführten Applikationen.

körper vergleichbare Effekte auf die neuromuskuläre Transmission haben und P0 als mögliches Zielantigen bei der CIDP in Frage kommt. Andererseits liefern die Ergebnisse keinen Beweis dafür, dass Antikörper von Anti-P0-positiven CIDP-Patienten tatsächlich einen solchen pathophysiologischen Einfluß auf die neuromuskuläre Transmission aufweisen und zur Muskelschwäche bei CIDP-Patienten beitragen.

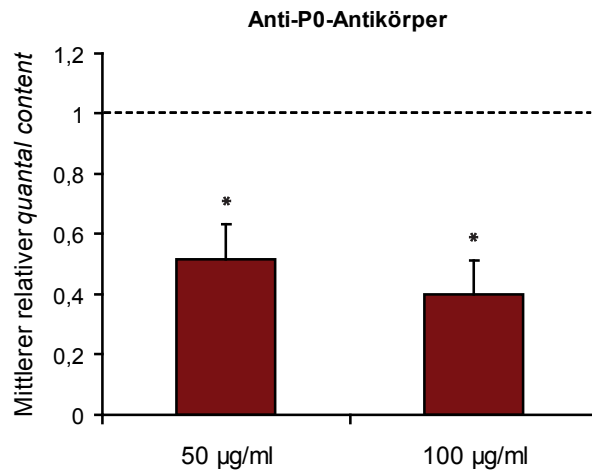


Abbildung 3.16: Mittlerer relativer *quantal content* \pm SEM nach der Applikation von monoklonalen Anti-P0-Antikörpern. Bei einer eingesetzten Antikörperkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ sank der relative *quantal content* signifikant um 48%, bei 100 $\mu\text{g/ml}$ um 60%.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit konnte experimentell die pathophysiologische Bedeutung von humoralen Faktoren bei der CIDP bestätigen. Autoantikörper, die zu einer komplexunabhängigen, irreversiblen, präsynaptischen Blockade der neuromuskulären Transmission führen, könnten teilweise eine Erklärung für die auftretende Muskelschwäche bei CIDP-Patienten liefern. Ebenso wie beim GBS und LEMS, vermag therapeutisches IVIg diese Blockade zu neutralisieren. Die Frage nach den Zielantigenen konnte weder durch die Detektion von Anti-Gangliosid-Antikörpern innerhalb der CIDP-IgG-Fractionen durch ELISA, noch durch den Nachweis von Antikörperbindungen an Proteine des Zwerchfells von Mäusen durch *Westernblots* aufgeklärt werden.

4.1 Neuromuskuläre Blockade durch CIDP-IgG

4.1.1 Präsynaptische Blockade durch CIDP-IgG

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass eine Applikation von CIDP-IgG an motorische Endplatten von Mäusen zu einer irreversiblen Reduktion des *quantal contents* führt. Die Möglichkeit, dass die beobachteten Effekte aufgrund von technischen Problemen, wie z.B. durch ein leichtes Verschieben der Elektrode, verursacht wurden, wurde durch die Kontrolle der optimalen Elektrodenposition nach Abschluss jedes Experiments minimiert. Die Abhängigkeit des Ausmaßes der präsynaptischen Blockade von der eingesetzten CIDP-IgG-Konzentration unterstreicht die Antikörpervermittelte Natur des Effekts. Vermutlich beruhten Unterschiede im Ausmaß der Blockade auf unterschiedlichen Antikörpertitern innerhalb der IgG-Fractionen verschiedener Patienten. Dieser Umstand macht einen direkten Vergleich der Effekte zwischen den untersuchten IgG-Fractionen verschiedener CIDP-Patienten schwierig. Bisher ist nicht bekannt, welche Gruppe von Antikörpern in der Gesamtfraction des

Patienten-IgGs für die beschriebenen Effekte verantwortlich und gegen welches Antigen sie gerichtet ist. Eine Bestimmung des Titers konnte daher nicht erfolgen. Die Einteilung der untersuchten CIDP-IgG-Fraktionen in zwei Gruppen, welche entweder eine schnelle oder eine langsame präsynaptische Blockade hervorrufen, könnte auf unterschiedliche Antigene und damit unterschiedliche Mechanismen hinweisen, die in Abschnitt 4.1.3 gesondert diskutiert werden. Vergleichbare Effekte von Antikörpern wurden für LEMS beschrieben. Die Applikation von aufgereinigtem LEMS-IgG auf Zwerchfellpräparate von Mäusen führte zur irreversiblen Reduktion des *quantal contents* an der neuromuskulären Endplatte (Buchwald et al., 2005). Diese Irreversibilität der IgG-Effekte unterscheiden die CIDP und LEMS vom GBS und MFS. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass sowohl die Blockade der neuromuskulären Transmission als auch des Calciumeinstroms durch P/Q-Typ Calciumkanäle durch das Auswaschen der MFS- bzw. GBS-Antikörper aufgehoben werden kann (Buchwald et al., 1998; Buchwald et al., 2001; Nakatani et al., 2009). Erklärt wurde die Reversibilität der neuromuskulären Blockade durch eine schnelle Dissoziation der Antikörper von ihrer Zielstruktur oder durch die Endozytose des gesamten Antikörper-Antigen-Komplexes. Inwieweit eine geringe Antikörperaffinität darauf zurückgeführt werden kann, dass der Effekt von humanem IgG an Zwerchfellpräparaten der Maus getestet wurde, bleibt fraglich. Das die beobachteten CIDP-IgG-Effekte in der vorliegenden Studie irreversibel waren, spricht für die Stabilität des Antikörper-Antigen-Komplexes und weist auf unterschiedliche Antigene bei der CIDP und dem GBS hin.

4.1.2 CIDP-IgG hat keinen Einfluß auf die qEPSC-Amplitude

Acht von zehn CIDP-IgGs hatten, verglichen mit der *Baseline*, keinen Einfluss auf die qEPSC-Amplitude. Interaktionen von pathogenen Antikörpern mit postsynaptischen Strukturen, wie den Acetylcholinrezeptoren, konnten elektrophysiologisch nicht nachgewiesen werden. Dies bestätigt die präsynaptische Natur der Blockade. Ein vergleichbarer, rein präsynaptischer Effekt von IgG wurde bereits für LEMS beschrieben (Buchwald et al., 2005).

Das CIDP-IgG von zwei Patienten führte neben einem reduzierten *quantal content* auch zu einer Abnahme der mittleren qEPSC-Amplitude um bis zu 13%. Ein solcher Effekt könnte durch Interaktionen des CIDP-IgGs mit postsynaptischen Strukturen

hervorgerufen werden. Das IgG könnte zum einen die Rezeptoraktivierung hemmen, indem es die Bindungsstellen für Acetylcholinmoleküle blockiert oder zum anderen eine direkte Blockade des offenen Acetylcholinrezeptorkanals bewirkt. Bisher wurde in keiner Studie eine Beeinträchtigung der Funktion von Acetylcholinrezeptoren durch CIDP-IgG beschrieben. Ein kombinierter Antikörper-vermittelter prä- und postsynaptischer Effekt wurde jedoch für das GBS und MFS nachgewiesen (Buchwald et al., 1998). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass IgG von GBS-Patienten mit Acetylcholinrezeptoren interagiert und ihre Aktivierung durch eine Blockade der Bindungsstellen verhindert (Barrett-Jolley et al., 1994; Krampfl et al., 2003). Diese Interaktion zwischen GBS-IgG und der Postsynapse der motorischen Endplatte könnte neben einer Demyelinisierung des PNS und des axonalen Verlusts zur Muskelschwäche bei GBS-Patienten beitragen. In welchem Ausmaß postsynaptische Antigene bei einigen CIDP-Patienten eine Rolle spielen, müsste durch eine größer Anzahl von CIDP-IgG-Fraktionen getestet werden. Aufgrund des schwachen Effekts bei nur zwei Patienten kann hier eine technische Ursache nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Insbesondere bei Patient 7 beruhte die Reduktion der mittleren qEPSC-Amplitude auf einem einzigen Experiment innerhalb der Versuchsreihe, in welchem es zu einer deutlichen Abnahme der Amplitude kam, während sie bei allen anderen Experimenten stabil blieb. Des Weiteren konnte im Vergleich zu den qEPSC-Amplituden nach der Applikation von Kontroll-IgG kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was gegen einen spezifischen CIDP-IgG-Effekt spricht.

4.1.3 Mechanismus der präsynaptischen Blockade

Die vorliegende Studie deutet darauf hin, dass unterschiedliche Mechanismen existieren, mit denen CIDP-IgG zu einer Beeinträchtigung der neuromuskulären Transmission führt (Abb. 4.1).

Die IgG-Fraktionen von zwei CIDP-Patienten (Patient 1 und 10) könnten über eine Interaktion mit spannungsabhängigen Calciumkanälen wirken. Der schnelle Zeitverlauf und der Hinweis auf eine Depolarisationsabhängigkeit (Patient 1) der präsynaptischen Blockade unterstützen die Annahme, dass die Antikörper dieser Patienten die physiologischen Eigenschaften ihrer Zielstruktur beeinflussen, ohne sie zu beschädigen. Die Korrelation zwischen einem reduzierten *quantal content* und der starken Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration in kultivierten Neuronen nach

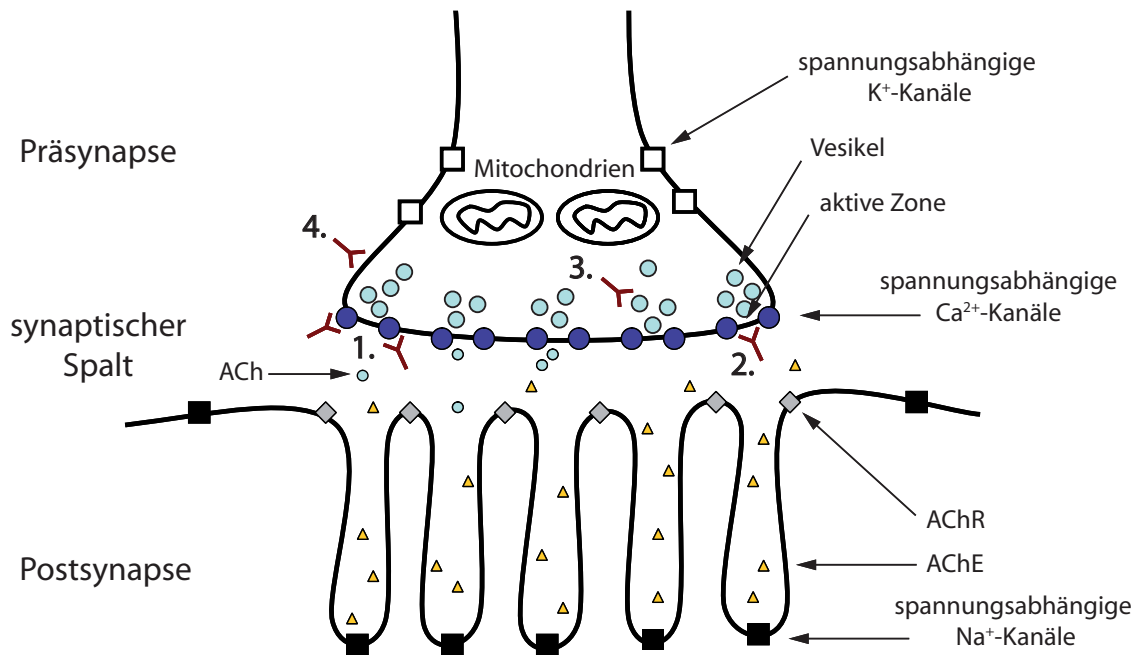


Abbildung 4.1: Mögliche Mechanismen der präsynaptischen Blockade an der motorischen Endplatte. 1. CIDP-IgG bindet an spannungsabhängige Calciumkanäle oder an Ganglioside, die mit solchen assoziiert sind, und führt zu einer Reduktion des Calciumeinstroms in die Präsynapse. Dies resultiert in einer Abnahme der Acetylcholinausschüttung. 2. Die Bindung von CIDP-IgG im Bereich der aktiven Zonen der Präsynapse könnte die Interaktion zwischen Calciumeinstrom und Calciumsensor beeinflussen und zu einer verminderten Vesikelfreisetzung führen. Eine direkte Bindung an Synaptotagmin könnte eine Alternative darstellen. 3. CIDP-IgG wird von der Präsynapse durch Endozytose aufgenommen und interagiert mit intrazellulären Antigenen, beispielsweise mit Komponenten der Fusionsmaschinerie. 4. CIDP-IgG bindet an bisher unbekannte Zielantigene der Präsynapse und beeinflusst die Transmitterfreisetzung über einen unbekanntem Mechanismus.

der Inkubation mit CIDP-IgG spricht für einen solchen Mechanismus. Da P/Q-Typ Calciumkanäle sowohl bei der synaptischen Transmission der Neuronen des *Bulbus olfactorius* (Isaacson und Strowbridge, 1998) als auch an der motorischen Endplatte eine dominante Rolle spielen (Katz et al., 1996; Protti et al., 1996; Urbano et al., 2008), basiert der Effekt möglicherweise auf einer Hemmung des Calciumeinstroms durch diese Kanäle. Eine Blockade von P/Q-Typ Calciumkanälen durch ω -Agatoxin IVA führt zu einem fast vollständigen Erliegen der neuromuskulären Transmission. Dies spiegelt die entscheidende Funktion dieser Kanäle wider. Auch N-Typ Calciumkanäle sind an der synaptischen Transmission von Neuronen des *Bulbus olfactorius* beteiligt. Ihre Blockade durch pathogene CIDP-Antikörper könnte jedoch nicht die Reduktion des *quantal contents* an der motorischen Endplatte erklären. In Säugetieren führt die Blockade von N-Typ Calciumkanälen an der motorischen Endplatte durch ω -Conotoxin GVIA zu keiner Beeinträchtigung der neuromuskulären Transmission (Protti et al., 1996; Katz et al., 1997). Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass CIDP-IgG mit spannungsabhängigen Calciumkanälen interagiert und ihre Funktion verändert. Um jedoch eine direkte Aussage über den Effekt von CIDP-IgG auf die Funktion von spannungsabhängigen Calciumkanälen an der motorischen Endplatte treffen zu können, wären *Calcium-Imaging*-Experimente an Zwerchfellpräparaten von Mäusen nötig. Bisher sind diese jedoch technisch nicht möglich.

Eine direkte Blockade des P/Q-Typ Calciumkanals durch Autoantikörper konnte bereits für das GBS nachgewiesen werden. Eine Studie von Nakatani et al. (2009) konnte anhand von *Patch-Clamp*-Experimenten zeigen, dass Seren und gereinigtes IgG von Patienten mit AMAN, einer Variante des GBS, zu einer reversiblen Hemmung von Calciumströmen durch P/Q-Typ (Cav2.1) Calciumkanäle in Purkinjellen führten. Ein gleicher Effekt wurde durch monoklonale Antikörper gegen das Gangliosid GM1 erzielt. Buchwald et al. (2007) konnten ebenfalls nachweisen, dass monoklonale Antikörper gegen die Ganglioside GM1 und GD1a zu einer Reduktion des Calciumeinstroms durch P/Q-Typ Calciumkanäle in kultivierte Neurone führte. Gleichzeitig riefen diese Antikörper eine Abnahme des *quantal contents* an der motorischen Endplatte von Mäusen hervor. Es ist bekannt, dass Ganglioside mit Membranproteinen Komplexe bilden und die Aktivität von Ionenkanälen modulieren können. GM1 und GQ1b werden mit der Aktivierung von Calciumkanälen in Zusammenhang gebracht (Carlson et al., 1994; Tanaka et al., 1997; Ando et al.,

1998). Im Serum von Patienten mit GBS und seinen Varianten werden häufig Anti-Gangliosid-Antikörper detektiert und mit der Pathogenese dieser Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Im Serum von CIDP-Patienten können Anti-Gangliosid-Antikörper seltener nachgewiesen werden. Ihre Beteiligung an der Pathogenese ist daher umstritten. In der vorliegenden Studie konnte kein direkter Hinweis auf eine Antikörper-Gangliosid-vermittelte Calciumkanalblockade gefunden werden, da die getesteten CIDP-IgG-Fraktionen keine Antikörperaktivität gegen GD1a, GD1b, GM1, GQ1b und GT1b aufwiesen. Die Gruppe der Ganglioside ist jedoch umfangreich und Interaktionen von CIDP-Antikörpern mit anderen, in diesem Ansatz nicht berücksichtigten Gangliosiden können nicht ausgeschlossen werden.

Die durch eine zweite Gruppe von CIDP-IgGs hervorgerufene präsynaptische Blockade scheint auf einem Mechanismus zu beruhen, der nicht auf eine Blockade von spannungsabhängigen Calciumkanälen zurückzuführen ist. Die Reduktion des *quantal contents* korrelierte nicht mit einer Abnahme des Calciumeinstroms in kultivierte Neurone, was gegen eine Antikörper-vermittelte Blockade von P/Q-Typ Calciumkanälen spricht. Da alle elektrophysiologischen Experimente in Anwesenheit des Natriumkanalblockers TTX durchgeführt wurden, kann die präsynaptische Blockade ebenfalls nicht auf eine Veränderung der Funktionsweise spannungsabhängiger Natriumkanäle zurückgeführt werden. Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit Antikörper-vermittelten Effekten, die bereits für das GBS, MFS und LEMS beschrieben wurden (Buchwald et al., 1995; Buchwald et al., 1998; Buchwald et al., 2005) und stehen im Einklang mit der Studie von Würz et al. (1995), in der anhand von *Patch-Clamp*-Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass CSF, nicht aber Seren von CIDP-Patienten zu einer Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle führt. Plasma von Patienten mit MMN, einem Subtyp von CIDP, und GBS hatten ebenfalls keinen Einfluss auf die Funktion von spannungsabhängigen Natriumkanälen von kultivierten Motoneuronen (Benatar et al., 1999). Takigawa et al. (2000) konnten zeigen, dass Anti-GM1-positive Seren von CIDP- und GBS-Patienten, sowie monoklonale Anti-GM1-Antikörper (Takigawa et al., 1995; Weber et al., 2000) nur in Anwesenheit von Komplementfaktoren mit Natriumkanälen interferieren. Dies steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie, da alle untersuchten IgG-Fraktionen frei von Komplementfaktoren waren.

Des Weiteren spricht eine Reduktion des *quantal contents*, wie in der vorliegenden Studie beschrieben, gegen eine Interaktion von CIDP-IgG mit spannungsabhängigen

Kaliumkanälen der motorischen Endplatte, da eine Antikörper-vermittelte Blockade des Kaliumausstroms in einer Zunahme des *quantal contents* resultieren würde. An der Synapse führt der Kaliumausstrom zur Repolarisation der präsynaptischen Membran und terminiert den Calciumeinstrom und damit auch die Transmitterfreisetzung. Eine Blockade der spannungsabhängigen Kaliumkanäle hätte zur Folge, dass spannungsabhängige Calciumkanäle länger geöffnet bleiben und folglich mehr Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusionieren. Eine Studie von Shillito et al. (1995) konnte an Zwerchfellpräparaten von Mäusen zeigen, dass IgG von Patienten mit Neuromyotomie zu einem Anstieg des *quantal contents* an der neuromuskulären Endplatte führt. Erklärt wurde dieser Effekt durch eine Antikörper-vermittelte Blockade spannungsabhängiger Kaliumkanäle. In der vorliegenden Studie wurde ein gegenteiliger Effekt in Form eines reduzierten *quantal contents* durch CIDP-IgG hervorgerufen, was die Beteiligung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen an der präsynaptischen Blockade nahezu ausschließt.

Eine Reduktion der Transmitterfreisetzung, die nicht auf Beeinträchtigungen der Funktion von spannungsabhängigen Calcium-, Natrium- oder Kaliumkanälen zurückgeführt werden kann, könnte durch Antikörper-vermittelte Veränderungen der aktiven Zonen entstehen. Die Lokalisation von spannungsabhängigen Calciumkanälen im Bereich der aktiven Zonen gewährleistet einen hohen lokalen Anstieg der Calciumkonzentration und damit eine schnelle, synchrone Transmitterfreisetzung von der Präsynapse. Wird durch eine CIDP-Antikörperbindung im Bereich der aktiven Zonen die Distanz zwischen Calciumkanälen und dem Calciumsensor der Fusionsmaschinerie erhöht, resultiert dies aufgrund des längeren Diffusionswegs in einer Abnahme der lokalen Calciumkonzentration. Weniger Vesikel fusionieren mit der präsynaptischen Membran und der *quantal content* sinkt. Beim LEMS wird das Vesikel-assoziierte, calciumbindende Protein Synaptotagmin als mögliches Antigen von Autoantikörpern diskutiert (Martin-Moutot et al., 1993; el Far et al., 1995; Takamori et al., 1995; Takamori et al., 2000). Da der N-Terminus dieses Proteins während der Vesikelfusion im extrazellulären Bereich der motorischen Endplatte liegt, stellt er einen möglichen Angriffspunkt für Antikörper dar, über den die Exozytose von Acetylcholin beeinflusst werden könnte. Auch intrazelluläre Wirkmechanismen von pathogenen Antikörpern können bei der CIDP nicht ausgeschlossen werden. Mehrere Studien konnten demonstrieren, dass IgG von der Nervenendigung der motorischen Endplatte durch Endozytose aufgenommen wird (Fratantoni et al., 1996) und dort

mit intrazellulären Strukturen interferieren kann. Ein solcher intrazellulärer Mechanismus des CIDP-IgGs könnte vor allem bei den Patienten mit einer langsam eintretenden präsynaptischen Blockade vorkommen. Ob eine solche Endozytose von Antikörpern jedoch innerhalb von Minuten stattfindet und eine Reduktion des *quantal contents* bewirken kann, bleibt offen.

In der vorliegenden Studie konnte allen getesteten CIDP-IgG-Fraktionen eine präsynaptisch blockierende Eigenschaft nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass dieser Effekt ein verbreitetes Charakteristikum der CIDP darstellt. Weitere Forschungsarbeiten sind nötig, um die detaillierten Mechanismen der präsynaptischen Blockade aufzuklären.

4.2 Neutralisation der präsynaptischen Blockade durch IVIg

Therapeutisches IVIg wird bei der CIDP und einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen erfolgreich eingesetzt (Hughes et al., 2001; Mendell et al., 2001; Hughes et al., 2008). Wie IVIg das Immunsystem der Patienten beeinflusst und zu einer Abschwächung der Symptome führt, ist nicht vollständig geklärt. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass IVIg in der Lage ist, eine durch GBS- bzw. LEMS-IgG hervorgerufene präsynaptische Blockade an der neuromuskulären Endplatte von Mäusen zu neutralisieren (Buchwald et al., 2002; Buchwald et al., 2005). In der vorliegenden Studie konnte dieser Effekt auch für CIDP-IgG bestätigt werden. Die Experimente wurden exemplarisch mit den IgG-Fraktionen von zwei Patienten (Patient 1 und 3) durchgeführt, die jeweils stellvertretend für die Gruppe mit einer schnell und einer langsam auftretenden präsynaptischen Blockade sind (Abschnitt 4.1.1). Zusätzlich führte nur das CIDP-IgG von Patient 1 sowohl zu einer Reduktion der Transmitterfreisetzung an der motorischen Endplatte als auch des Calciumeinstroms in kultivierte Neurone. Die Koinkubation von IVIg mit dem CIDP-IgG führte zu einer Neutralisation der präsynaptischen Blockade an der motorischen Endplatte. Während die durch das CIDP-IgG von Patient 3 hervorgerufene neuromuskuläre Blockade durch die Koinkubation mit IVIg vollständig aufgehoben wurde, trat auch nach der Koinkubation der IgG-Fraktion von Patient 1 mit IVIg eine schwache, jedoch nicht signifikante Reduktion des *quantal contents* auf. Dies könnte für einen höhe-

ren Titer von neuromuskulär blockierenden Antikörpern innerhalb der IgG-Fraktion von Patient 1 sprechen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass IVIg unabhängig vom Mechanismus der präsynaptischen Blockade und vom Antigen wirksam ist. Die Tatsache, dass hochaufgereinigtes IgG von CIDP-Patienten verwendet wurde, unterstützt die Annahme, dass der neutralisierende Effekt auf einer direkten Interaktion des IVIGs mit blockierenden Antikörpern und nicht mit anderen Serumkomponenten, wie Komplementfaktoren oder Zytokinen, basiert.

Therapeutisches IVIg wird aus einem Pool von über 1000 Spendern gewonnen. Dadurch enthält es ein weites Spektrum an idiotypischen und antiidiotypischen Antikörpern und besitzt dadurch eine hohe idiotypische-antiidiotypische Spezifität. Antiidiotypische Antikörper sind in der Lage pathogene Autoantikörper zu binden und die Interaktion mit dem Zielantigen zu verhindern. Dieser Effekt konnte experimentell in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (Dietrich und Kazatchkine, 1990; Krause et al., 1998; Lopez et al., 2000; Dalakas, 2002) und könnte auch der hier beobachteten Interaktion des IVIGs mit CIDP-IgG und damit der Neutralisation der neuromuskulären Blockade zu Grunde liegen. Ein vergleichbarer Effekt von IVIg wurde für verschiedene Neuropathien beschrieben. Van Doorn et al. (1990) detektierten im Serum eines CIDP-Patienten IgM-Antikörper, die mit Membranantigenen von Neuroblastomzellen (NBL) kreuzreagierten. Die Inkubation des IgMs mit IVIg und F(ab')₂-Fragmenten des IVIGs resultierte in einer dosisabhängigen Hemmung der Anti-NBL-Antikörperbindung. Jacobs et al. (2003) konnten an der motorischen Endplatte nachweisen, dass die Aktivität von Anti-GQ1b-Antikörpern durch IVIg dosisabhängig reduziert wurde. Eine Neutralisation der Aktivität von GBS- und LEMS-Antikörpern durch IVIg konnte durch Buchwald et al. (2002, 2005) gezeigt werden. Da angenommen wird, dass mehrere Antigene in die Pathogenese der CIDP involviert sind und IVIg bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen wirksam ist, spricht dies für ein allgemeines Wirkprinzip des IVIGs und die Vielfältigkeit der darin enthaltenen antiidiotypischen Antikörper.

Alternativ zum klassischen idiotypisch-antiidiotypischen Mechanismus wäre es ebenso möglich, dass neutralisierende Antikörper an Strukturen der neuromuskulären Endplatte binden und zu einer unspezifischen sterischen Behinderung pathogener Antikörper führen und damit Interaktionen mit der synaptischen Membran verhindern. Abbildung 4.2 veranschaulicht die möglichen Wirkmechanismen von IVIg an der motorischen Endplatte.

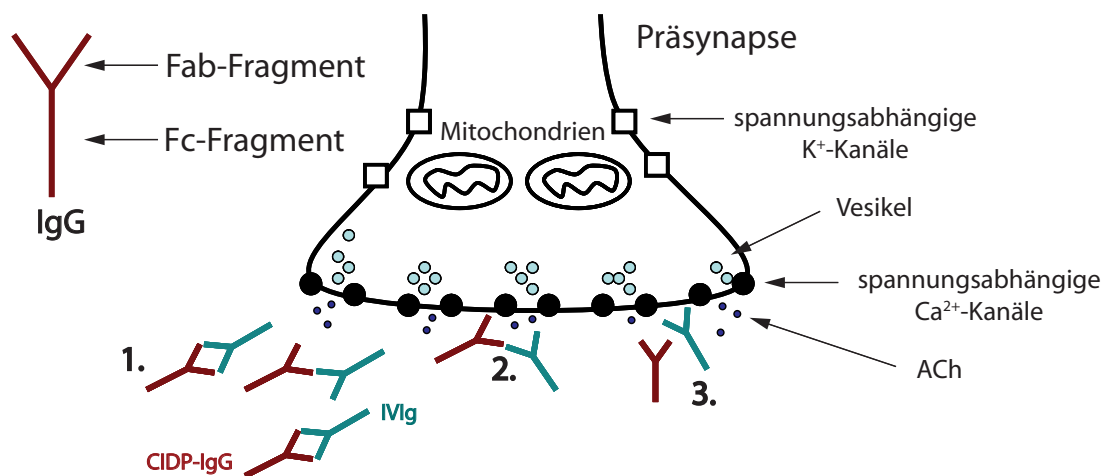


Abbildung 4.2: Mögliche Wirkmechanismen von IVIg. 1. IVIg bindet an das Fab-Fragment der CIDP-IgGs. 2. Durch die Bindung des IVIgs an das CIDP-IgG wird die Interaktion zwischen Autoantikörper und Antigen verhindert (Dalakas, 2002). 3. Alternativ könnte IVIg an Strukturen der motorischen Endplatte binden ohne einen Effekt auf die neuromuskuläre Transmission zu haben und zu einer unspezifischen sterischen Behinderung der CIDP-Antikörper-Antigen-Interaktion führen.

Die vorliegende Studie bestätigt den neutralisierenden Effekt von IVIg auf CIDP-Antikörper. Neben der Neutralisation von pathogenen Autoantikörpern existieren vermutlich weitere Mechanismen, mit denen IVIg im Patienten, zumindest indirekt, auf Autoantikörper wirkt. Studien weisen auf eine IVIg-induzierte Erhöhung des IgG-Katabolismus (Masson, 1993) und eine Reduktion der IgG-Produktion durch B-Lymphozyten (Kondo et al., 1991) hin. Das Zusammenspiel dieser Mechanismen könnte zu einer Reduktion pathogener Antikörper im Patienten führen und letztendlich zur Linderung der Muskelschwäche beitragen.

4.3 Klinische Bedeutung neuromuskulär blockierender Antikörper bei der CIDP

Die vorliegende Studie stützt die Annahme, dass CIDP eine autoimmune Erkrankung ist, bei der humorale Faktoren gegen bisher unbekannt Antigenen der moto-

rischen Endplatte eine wichtige Rolle spielen könnten. Eine Antikörper-vermittelte, komplementunabhängige Beeinträchtigung der neuromuskulären Transmission könnte zur Muskelschwäche bei CIDP-Patienten beitragen. Insbesondere in frühen Krankheitsstadien würde der Nachweis dieser blockierenden Antikörper bei noch fehlender Schädigung des Myelins und der Axone eine plausible Erklärung für Paresen liefern und den Therapieerfolg durch Plasmapheresen verständlich machen. Die CIDP folgt bei einem Teil der Patienten einem rezidivierenden Krankheitsverlauf. Diese Schwankungen der Krankheitsausprägung und die Rückbildung von Paresen sprechen für pathophysiologische Effekte von Autoantikörpern an der motorischen Endplatte. Ein progredienter oder sekundär progredienter Krankheitsverlauf könnte dagegen morphologische Veränderungen und strukturelle Läsionen durch den fortschreitenden Immunprozess widerspiegeln. Mehrere Studien zeigen, dass Patienten mit einem rezidivierenden Krankheitsverlauf bessere Aussichten auf einen weniger gravierenden Gesamtverlauf haben (McCombe et al., 1987; Barohn und Saperstein, 1998; Bouchard et al., 1999; Sghirlanzoni et al., 2000) und besser auf IVIg-Therapien ansprechen als Patienten mit progredientem Verlauf (Hahn et al., 1996). Das Zusammenspiel verschiedener Mechanismen, in die scheinbar sowohl funktionell beeinflussende Autoantikörper als auch komplementvermittelte destruktive Prozesse (Demyelinisierung und axonaler Verlust) involviert sind, kann in einem breiten Spektrum an Krankheitsschwere und Symptomausprägung und damit in einer großen Variabilität des Krankheitsbildes der CIDP resultieren.

Obwohl CIDP und GBS viele klinische Gemeinsamkeiten aufweisen, unterscheiden sie sich in ihrem Zeitverlauf. Welche Faktoren einem chronischen oder akuten Krankheitsverlauf zu Grunde liegen, ist unbekannt. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Antikörper-vermittelten Effekte auf die neuromuskuläre Transmission irreversibel waren. Für das GBS hingegen konnten Buchwald et al. (1998) und Nakatani et al. (2009) eine Reversibilität der Antikörper-vermittelten Effekte auf die neuromuskuläre Transmission und den Calciumeinstrom durch P/Q-Typ Calciumkanäle in Purkinjezellen beobachten. Diese scheinbar verschiedenen Bindungseigenschaften der Antikörper an die motorische Endplatte, sowie unterschiedliche Zielantigene beim GBS und der CIDP könnten Ursachen für einen akuten oder chronischen Krankheitsverlauf darstellen.

In die vorliegende Studie wurden IgG-Fraktionen von elf CIDP-Patienten einbe-

zogen. Dies erscheint auf den ersten Blick wenig, aber im Vergleich zu ähnlichen elektrophysiologische Studien an seltenen Autoimmunerkrankungen, in denen die Anzahl der untersuchten Patientenserum bzw. Antikörperfraktionen zwischen zwei und neun lag (Lerrick et al., 1983; Takigawa et al., 2000; Krampfl et al., 2003; Nakatani et al., 2007; Ishida et al., 2008; Nakatani et al., 2009), liegt die Anzahl der hier untersuchten CIDP-IgG-Fraktionen im oberen Bereich. Sowohl die genannten als auch viele weitere Studien konnten trotz der geringeren Anzahl an untersuchten Patientenserum zu einem besseren Verständnis und sogar zur Aufklärung der Pathogenese (z.B. von Myasthenia gravis) beitragen. Die CIDP-Patienten wurden für die vorliegende Studie nach strengen klinischen Kriterien ausgewählt. Des Weiteren wurde für alle Experimente ausschließlich Patientenmaterial der ersten durchgeführten Plasmapherese verwendet. Zusammengefasst erlauben diese Punkte eine Aussage über die mögliche klinische Relevanz der beobachteten CIDP-IgG-Effekte. Zusätzlich muss man bedenken, dass die CIDP eine sehr seltene Erkrankung ist, deren mittlere Prävalenz bei 1-2 Fällen pro 100000 Erwachsenen (Lunn et al., 1999; McLeod et al., 1999) liegt. Dies entspricht, bezogen auf die Gesamteinwohnerzahl Deutschlands von rund 82 Millionen, 820-1640 Erkrankten. Im Vergleich dazu liegt die Krankheitshäufigkeit von Multiple Sklerose bei 149 Fällen pro 100000 Einwohnern (Hein und Hopfenmüller, 2000), also ca. 122180 Erkrankten in Deutschland. Dieser Vergleich spiegelt die Seltenheit der CIDP und damit die Schwierigkeit der Patientenmaterialbeschaffung wider.

4.4 Charakterisierung des Zielantigens bei CIDP

4.4.1 CIDP-IgG zeigt keine Antikörperaktivität gegen Ganglioside

Seit Jahren werden Ganglioside als mögliche Zielantigene bei der CIDP diskutiert, jedoch bleibt ihre Rolle trotz zahlreicher Untersuchungen umstritten. In der vorliegenden Studie konnte keine Antikörperaktivität gegen die Ganglioside GD1a, GD1b, GM1, GQ1b und GT1b nachgewiesen werden und damit nicht mit der präsynaptischen Blockade und der Reduktion des Calciumeinstroms in Neurone des *Bulbus olfactorius* in Verbindung gebracht werden. Der Nachweis von Anti-Gangliosid-

Antikörpern stellt kein typisches Charakteristikum bei der klassischen CIDP dar. Während bei der MMN, einem Subtyp der CIDP, bis zu 80% der Patienten Antikörper gegen GM1 aufweisen (Gallardo et al., 2001; Hughes et al., 2006), besitzen nur zwischen 0-23% der Patienten mit klassischer CIDP IgG-Antikörper gegen GM1 (Simone et al., 1993; van Schaik et al., 1994; Yuki et al., 1996; Gallardo et al., 2001). Ganglioside werden mit vielen physiologisch bedeutenden Funktionen in Verbindung gebracht, die durch die Bindung von pathogenen Antikörpern beeinträchtigt werden können. So konnte gezeigt werden, dass Anti-Gangliosid-Antikörper zu einer Blockade der neuromuskulären Transmission bei Mäusen und des Calciumeinstroms durch spannungsabhängige Calciumkanäle führen, sowie die Funktion von spannungsabhängigen Natriumkanälen und Kaliumkanälen verändern (Takigawa et al., 1995; Takigawa et al., 2000; Weber et al., 2000; Buchwald et al., 2007; Nakatani et al., 2009). Die vorliegende Studie spricht gegen eine bedeutende Rolle der oben genannten Ganglioside bei den beobachteten IgG-Effekten, schließt jedoch Ganglioside aufgrund ihres großen Spektrums als Zielantigene nicht aus. Des Weiteren wurden die hier verwendeten Ganglioside aus Hirngewebe von Rindern gewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Anti-GM1-Antikörpern von GBS-Patienten an Ganglioside des zentralen Nervensystems (ZNS) schwächer ist als an Ganglioside des PNS (Ogawa-Goto und Abe, 1998). Antikörperaktivitäten gegen spezifische Ganglioside des peripheren Nervens könnten dadurch nicht detektierbar sein. Alternativ könnte eine fehlende Antikörperaktivität der CIDP-IgGs auch auf Unterschiede zwischen humanen und bovinen Gangliosiden zurückgeführt werden. Yoshino et al. (1992) konnten jedoch zeigen, dass Anti-GM1-positive Patientenserum eine Antikörperaktivität gegen bovines GM1 aufwiesen. In der Studie von Buchwald et al. (2001) traten bei neun von elf MFS-Patienten Antikörperaktivitäten gegen bovines GQ1b auf. Dies spricht dafür, dass eine Interaktion von humanen Antikörpern mit bovinen Gangliosiden möglich ist. Die vorliegende Studie kann jedoch nicht ausschließen, dass CIDP-IgG mit anderen, in diesem Ansatz nicht berücksichtigten Gangliosiden interagiert.

4.4.2 Spezifische Bindungen von CIDP-IgG an Proteine des Zwerchfells

Aufgrund von unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers an Zwerchfellproteine von Mäusen konnten spezifische Bindungen des CIDP-IgGs im Bereich von 30-60 kDa nur schwer identifiziert werden. Drei verschiedene sekundäre Antikörper wurden getestet und in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen, jedoch gelang es nicht, das Protokoll dahingehend zu optimieren, dass keine unspezifischen Antikörperbindungen auftraten. Die IgG-Fractionen von fünf Patienten zeigten eine Antikörperaktivitäten im Bereich von 13, 20, 30 und 50 kDa. In Bezug auf die zuvor diskutierten Mechanismen der präsynaptischen Blockade, liegen Synaptotagmin II mit 47 kDa und P0 mit 28 kDa im Bereich der IgG-Aktivität. Beide Proteine stellen potentielle Antigene bei der CIDP dar. Die Tatsache, daß keine Banden beim Kontroll-IgG und bei fünf CIDP-IgGs auftraten, bedeutet nicht zwangsläufig, daß keine Bindung stattfand. Vielmehr wäre denkbar, daß spezifische Bindungen aufgrund der unspezifischen Signale des zweiten Antikörpers nicht sichtbar waren.

Die variablen Ergebnisse zahlreicher Studien geben Grund zur Annahme, dass die Pathogenese der CIDP nicht von einer Immunantwort gegen ein einzelnes, sondern gegen mehrere Antigene innerhalb des PNS abhängt. Dies könnte in der vorliegenden Studie eine Erklärung für die Bindung des CIDP-IgGs an verschiedene Proteine des Zwerchfells liefern. Da es nicht möglich war, die Region der motorischen Endplatte aus dem Zwerchfell der Maus zu isolieren, enthielt das Homogenat sämtliche Bestandteile der Nerven und des Muskels und somit eine Vielzahl von möglichen Angriffspunkten für Antikörper. Zusätzlich spielt das Komplementsystem bei der CIDP eine entscheidende Rolle bei der Demyelinisierung der peripheren Nerven. Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt über die Bindung von Antikörpern an ihre Antigene und führt letztendlich zur Zerstörung der Zielstruktur. Läsionen im PNS konnten ebenso wie IgG-Ablagerungen auf der Oberfläche von Schwann-Zellen bei Nervenbiopsien von CIDP-Patienten beobachtet werden (Dalakas und Engel, 1980; Mazzeo et al., 2004), was für eine zusätzliche Bindung von CIDP-IgG an Strukturen außerhalb der Synapsenregion sprechen könnte.

4.4.3 P0 als mögliches Zielantigen

Neben Gangliosiden werden periphere Myelinproteine, insbesondere P0, als potentielle Zielantigene bei der CIDP diskutiert. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass monoklonale Anti-P0-Antikörper in der Lage sind, die neuromuskuläre Transmission zu verändern. Der Mechanismus dieser Antikörper-vermittelten, konzentrationsabhängigen Reduktion des *quantal contents*, ohne nachweisbaren postsynaptischen Effekt, ist unklar. Die *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode umfasst einen Teil der prä- und postsynaptischen Membran, sowie der terminalen Schwann-Zelle. Obwohl die terminale Schwann-Zelle zu den nichtmyelinisierenden Schwann-Zellen gehört, exprimiert sie P0 (Georgiou und Charlton, 1999). Die Rolle von P0 in diesen Zellen ist unbekannt, wurde jedoch mit Nerv-Glia-Interaktionen in Verbindung gebracht. Die terminale Schwann-Zelle ist aktiv in die Regulation der neuromuskulären Transmission involviert und besitzt eine Vielzahl an Ionenkanälen und Rezeptoren (Feng et al., 2005), wie beispielsweise spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle, spannungsabhängige Natriumkanäle und muskarinische Acetylcholinrezeptoren (Robitaille et al., 1996; Auld und Robitaille, 2003; Musarella et al., 2006). Über welche Mechanismen terminale Schwann-Zellen Einfluß auf die neuromuskuläre Transmission ausüben, ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise führt eine Bindung von Anti-P0-Antikörpern an terminale Schwann-Zellen zu Beeinträchtigungen von Ionenkanälen oder Rezeptorbindungsstellen, die wiederum entscheidend für die Kommunikation zwischen Präsynapse und Schwann-Zelle sind. Ähnlich wie Anti-Gangliosid-Antikörper könnten Antikörper mit P0 Komplexe bilden, die zu einer Blockade von Ionenkanälen führen. Ein solcher Effekt wurde bisher nicht beschrieben. Der Zeitverlauf der durch monoklonale Anti-P0-Antikörper hervorgerufenen präsynaptischen Blockade entsprach einer kontinuierlichen, langsamen Reduktion des *quantal contents*. Ein vergleichbarer Effekt trat ebenso nach der Applikation einiger CIDP-IgG-Fraktionen auf (Abschnitt 4.1.1). Die vorliegende Studie könnte eine Verbindung zwischen Anti-P0-Antikörpern und CIDP herstellen. Könnte dieser Effekt von Anti-P0-Antikörpern in Zukunft bestätigt und aufgeklärt werden, würde er nicht nur bei Anti-P0-positiven CIDP-Patienten, sondern bei einer Vielzahl von autoimmunen Neuropathien eine alternative Erklärung für Muskelschwächen liefern.

5 Zusammenfassung

Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) ist eine erworbene Erkrankung des peripheren Nervensystems, die durch chronisch auftretende Muskelschwäche und Sensibilitätsstörungen charakterisiert ist. Viele Studien deuten darauf hin, dass die Entstehung der CIDP auf autoimmune Prozesse zurückzuführen ist, in die sowohl zellvermittelte als auch humorale Immunmechanismen gegen bisher unbekannte Antigene involviert sind. Eindeutig geklärt werden konnte die Pathogenese bisher jedoch nicht.

Um neue Erkenntnisse über die Rolle humoraler Faktoren bei der Entstehung der CIDP und der damit verbundenen Muskelschwäche zu erlangen, wurde der Effekt von aufgereinigtem IgG von elf Patienten mit klassischer CIDP auf die neuromuskuläre Transmission untersucht. Mit Hilfe der durchströmten *Macro-Patch-Clamp*-Elektrode konnte die Wirkung dieser Antikörper an Zwerchfellpräparaten der Maus erforscht werden. Das Modell der motorischen Endplatte wurde gewählt, weil sie aufgrund ihrer fehlenden Myelinscheide und Blut-Nerv-Schranke frei zugänglich für pathogene Antikörper ist und damit ein etabliertes Modell zur Untersuchung von autoimmun-vermittelten Muskelschwächen darstellt. Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Untersuchungen wurde der Effekt verschiedener CIDP-IgGs auf den Calciumeinstrom in kultivierte Neurone des *Bulbus olfactorius* der Maus mittels *Calcium-Imaging*-Experimenten getestet. Des Weiteren wurde die Frage nach dem Zielantigen durch ELISA, *Westernblots* und die Applikation von monoklonalen Anti-P0-Antikörpern genauer betrachtet. Da die Verabreichung von intravenösen Immunglobulinen (IVIg) eine akzeptierte Therapie bei CIDP-Patienten darstellt, die Wirkungsweise jedoch nicht eindeutig geklärt ist, wurden außerdem Koinkubationsexperimente mit IVIg und CIDP-IgG durchgeführt. Dadurch sollte untersucht werden, ob und, gegebenenfalls, welchen Einfluss IVIg auf Effekte der CIDP-Antikörper hat.

Die Applikation der CIDP-IgG-Fractionen führte zu einer irreversiblen, signifikanten Reduktion der Transmitterausschüttung an der motorischen Endplatte. Ein

postsynaptischer Effekt konnte nach der Applikation von acht CIDP-IgGs nicht beobachtet werden, was die präsynaptische Natur der Blockade bestätigte. Sowohl das Ausmaß als auch der zeitliche Verlauf dieser präsynaptischen Blockade variierte zwischen den IgG-Fractionen verschiedener Patienten. Während sie bei einer Gruppe schnell, innerhalb von Minuten eintrat, entwickelte sie sich bei einer zweiten Gruppe kontinuierlich über die Zeit hinweg. Diese Unterschiede deuten erstmals auf verschiedene Mechanismen hin, die der Abnahme der Acetylcholinfreisetzung zu Grunde liegen könnten. Unterstützt wurde diese Annahme durch die unterschiedlichen Effekte der CIDP-IgGs auf den Calciumeinstrom in kultivierte Neurone. Die durch drei CIDP-IgG-Fractionen hervorgerufene präsynaptische Blockade korrelierte mit einer signifikanten Reduktion des Calciumeinstroms in die Zellen, was auf eine Interaktion der Antikörper mit P/Q-Typ Calciumkanälen hinwies. Zwei CIDP-IgG-Fractionen hatten keinen Effekt auf den Calciumeinstrom. Das IgG eines weiteren Patienten verursachte sogar einen Anstieg des Calciumeinstroms in kultivierte Neurone, obwohl es gleichzeitig zu einer verminderten Transmitterausschüttung an der motorischen Endplatte führte. Welche Mechanismen, die nicht auf eine Interaktion von CIDP-Antikörpern mit spannungsabhängigen Calciumkanälen zurückgeführt werden können, zur Blockade der Transmitterfreisetzung führten, ist unbekannt. Morphologische Veränderungen der aktiven Zonen oder intrazelluläre Effekte, die durch pathogene Antikörper hervorgerufen wurden, wären mögliche Erklärungen und würden für den langsameren Zeitverlauf der durch diese Gruppe von CIDP-IgG-Fractionen hervorgerufenen präsynaptischen Blockade sprechen.

Ganglioside werden als potentielle Zielstrukturen der Immunantwort bei der CIDP kontrovers diskutiert. Sie werden mit vielen physiologisch bedeutenden Funktionen in Verbindung gebracht, die durch die Bindung von pathogenen Antikörpern beeinträchtigt werden können. In der vorliegenden Studie konnten keine Anti-Gangliosid-Antikörper in den IgG-Fractionen der CIDP-Patienten detektiert werden und damit nicht mit den beobachteten Effekten in Zusammenhang gebracht werden. Als weitere potentielle Zielantigene werden periphere Myelinproteine, insbesondere P0, diskutiert. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass monoklonale Anti-P0-Antikörper zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der neuromuskulären Übertragung führen. Wie bei CIDP-Antikörpern, war dieser Effekt präsynaptischer Natur und eine Beeinträchtigung postsynaptischer Strukturen konnte nicht nachgewiesen werden. Ein solcher Mechanismus wäre für Anti-P0-positive CIDP-Patienten denkbar.

In der vorliegenden Studie konnte nur bei der IgG-Fraktion eines Patienten eine Bindung an ein Zwerchfellprotein im Bereich von P0 beobachtet werden. Am häufigsten trat eine Reaktion gegen ein bisher nicht identifiziertes, 20 kDa-Protein des Mäusezwerchfells auf.

Die Verabreichung von IVIg stellt eine verbreitete Therapie bei Autoimmunerkrankungen dar. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass therapeutisches IVIg in der Lage ist, die durch CIDP-IgG hervorgerufene präsynaptische Blockade zu neutralisieren. Vermutlich geschah dies über einen idiotypisch-antiidiotypischen Mechanismus. Dieses Ergebnis bestätigt zusätzlich die Antikörper-vermittelte Natur der präsynaptischen Blockade und spiegelt den Erfolg, mit dem IVIg bei der CIDP-Therapie eingesetzt wird, wider.

Die vorliegende Studie spricht für eine pathophysiologische Bedeutung von humoralen Faktoren bei der CIDP. Autoantikörper, die zu einer komplementunabhängigen, irreversiblen, rein präsynaptischen Blockade der neuromuskulären Transmission führen, könnten eine Ursache der Muskelschwäche bei CIDP-Patienten darstellen. Des Weiteren erklären Autoantikörper, die über eine Veränderung der neuromuskulären Transmission wirken und nicht zwangsläufig zur komplementvermittelten Schädigung des PNS führen, den schnellen Therapieerfolg durch Plasmapheresen. Um gezieltere Therapien entwickeln zu können, beispielsweise durch die Entwicklung spezifischer antiidiotypischer Antikörper, müssen in Zukunft die Zielantigene bei der CIDP weiter charakterisiert werden. Die vorliegende Studie trägt zum besseren Verständnis der Pathogenese der CIDP und der Therapieentwicklung bei.

6 Literatur

Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force (1991). Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Neurology* 41, 617-618.

ALLEN, D., GIANNOPOULOS, K., GRAY, I., GREGSON, N., MAKOWSKA, A., PRITCHARD, J., HUGHES, R.A. (2005). Antibodies to peripheral nerve myelin proteins in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 10, 174-180.

ANDO, S., TANAKA, Y., WAKI, H., KON, K., IWAMOTO, M., FUKUI, F. (1998). Gangliosides and sialylcholesterol as modulators of synaptic functions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 845, 232-239.

ANDORFER, B., KIESEIER, B.C., MATHEY, E., ARMATI, P., POLLARD, J., OKA, N., HARTUNG, H.P. (2001). Expression and distribution of transcription factor NF- κ B and inhibitor I κ B in the inflamed peripheral nervous system. *Journal of Neuroimmunology* 116, 226-232.

AULD, D.S., ROBITAILLE, R. (2003). Perisynaptic Schwann cells at the neuromuscular junction: nerve- and activity-dependent contributions to synaptic efficacy, plasticity, and reinnervation. *The Neuroscientist* 9, 144-157.

BALDWIN, A.S. Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology* 14, 649-683.

BARNES, P.J. (1997). Nuclear Factor- κ B. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 867-870.

BAROHN, R.J., SAPERSTEIN, D.S. (1998). Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Seminars in Neurology* 18, 49-61.

BARRETT-JOLLY, R., BYRNE, N., VINCENT, A., NEWSOM-DAVIS, J. (1994). Plasma from patients with seronegative myasthenia gravis inhibit nAChR responses in the TE671/RD cell line. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology* 428, 492-498.

BENATAR, M., WILLISON, H.J., VINCENT, A. (1999). Immune-mediated peripheral neuropathies and voltage-gated sodium channels. *Muscle & Nerve* 22, 108-110.

BONETTI, B., MONACO, S., GIANNINI, C., FERRARI, S., ZANUSSO, G., RIZZUTO, N. (1993). Human peripheral nerve macrophages in normal and pathological conditions. *Journal of the Neurological Sciences* 118, 158-168.

BOSBOOM, W.M.J., VAN DEN BERG, L.H., DE BOER, L., VAN SON, M.J., VELDMAN, H., FRANSSSEN, H., LOGTENBERG, T., WOKKE, J.H.J. (1999). The diagnostic value of sural nerve T cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 53, 837-845.

BOUCHARD, C., LACROIX, C., PLANTÉ, V., ADAMS, D., CHEDRU, F., GUGLIELMI, J.M., SAID, G. (1999). Clinicopathologic findings and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 52, 498-503.

BRANNAGAN, T.H. (2009). Current treatments of chronic immune-mediated demyelinating polyneuropathies. *Muscle & Nerve* 39, 563-578.

BRETAG, A.H. (1969). Synthetic interstitial fluid for isolated mammalian tissue. *Life Sciences* 8, 319-329.

BUCHWALD, B., WEISHAUPT, A., TOYKA, K.V., DUDEL, J. (1995). Immunoglobulin G from a patient with Miller-Fisher syndrome rapidly and reversibly depresses evoked quantal release at the neuromuscular junction of mice. *Neuro-*

cience Letters 201, 163-166.

BUCHWALD, B., TOYKA, K.V., ZIELASEK, J., WEISHAUPT, A., SCHWEIGER, S., DUDEL, J. (1998). Neuromuscular blockade by IgG antibodies from patients with Guillain-Barré syndrome: a macro-patch-clamp study. *Annals of Neurology* 44, 913- 922.

BUCHWALD, B., BUFLER, J., CARPO, M., HEIDENREICH, F., PITZ, R., DUDEL, J., NOBILE-ORAZIO, E., TOYKA, K.V. (2001). Combined pre- and post-synaptic action of IgG antibodies in Miller Fisher syndrome. *Neurology* 56, 67-74.

BUCHWALD, B., AHANGARI, R., WEISHAUPT, A., TOYKA, K.V. (2002). Intravenous immunoglobulin G neutralize blocking antibodies in Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology* 51, 673-680.

BUCHWALD, B., AHANGARI, R., WEISHAUPT, A., TOYKA, K.V. (2005). Presynaptic effects of immunoglobulin G from patients with Lambert-Eaton myasthenic syndrome: their neutralization by intravenous immunoglobulins. *Muscle & Nerve* 31, 487-494.

BUCHWALD, B. ZHANG, G., VOGT-EISELE, A.K., ZHANG, W., AHANGARI, R., GRIFFIN, J.W., HATT, H., TOYKA, K.V., SHEIKH, K.A. (2007). Anti-ganglioside antibodies alter presynaptic release and calcium influx. *Neurobiology of Disease* 28, 113-121.

CALDWELL, J.H., CAMPBELL, D.T., BEAM, K.G. (1986). Na channel distribution in vertebrate skeletal muscle. *The Journal of General Physiology* 87, 907-932.

CARLSON, R.O., MASCO, D., BROOKER, G., SPIEGEL, S. (1994). Endogenous ganglioside GM1 modulates L-type calcium channel activity in N18 neuroblastoma cells. *The Journal of Neuroscience* 14, 2272-2281.

CATTERALL, W.A., FEW, A.P. (2008). Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59, 882-901.

CHIBA, A., KUSUNOKI, S., SHIMIZU, T., KANAZAWA, I. (1992). Serum IgG antibody to ganglioside GQ1b is a possible marker of Miller Fisher syndrome. *Annals of Neurology* 31, 677-679.

CSURHES, P.A., SULLIVAN, A.A., GREEN, K., PENDER, M.P., McCOMBE, P.A. (2005). T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 76, 1431-1439.

DALAKAS, M.C., ENGEL, W.K. (1980). Immunoglobulin and complement deposits in nerves of patients with chronic relapsing polyneuropathy. *Archives of Neurology* 37, 637-640.

DALAKAS, M.D. (2002). Blockade of blocking antibodies in Guillain-Barré syndromes: „Unblocking“ the mystery of action of intravenous immunoglobulin. *Annals of Neurology* 51, 667-669.

DALAKAS, M.C. (2002). Mechanisms of action of IVIg and therapeutic considerations in the treatment of acute and chronic demyelinating neuropathies. *Neurology* 24 (Suppl 6), S13-21.

DEL CASTILLO, J., KATZ, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *Journal of Physiology* 124, 560-573.

DIETRICH, G., KAZATCHKINE, M.D. (1990). Normal immunoglobulin G (IgG) for therapeutic use (intravenous Ig) contain antiidiotypic specificities against an immunodominant, disease-associated, cross-reactive idiotype of human anti- thyroglobulin autoantibodies. *The Journal of Clinical Investigation* 85, 620-625.

DUDEL, J. (1989). Calcium dependence of quantal release triggered by graded depolarization pulses to nerve terminals on crayfish and frog muscle. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 415, 289-298.

EL FAR, O., MARQUÈZE, B., LEVEQUE, C., MARTIN-MOUTÔT, N., LANG, B., NEWSOM-DAVIS, J., YOSHIDA, A., TAKAHASHI, M., SEAGAR, M. (1995). Antigens associated with N- and L-Type calcium channels in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Journal of Neurochemistry* 64, 1696-1702.

FENG, Z., KOIRALA, S., KO, C.P. (2005). Synapse-glia interactions at the vertebrate neuromuscular junction. *The Neuroscientist* 11, 503-513.

FIALHO, D., CHAN, Y.C., ALLEN, D.C., REILLY, M.M., HUGHES, R.A. (2006). Treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy with methotrexate. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 77, 544-547.

FLUCHER, B.E., DANIELS, M.P. (1989). Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron* 3, 163-175.

FRATANTONI, S.A., DUBROVSKY, A.L., UCHITEL, O.D. (1996). Uptake of immunoglobulin G from amyotrophic lateral sclerosis patients by motor nerve terminals in mice. *Journal of the Neurological Sciences* 137, 97-102.

FREDMAN, P., VEDELER, C.A., NYLAND, H., AARLI, J.A., SVENNERHOLM, L. (1991). Antibodies in sera from patients with inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy react with ganglioside LM1 and sulphatide of peripheral nerve myelin. *Journal of Neurology* 238, 75-79.

FUKUNAGA, H., ENGEL, A.G., LANG, B., NEWSOM-DAVIS, J., VINCENT, A. (1983). Passive transfer of Lambert-Eaton myasthenic syndrome with IgG from man to mouse depletes the presynaptic membrane active zones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 7636-7640.

FUKUOKA, T., ENGEL, A.G., LANG, B., NEWSOM-DAVIS, J., PRIOR, C., WRAY, D.W. (1987). Lambert-Eaton myasthenic syndrome: I. Early morphological effects of IgG on the presynaptic membrane active zones. *Annals of Neurology* 22, 193-199.

GABRIEL, C.M., HUGHES, R.A., MOORE, S.E., SMITH, K.J., WALSH, F.S. (1998). Induction of experimental autoimmune neuritis with peripheral myelin protein-22. *Brain* 121, 1895-1902.

GALLARDO, E., ROJAS-GARCÍA, R., BELVÍS, R., SERRANO-MUNUERA, C., ORTIZ, E., ORTIZ, N., GRAU, J., ILLA, I. (2001). Antiganglioside antibodies: when, which and for what. *Neurología* 16, 293-297.

GEORGIU, J., CHARLTON, M.P. (1999). Non-myelin-forming perisynaptic Schwann cells express protein zero and myelin-associated glycoprotein. *Glia* 27, 101-109.

GHOSH, S., MAY, M.J., KOPP, E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology* 16, 225-260.

GOOD, J.L., CHEHRENAMA, M., MAYER, R.F., KOSKI, C.L. (1998). Pulse cyclophosphamide therapy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 51, 1735-1738.

GOODMAN, B.E. (2008). Channels active in the excitability of nerves and skeletal muscles across the neuromuscular junction: basic function and pathophysiology. *Advances in Physiology Education* 32, 127-135.

HAHN, A.F., BOLTON, C.F., PILLAY, N., CHALK, C., BENSTEAD, T., BRIL, V., SHUMAK, K., VANDERVOORT, M.K., FEASBY, T.E. (1996). Plasmaexchange therapy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, sham-controlled, cross-over study. *Brain* 119, 1055-1066.

HAHN, A.F., BOLTON, C.F., ZOCHODNE, D., FEASBY, TE (1996). Intravenous immunoglobulin treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Brain* 119, 1067-1077.

HARTUNG, H.P., HUGHES, R.A., TAYLOR, W.A., HEININGER, K., REINERS, K., TOYKA, K.V. (1990). T cell activation in Guillain-Barré syndrome and in MS: elevated serum levels of soluble IL-2 receptors. *Neurology* 40, 215-218.

HARTUNG, H.P., REINERS, K., SCHMIDT, B., STOLL, G., TOYKA, K.V. (1991). Serum interleukin-2 concentrations in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy: comparison with other neurological diseases of presumed immunopathogenesis. *Annals of Neurology* 30, 48-53.

HEIN, T., HOPFENMÜLLER, W. (2000). Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany. *Der Nervenarzt* 71, 288-294.

HO, T.W., McKHANN, G.M., GRIFFIN, J.W. (1998). Human autoimmune neuropathies. *Annual Review of Neuroscience* 21, 187-226.

HUGHES, R.A., GRAY, I.A., GREGSON, N.A., KADLUBOWSKI, M., KENNEDY, M., LEIBOWITZ, S., THOMPSON, H. (1984). Immune responses to myelin antigens in Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neuroimmunology* 6, 303-312.

HUGHES, R.A., BENZA, S., WILLISON, H., VAN DEN BERGH, P., COMI, G., ILLA, I., NOBILE-ORAZIO, E., VAN DOORN, P., DALAKAS, M., BOJAR, M., SWAN, A., INFLAMMATORY NEUROPATHY CAUSE AND TREATMENT (IN-CAT) GROUP (2001). Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Annals of Neurology* 50, 195-201.

HUGHES, R.A., ALLEN, D., MAKOWSKA, A., GREGSON N.A. (2006). Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of Peripheral Nervous System* 11, 30-46.

HUGHES, R.A., DONOFRIO, P., BRIL, V., DALAKAS, M.C., DENG, C., HANNA, K., HARTUNG, H.P., LATOV, N., MERKIES, I.S., VAN DOORN, P.A., ICE STUDY GROUP (2008). Intravenous immune globulin (10% caprylate-chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneu-

ropathy (ICE study): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurology* 7, 136-144.

ILYAS, A.A., MITHEN, F.A., DALAKAS, M.C., WARGO, M., CHEN, Z.W., BIELORY, L., COOK, S.D. (1991). Antibodies to sulfated glycolipids in Guillain-Barré syndrome. *Journal of the Neurological Sciences* 105, 108-117.

ILYAS, A.A., MITHEN, F.A., DALAKAS, M.C., CHEN, Z.W., COOK, S.D. (1992). Antibodies to acidic glycolipids in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of Neurological Sciences* 107, 111-121.

INGLIS, H.R., CSURHES, P.A., McCOMBE, P.A. (2007). Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 78, 419-422.

ISAACSON, J.S., STROWBRIDGE, B.W. (1998). Olfactory reciprocal synapses: dendritic signalling in the CNS. *Neuron* 20, 749-761.

ISHIDA, K., MITOMA, H., MIZUSAWA, H. (2008). Reversibility of cerebellar GABAergic synapse impairment induced by anti-glutamic acid decarboxylase autoantibodies. *Journal of the Neurological Sciences* 271, 186-190.

JACOBS, B.C., O'HANLON, G.M., BULLENS, R.W.M., VEITCH, J., PLOMP, J.J., WILLISON, H.J. (2003). Immunoglobulins inhibit pathophysiological effects of anti-GQ1b-positive sera at motor nerve terminals through inhibition of antibody binding. *Brain* 126, 2220-2234.

KANDA, T., NUMATA, Y., MIZUSAWA, H. (2004). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 75, 765-769.

KATZ, B., MILEDI, R. (1965). The effect of calcium on acetylcholine release from

motor nerve terminals. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain) 161, 496-503.

KATZ, E., FERRO, P.A., WEISZ, G., UCHITEL, O.D. (1996). Calcium channels involved in synaptic transmission at the mature and regenerating mouse neuromuscular junction. *The Journal of Physiology* 497, 687-697.

KATZ, E., PROTTI, D.A., FERRO, P.A., ROSATO SIRI, M.D., UCHITEL, O.D. (1997). Effects of Ca²⁺ channel blocker neurotoxins on transmitter release and pre-synaptic currents at the mouse neuromuscular junction. *British Journal of Pharmacology* 121, 1531-1540.

KHALILI-SHIRAZI, A., HUGHES, R.A., BROSTOFF, S.W., LININGTON, C., GREGSON, N. (1992). T cell responses to myelin proteins in Guillain-Barré syndrome. *Journal of the Neurological Sciences* 111, 200-203.

KHALILI-SHIRAZI, A., ATKINSON, P., GREGSON, N., HUGHES, R.A. (1993). Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 46, 245-252.

KIEFER, R., KIESEIER, B.C., STOLL, G., HARTUNG, H.P. (2001). The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology* 64, 109-127.

KIESEIER, B.C., TANI, M., MAHAD, D., OKA, N., HO, T., WOODROOFE, N., GRIFFIN, J.W., TOYKA, K.V., RANSOHOFF, R.M., HARTUNG, H.P. (2002). Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain* 125, 823- 834.

KIESEIER, B.C., KIEFER, R., GOLD, R., HEMMER, B., WILLISON, H.J., HARTUNG, H.P. (2004). Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle & Nerve* 30, 131-156.

KONDO, N., OZAWA, T., MUSHIAKE, K., MOTOYOSHI, F., KAMEYAMA, T., KASAHARA, K., KANEKO, H., YAMASHINA, M., KATO, Y., ORII, T. (1991). Suppression of immunoglobulin production of lymphocytes by intravenous immunoglobulin. *Journal of Clinical Immunology* 11, 152-158.

KRAMPFL, K., MOHAMMADI, B., BUCHWALD, B., JAHN, K., DENGLER, R., TOYKA, K.V., BUFLER, J. (2003). IgG from patients with Guillain-Barré syndrome interact with nicotinic acetylcholine receptor channels. *Muscle & Nerve* 27, 435-441.

KRAUSE, I., BLANK, M., SHOENFELD, Y. (1998). Anti-DNA and antiphospholipid antibodies in IVIg preparations: in vivo study in naive mice. *Journal of Clinical Immunology* 18, 52-60.

KWA, M.S., VAN SCHAIK, I.N., DE JONGE, R.R., BRAND, A., KALAYDJIEVA, L., VAN BELZEN, N., VERMEULEN, M., BAAS, F. (2003). Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies. *Brain* 126, 361-375.

LATOV, N., GROSS, R.B., KASTELMAN, J., FLANAGAN, T., LAMME, S., ALKAITIS, D.A., OLARTE, M.R., SHERMAN, W.H., CHESS, L., PENN, A.S. (1981). Complement-fixing antiperipheral nerve myelin antibodies in patients with inflammatory polyneuritis and with polyneuropathy and paraproteinemia. *Neurology* 31, 1530-1534.

LENNON, V.A., KRYZER, T.J., GRIESMANN, G.E., O'SUILLEABHAIN, P.E., WINDEBANK, A.J., WOPPMANN, A., MILJANICH, G.P., LAMBERT, E.H. (1995). Calcium-channel antibodies in the Lambert-Eaton syndrome and other paraneoplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine* 332, 1467-1474.

LEPPERT, D., HUGHES, P., HUBER, S., ERNE, B., GRYGAR, C., SAID, G., MILLER, K.M., STECK, A.J., PROBST, A., FUHR, P. (1999). Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology* 53, 62-70.

LERRICK, A.J., WRAY, D., VINCENT, A., NEWSOM-DAVIS, J. (1983). Electrophysiological effects of myasthenic serum factors studied in mouse muscle. *Annals of Neurology* 13, 186-191.

LIN, J.T., ROWE, V., BROSTOFF, S.W., ABDU, N.I. (1982). Lymphocyte studies in a patient with chronic polyradiculoneuropathy. *Neurology* 32, 1127-1132.

LOPEZ, P.H., IRAZOQUI, F.J., NORES, G.A. (2000). Normal human plasma contains antibodies that specifically block neuropathy-associated human anti-GM1 IgG-antibodies. *Journal of Neuroimmunology* 105, 179-183.

LUNN, M.P., MANJI, H., CHOUDHARY, P.P., HUGHES, R.A., THOMAS, P.K. (1999). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a prevalence study in south east England. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 66, 677-680.

MAHATTANAKUL, W., CRAWFORD, T.O., GRIFFIN, J.W., GOLDSTEIN, J.M., CORNBLATH, D.R. (1996). Treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with cyclosporine-A. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 60, 185-187.

MAHDI-ROGERS, M., RUTTERFORD, C., HUGHES, R.A., LÉGER, J.M., NOBILE-ORAZIO, E., VAN DEN BERGH, P., VAN DOORN, P., VAN SCHAIK, I.N., HUGHES, R.A., HADDEN, R.D., CHOY, E., REILLY, M., WINER, J., EVERS, E., VAN SCHAIK, I.N., VAN DOORN, P.A., LÉGER, J.M., NOBILE-ORAZIO, E., VAN DEN BERGH, P., CRÉANGE, A., GUEGUEN, A., UZENOT, D., LÉGER, J.M., BEHIN, A., NICOLAS, G., PAUTOT, V., UNCINI, A., MANZOLI, C., LAURIA, G., PAREYSON, D., NOBILE-ORAZIO, E., CASELLATO, C., SABATELLI, M., CONTE, A., LUIGETTI, M., BRIANI, C., LUCCHETTA, M., SCHENONE, A., BENEDETTI, L., FIORINA, E., VAN DOORN, P.A., BRUSSE, E., VAN SCHAIK, I.N., VAN DER KOOI, A.J., HUGHES, R.A., HADDEN, R.D., MAHDI-ROGERS, M., GUILOFF, R.J., RAKOWICZ, W.P., LECKY, B.R., DOUGAN, C.F., MARSHALL, D., WINER, J., DAVIES, N., BUSBY, M., LANSBURY, A., OVERELL,

J., WILLISON, H.J., RAJABALLY, Y.A., KENDALL, B., REILLY, M., GOW, D., NIXON, J., KULKARNI, O., KATIFI, H., HAMMANS, S., GIBSON, A., MCDERMOTT, C., CORNBLATH, D.R., CHAUDRY, V. (2009). Randomised controlled trial of methotrexate for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (RMC trial): a pilot, multicentre study. *Lancet Neurology* 8, 158-164.

MAIMONE, D., ANNUNZIATA, P., SIMONE, I.L., LIVREA, P., GUAZZI, G.C. (1993). Interleukin-6 levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 47, 55-61.

MALIK, U., OLEKSOWICZ, L., LATOV, N., CARDO, L.J. (1996). Intravenous gammaglobulin inhibits binding of anti-GM1 to its target antigen. *Annals of Neurology* 39, 136-139.

MARTIN-MOUTOT, N., EL FAR, O., LEVEQUE, C., DAVID, P., MARQUEZE, B., LANG, B., NEWSOM-DAVIS, J., HOSHINO, T., TAKAHASHI, M., SEAGAR, M.J. (1993). Synaptotagmin: A Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen that associates with presynaptic calcium channels. *Journal of Physiology, Paris* 87, 37-41.

MARTYN, J.A.J., FAGERLUND, M.J., ERIKSSON, L.I. (2009). Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia* 64, 1-9.

MASSON, P.L. (1993). Elimination of infectious antigens and increase of IgG catabolism as possible modes of action of IVIg. *Journal of Autoimmunity* 6, 683-689.

MATSUMURO, K., IZUMO, S., UMEHARA, F., OSAME, M. (1994). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: histological and immunopathological studies on biopsied sural nerves. *Journal of the Neurological Sciences* 127, 170-178.

MAZZEO, A., AGUENNOUZ, M., MESSINA, C., VITA, G. (2004). Immunolocalization and activation of transcription factor nuclear factor κ B in dysimmune neuropathies and familial amyloidotic polyneuropathy. *Archives of Neurology* 61, 1097-1102.

McCOMBE, P.A., POLLARD, J.D., McLEOD, J.G. (1987). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases. *Brain* 110, 1617-1630.

McCOMBE, P.A., POLLARD, J.D., McLEOD, J.G. (1988). Absence of antimyelin antibodies and serum demyelinating factors in most patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Clinical and Experimental Neurology* 25, 53-60.

McLEOD, J.G., POLLARD, J.D., MACASKILL, P., MOHAMED, A., SPRING, P., KHURANA, V. (1999). Prevalence of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in New South Wales, Australia. *Annals of Neurology* 46, 910-913.

MEHNDIRATTA, M.M., HUGHES, R.A., AGARWAL, P. (2004). Plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3, CD003906.

MEI, F.J., ISHIZU, T., MURAI, H., OSOEGAWA, M., MINOHARA, M., ZHANG, K.N., KIRA, J. (2005). Th1 shift in CIDP versus Th2 shift in vasculitic neuropathy in CSF. *Journal of the Neurological Sciences* 228, 75-85.

MELÉNDEZ-VÁSQUEZ, C., REDFORD, J., CHOUDHARY, P.P., GRAY, I.A., MAITLAND, P., GREGSON, N.A., SMITH, K.J., HUGHES, R.A. (1997). Immunological investigation of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 73, 124-134.

MENDELL, J.R., BAROHN, R.J., FREIMER, M.L., KISSEL, J.T., KING, W., NAGARAJA, H.N., RICE, R., CAMPBELL, W.W., DONOFRIO, P.D., JACKSON, C.E., LEWIS, R.A., SHY, M., SIMPSON, D.M., PARRY, G.J., RIVNER, M.H., THORNTON, C.A., BROMBERG, M.B., TANDAN, R., HARATI, Y., GIULIANI, M.J., WORKING GROUP ON PERIPHERAL NEUROPATHY (2001). Randomized controlled trial of IVIg in untreated chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology* 56, 445-449.

MILNER, P., LOVELIDGE, C.A., TAYLOR, W.A., HUGHES, R.A. (1987). P0 myelin protein produces experimental allergic neuritis in Lewis rats. *Journal of the Neurological Sciences* 79, 275-285.

MISAWA, S., KUWABARA, S., MORI, M., KAWAGUCHI, N., YOSHIYAMA, Y., HATTORI, T. (2001). Serum levels of tumor necrosis factor- α in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 56, 666-669.

MONACO, S., GEHRMANN, J., RAIVICH, G., KREUTZBERG, G.W. (1992). MHC-positive, ramified macrophages in the normal and injured rat peripheral nervous system. *Journal of Neurocytology* 21, 623-634.

MUSARELLA, M., ALCARAZ, G., CAILLOL, G., BOUDIER, J.L., COURAUD, F., AUTILLO-TOUATI, A. (2006). Expression of Nav1.6 sodium channels by Schwann cells at neuromuscular junctions: role in the motor endplate disease phenotype. *Glia* 53, 13-23.

NAGEL, A., ENGEL, A.G., LANG, B., NEWSOM-DAVIS, J., FUKUOKA, T. (1988). Lambert-Eaton myasthenic syndrome IgG depletes presynaptic membrane active zone particles by antigenic modulation. *Annals of Neurology* 24, 552-558.

NAKATANI, Y., HOTTA, S., UTSUNOMIYA, I., TANAKA, K., HOSHI, K., ARIGA, T., YU, R.K., MIYATAKE, T., TAGUCHI, K. (2009). Cav2.1 voltage-dependent Ca^{2+} channel current is inhibited by serum from select patients with Guillain-Barré syndrome. *Neurochemical Research* 34, 149-157.

NAKATANI, Y., KAWAKAMI, K., NAGAOKA, T., UTSUNOMIYA, I., TANAKA, K., YOSHINO, H., MIYATAKE, T., HOSHI, K., TAGUCHI, K. (2007). Ca channel currents inhibited by serum from select patients with Guillain-Barré syndrome. *European Neurology* 57, 11-18.

NOBILE-ORAZIO, E. (2001). Multifocal motor neuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 115, 4-18.

OGAWA-GOTO, K., ABE, T. (1998). Gangliosides and Glycosphingolipids of peripheral nervous system myelins-a minireview. *Neurochemical Research* 23, 305-310.

PESTRONK, A., LI, F., GRIFFIN, J., FELDMAN, E.L., CORNBLATH, D., TROTTER, J., ZHU, S., YEE, W.C., PHILLIPS, D., PEEPLES, D.M., et al. (1991). Polyneuropathy syndromes associated with serum antibodies to sulfatide and myelin-associated glycoprotein. *Neurology* 41, 357-362.

POLLARD, J.D., McCOMBE, P.A., BAVERSTOCK, J., GATENBY, P.A., McLEOD, J.G. (1986). Class II antigen expression and T lymphocyte subsets in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 13, 123-134.

POLLARD, J.D., BAVERSTOCK, J., McLEOD, J.D. (1987). Class II antigen expression and inflammatory cells in the Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology* 21, 337-341.

PREVITALI, S.C., ARCHELOS, J.J., HARTUNG, H.P. (1998). Expression of integrins in experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology* 44, 611-621.

PREVITALI, S.C., FELTRI, M.L., ARCHELOS, J.J., QUATTRINI, A., WRABETZ, L., HARTUNG, H.P. (2001). Role of integrins in the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology* 64, 35-49.

PRINEAS, J.W. (1981). Pathology of the Guillain-Barré syndrome. *Annals of Neurology* 9 Suppl, 6-19.

PRITCHARD J., MUKHERJEE R., HUGHES R.A. (2002). Risk of relapse of Guillain-Barré syndrome or chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy following immunisation. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 73, 348-349.

PROTTI, D.A., REISIN, R., MACKINLEY, T.A., UCHITEL, O.D. (1996). Cal-

cium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. *Neurology* 46, 1391-1396.

REDFORD, E.J., HALL, S.M., SMITH, K.J. (1995). Vascular changes and demyelination induced by the intraneural injection of tumour necrosis factor. *Brain* 118, 869-878.

RIZZUTO, N., MORBIN, M., CAVALLARO, T., FERRARI, S., FALLAHI, M., GALIAZZO-RIZZUTO, S. (1998). Focal lesions area feature of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Acta Neuropathologica* 96, 603-609.

ROBITAILLE, R., BOURQUE, M.J., VANDAELE, S. (1996). Localization of L-type Ca^{2+} channels at perisynaptic glial cells of the frog neuromuscular junction. *The Journal of Neuroscience* 16, 148-158.

SAID, G. (2006). Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neuromuscular Disorders* 16, 293-303.

SANVITO, L., MAKOWSKA, A., MAHDI-ROGERS M., HADDEN, R., PEAKMAN, M., GREGSON, N., NEMNI, R., HUGHES, R.A. (2009). Humoral and cellular immune responses to myelin protein peptides in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 80, 333-338.

SCARPINI, E., LISAK, R.P., BERETTA, S., VELICOGNA, M., DORONZO, R., MOGGIO, M., JANN, S., SCARLATO, G. (1990). Quantitative assessment of class II molecules in normal and pathological nerves. Immunocytochemical studies in vivo and in tissue culture. *Brain* 113, 659- 675.

SCHMIDT, B., TOYKA, K.V., KIEFER, R., FULL, J., HARTUNG, H.P., POLLARD, J. (1996). Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Muscle & Nerve* 19, 474-487.

SELMAJ, K., RAINE, C.S. (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin damage in organotypic cultures of nervous tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences* 540, 568-570.

SGHIRLANZONI, A., SOLARI, A., CIANO, C., MARIOTTI, C., FALLICA, E., PAREYSON, D. (2000). Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: long-term course and treatment of 60 patients. *Neurological Sciences* 21, 31-37.

SHILLITO, P., MOLENAAR, P.C., VINCENT, A., LEYS, K., ZHENG, W., VAN DEN BERG, R.J., PLOMP, J.J., VAN KEMPEN, G.T., CHAUPLANNAZ, G., WINTZEN, A.R. et al. (1995). Acquired neuromyotonia: evidence for autoantibodies directed against K⁺ channels of peripheral nerves. *Annals of Neurology* 38, 714-722.

SIMONE, I.L., ANNUNZIATA, P., MAIMONE, D., LIGUORI, M., LEANTE, R., LIVREA, P. (1993). Serum and CSF anti-GM1 antibodies in patients with Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of the Neurological Sciences* 114, 49-55.

SIVIERI, S., FERRARINI, A.M., LOLLI, F., MATÀ, S., PINTO, F., TAVOLATO, B., GALLO, P. (1997). Cytokine pattern in the cerebrospinal fluid from patients with GBS and CIDP. *Journal of the Neurological Sciences* 147, 93-95.

SOMMER, C., KOCH, S., LAMMENS, M., GABREELS-FESTEN, A., STOLL, G., TOYKA, K.V. (2005). Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP. *Neurology* 65, 1924-1929.

STANGEL, M., TOYKA, K.V., GOLD, R. (1999). Mechanisms of high-dose intravenous immunoglobulins in demyelinating diseases. *Archives of Neurology* 56, 661-663.

STOLL, G., JUNG, S., JANDER, S., VAN DER MEIDE, P., HARTUNG, H.P. (1993). Tumor necrosis factor-alpha in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *Journal of Neuroimmunology*

45, 175-182.

TAK, P.P., FIRESTEIN, G.S. (2001). NF-kappa B: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 107, 7-11.

TAKAMORI, M., TAKAHASHI, M., YASUKAWA, Y., IWASA, K., NEMOTO, Y., SUENAGA, A., NAGATAKI, S., NAKAMURA, T. (1995). Antibodies to recombinant synaptotagmin and calcium channel subtypes in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Journal of the Neurological Sciences* 133, 95-101.

TAKAMORI, M., MARUTA, T., KOMAI, K. (2000). Lambert-Eaton myasthenic syndrome as an autoimmune calcium-channelopathy. *Neuroscience Research* 36, 183-191.

TAKIGAWA, T., YASUDA, H., KIKKAWA, R., SHIGETA, Y., SAIDA, T., KITASATO, H. (1995). Antibodies against GM1 ganglioside affect K⁺ and Na⁺ currents in isolated rat myelinated nerve fibers. *Annals of Neurology* 37, 436-442.

TAKIGAWA, T., YASUDA, H., TERADA, M., HANEDA, M., KASHIWAGI, A., SAITO, T., SAIDA, T., KITASATO, H., KIKKAWA, R. (2000). The sera from GM1 ganglioside antibody positive patients with Guillain-Barré syndrome or chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy blocks Na⁺ currents in rat single myelinated nerve fibers. *Internal Medicine* 39, 123-127.

TANAKA, Y., WAKI, H., KON, K., ANDO, S. (1997). Gangliosides enhance KCl-induced Ca²⁺ influx and acetylcholine release in brain synaptosomes. *Neuroreport* 8, 2203-2207.

TAYLOR W.A., HUGHES, R.A. (1989). T lymphocyte activation antigens in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 24, 33-39.

TAYLOR, W.A., BROSTOFF, S.W., HUGHES, R.A. (1991). P2 specific lymphocyte transformation in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelina-

ting polyradiculoneuropathy. *Journal of Neurological Sciences* 104, 52-55.

TROJABORG, W. (1998). Acute and chronic neuropathies: new aspects of Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, an overview and an update. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 107, 303-316.

URBANO, F.J., PIEDRAS-RENTERÍA, E.S., JUN, K., SHIN, H.S., UCHITEL, O.D., TSIEN, R.W. (2003). Altered properties of quantal neurotransmitter release at endplates of mice lacking P/Q-type Ca^{2+} channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3491-3496.

URBANO, F.J., PAGANI, M.R., UCHITEL, O.D. (2008). Calcium channels, neuromuscular synaptic transmission and neurological diseases. *Journal of Neuroimmunology* 201-202, 136-144.

VAN DEN BERG, L.H., MOLLEE, I., WOKKE, J.H.J., LOGTENBERG, T. (1995). Increased frequencies of HPRT mutant T lymphocytes in patients with Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: further evidence for a role of T cells in the etiopathogenesis of peripheral demyelinating diseases. *Journal of Neuroimmunology* 58, 37-42.

VAN DOORN, P.A., ROSSI, F., BRAND, A., VAN LINT, M., VERMEULEN, M., KAZATCHKINE, M.D. (1990). On the mechanism of high-dose intravenous immunoglobulin treatment of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 29, 57-64.

VAN SCHAIK, I.N., VERMEULEN, M., VAN DOORN, P.A., BRAND, A. (1994). Anti-GM1 antibodies in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) treated with intravenous immunoglobulin (IVIg). *Journal of Neuroimmunology* 54, 109-115.

VEDELER, C.A., MATRE, R., NYLAND, H. (1988). Class and IgG subclass distribution of antibodies against peripheral nerve myelin in sera from patients with

inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Acta Neurologica Scandinavica* 78, 401-407.

VERSCHUUREN, J.J., DALMAU, J., TUNKEL, R., LANG, B., GRAUS, F., SCHRAMM, L., POSNER, J.B., NEWSOM-DAVIS, J., ROSENFELD, M.R. (1998). Antibodies against the calcium channel beta-subunit in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Neurology* 50, 475-479.

WEBER, F., RÜDEL, R., AULKEMEYER, P., BRINKMEIER, H. (2000). Anti-GM1 antibodies can block neuronal voltage-gated sodium channels. *Muscle & Nerve* 23, 1414-1420.

WÜRZ, A., BRINKMEIER, H., WOLLINSKY, K.H., MEHRKENS, H.H., KORNHUBER, H.H., RÜDEL, R. (1995). Cerebrospinal fluid and serum from patients with inflammatory polyradiculoneuropathy have opposite effects on sodium channels. *Muscle & Nerve* 18, 772-781.

YAN, W.X., TAYLOR, J., ANDRIAS-KAUBA, S., POLLARD, J.D. (2000). Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Annals of Neurology* 47, 765-775.

YAN, W.X., ARCHELOS, J.J., HARTUNG, H.P., POLLARD, J.D. (2001). P0 protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Annals of Neurology* 50, 286-292.

YOSHINO, H., MIYATANI, N., SAITO, M., ARIGA, T., LUGARESI, A., LATOV, N., KUSHI, Y., KASAMA, T., YU, R.K. (1992). Isolated bovine spinal motoneurons have specific ganglioside antigens recognized by sera from patients with motor neuron disease and motor neuropathy. *Journal of Neurochemistry* 59, 1684-1691.

YU, Z., LENNON, V.A. (1999). Mechanisms of intravenous immune globulin therapy in antibody-mediated autoimmune diseases. *The New England Journal of Medicine* 21, 227-228.

YUKI, N., SATO, S., TSUJI, S., OHSAWA, T., MIYATAKE, T. (1993). Frequent presence of anti-GQ1b antibody in Fisher's syndrome. *Neurology* 43, 414-417.

YUKI, N., TAGAWA, Y., HANDA, S. (1996). Autoantibodies to peripheral nerve glycosphingolipids SPG, SLPG, and SGPG in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of Neuroimmunology* 70, 1-6.

ZETTL, U.K., GOLD, R., TOYKA, K.V., HARTUNG, H.P. (1995). Intravenous glucocorticosteroid treatment augments apoptosis of inflammatory T cells in experimental autoimmune neuritis (EAN) of the Lewis rat. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 54, 540-547.

ZHU, J., PELIDOU, S.H., DERETZI, G., LEVI, M., MIX, E., VAN DER MEIDE, P., WINBLAD, B., ZOU, L.P. (2001). P0 glycoprotein peptides 56-71 and 180-199 dose-dependently induce acute and chronic experimental autoimmune neuritis in Lewis rats associated with epitope spreading. *Journal of Neuroimmunology* 114, 99-106.

ZWEIMAN, B., ROSTAMI, A., LISAK, R.P., MOSKOVITZ, A.R., PLEASURE, D.E. (1983). Immune reactions to P2 protein in human inflammatory demyelinating neuropathies. *Neurology* 33, 234-237.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Brigitte Buchwald, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich durch fachliche Anregungen und Diskussionen unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Holsboer danke ich für die Möglichkeit, sämtliche Einrichtungen des Hauses zu nutzen und meine Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rainer Landgraf für die Betreuung meiner Arbeit und seine fachliche Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Matthias Eder möchte ich mich dafür bedanken, dass er mich herzlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und mir somit ermöglicht hat, meine Arbeit zu beenden. Des Weiteren stand er mir stets unterstützend und diskussionsbereit zur Seite.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Toyka bedanke ich mich für die Bereitstellung der Patientenproben und des *Macro-Patch-Clamp*-Messstandes. Herrn PD Dr. Andreas Weishaupt und Frau Susanne Helmig danke ich für die Hilfestellung bei der Anfertigung der *Westernblots*.

Herrn Prof. Dr. Christoph Turck danke ich für die fachlichen Hilfestellungen und Diskussionen. Mein Dank gilt außerdem Frau Maria Lebar und Frau Dr. Giuseppina Maccarrone.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. Hanns Hatt und Frau Weiyi Zhang für die Durchführung der *Calcium-Imaging*-Experimente und die gute Zusammen-

arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Frau Barbara Hauger, Christine Hilf und Eva-Maria Wagner für sämtliche Unterstützung während meiner Arbeit.

Der gesamten Abteilung „Dynamik neuronaler Netzwerke“ danke ich für die gute Zusammenarbeit und das hervorragende Arbeitsklima. Vielen Dank an Christina, Charis, Coco, Sascha, Rainer, Caro, Stephan, Dani, Miriam und Gerhard. Ohne euch wäre meine Zeit am Institut und in München nur halb so schön gewesen.

Und natürlich bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Danke, dass es euch gibt!

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Simone Bertram
Adresse: Brudermühlstr. 48
81371 München
E-mail: simonebertram@hotmail.com
Geburtstag: 21. März 1980
Geburtsort: Frankfurt a.M.
Staatsangehörigkeit: Deutsch

AUSBILDUNG

seit 2006 Promotionsstudium der Biologie
Ludwig-Maximilians-Universität München

2000-2006 Studium der Biologie
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M.
Abschluß: Diplom
Diplomarbeit: Bestimmung von Hörverlusten an der
Vitamin B1-Transporter *knock out*-Maus bei
Vitamin B1-armer Diät

1997-2000 Feldbergschule Oberursel
Abschluß: Abitur

BERUFSERFAHRUNGEN

seit 2006 Promotionsstudent am Max-Planck-Institut für Psychiatrie,
München
AG Neurophysiologie und Dynamik neuronaler Netzwerke

München, den 28. Januar 2010

9 Veröffentlichungen

Veröffentlichte *Abstracts*:

Bertram, S., Zhang, W., Toyka, K.V., Hatt, H., Eder, M., Buchwald, B. (2009). Immunoglobulin G from patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) affects presynaptic transmitter release and calcium influx. *Pharmacopsychiatry* 42, 212.

Bertram, S., Zhang, W., Toyka, K.V., Hatt, H., Buchwald, B. (2009). Immunoglobulin G from patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) affects presynaptic transmitter release and calcium influx. *Journal of the Peripheral Nervous System Suppl.* 14, 17.

10 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Auch habe ich noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

München, den 28. Januar 2010

Simone Bertram

