Akute Effekte humaner Autoantikörper auf Ionenkanäle an Spinalganglienzellen von Ratten

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Svenja Aglaia Fabian aus Vechta

> > Mannheim 2011

Aus dem Institut für Physiologie, Abteilung Neurophysiologie Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

> 1. Gutachter: PD Dr. Andreas Scholz

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun

Tag der Disputation: 22.04.2013

Meinen Eltern

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Ionenkanäle als Grundlage erregbarer Strukturen	1
1.2 Das Ruhemembranpotenzial neuronaler Zellen	1
1.3 Das Aktionspotenzial neuronaler Zellen	2
1.4 Pathophysiologie des Schmerzes	3
1.5 Mit peripheren Neuropathien assoziierte Autoantikörper	4
1.6 Entzündliche und paraneoplastische Polyneuropathien	5
1.6.1 Guillain-Barré Syndrom (GBS).	5
1.6.1.1 Epidemiologie	5
1.6.1.2 Pathogenese und Subtypen.	6
1.6.1.3 Klinik	8
1.6.1.4 Therapie	8
1.6.2 Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)	9
1.6.2.1 Epidemiologie	9
1.6.2.2 Pathogenese	9
1.6.2.3 Klinik	10
1.6.2.4 Therapie	10
1.6.3 Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS)	10
1.6.3.1 Übersicht	10
1.6.3.2 Pathogenese und Subtypen.	11
1.6.3.3 Klinik	14
1.6.3.4 Therapie	14
1.6.4 Lambert-Eaton-Syndrom (LEMS).	15
1.6.4.1 Epidemiologie	15
1.6.4.2 Pathogenese	15
1.6.4.3 Klinik	16
1.6.4.4 Therapie	17
1.6.5 Paraneoplastische limbische Enzephalitis	17
1.6.5.1 Pathogenese	17
1.6.5.2 Klinik	18
1.6.5.3 Therapie	18
1.6.6 Neuropathien assoziiert mit monoklonalen Gammopathien	18
1.6.6.1 Pathogenese	18
1.6.6.2 Klinik und Diagnostik	20
1.6.6.3 Therapie	20
1.7 Anatomie der Spinalganglien	20
1.8 Fragestellung.	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Patientengruppen und Probenzusammenstellung.	23
2.2 IgG Aufreinigung.	24
2.3 Lösungen	24
2.3.1 Die Innenlösung	24
2.3.2 Übersicht der Außenlösungen	25
2.3.3 Präparation der Ganglienzellen.	25
2.4 Die patch-clamp Technik	27
2.5 Versuchsstand	29
2.5.1 Experimentierkammer.	29
•	

2.5.2 Pipetten	
2.5.3 Manipulator, Pipettenhalter und Mikroskop	
2.5.4 Verstärker	
2.5.5 Aufzeichnungs-, Auswertungs- und Darstellungsverfahren	
3 Ergebnisse	
3.1 Untersuchung von Neuronen mit Hilfe der patch-clamp Technik	33
3.2 Ergebnisse der gesunden Probanden	33
3.3 Positive Kontrollgruppen	
3.3.1 Lambert-Eaton Syndrom (LEMS)	
3.3.2 Anti-Kaliumkanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis	47
3.4 Guillain-Barré-Syndrom	52
3.4.1 Guillain-Barré-Syndrom mit rein motorischer Komponente	52
3.4.2 Guillain-Barré-Syndrom mit sensomotorischer Komponente	55
3.5 Chronische inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie	60
3.5.1 CIDP mit rein motorischer Komponente	60
3.5.2 CIDP mit sensomotorischer Komponente	65
3.6 Paraneoplastische Polyneuropathie	68
3.6.1 Paraneoplastische Polyneuropathie mit rein motorischer Komponente	68
3.6.2 Paraneoplastische Polyneuropathie mit sensomotorischer Beteiligung	72
3.7 Sensible Polyneuropathie mit IgG und IgM Antikörpern	77
4 Diskussion	81
4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode.	81
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode. 4.2 Diskussion der Ergebnisse. 	81 81
 4 Diskussion	81 81 82 82
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode	81 82828283
 4 Diskussion	81 8282828383
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode. 4.2 Diskussion der Ergebnisse. 4.2.1 Negativkontrollen. 4.2.2 Positivkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle. 4.2.3 Anti-Kalium-Kanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis. 4.2.4 Guillain-Barré-Syndrom. 	81 828282838587
 4 Diskussion 4.1 Diskussion der Methode 4.2 Diskussion der Ergebnisse 4.2.1 Negativkontrollen 4.2.2 Positivkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle 4.2.3 Anti-Kalium-Kanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis 4.2.4 Guillain-Barré-Syndrom 4.2.4.1 Motorische Beteiligung bei GBS 	81 82 82 82 83 85 87 87
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode. 4.2 Diskussion der Ergebnisse. 4.2.1 Negativkontrollen. 4.2.2 Positivkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle. 4.2.3 Anti-Kalium-Kanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis. 4.2.4 Guillain-Barré-Syndrom. 4.2.4.1 Motorische Beteiligung bei GBS. 4.2.4.2 Sensible Beteiligung bei GBS. 	81 82 82 83 85 85 87 87 87
 4 Diskussion	81 82 82 82 83 83 85 87 87 87 87
 4 Diskussion 4.1 Diskussion der Methode 4.2 Diskussion der Ergebnisse 4.2.1 Negativkontrollen 4.2.2 Positivkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle 4.2.3 Anti-Kalium-Kanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis 4.2.4 Guillain-Barré-Syndrom 4.2.4.1 Motorische Beteiligung bei GBS 4.2.5 Chronische demyelinisierende Polyneuropathie 4.2.5.1 Motorische Beteiligung bei CIDP 	81 82 82 82 83 83 87 87 87 87 90 90
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode. 4.2 Diskussion der Ergebnisse. 4.2.1 Negativkontrollen. 4.2.2 Positivkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle. 4.2.3 Anti-Kalium-Kanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis. 4.2.4 Guillain-Barré-Syndrom. 4.2.4.1 Motorische Beteiligung bei GBS. 4.2.5 Chronische demyelinisierende Polyneuropathie. 4.2.5.1 Motorische Beteiligung bei CIDP. 4.2.5.2 Sensible Beteiligung bei CIDP. 	81 82 82 83 83 85 87 87
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode. 4.2 Diskussion der Ergebnisse. 4.2.1 Negativkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle. 4.2.2 Positivkontrollen mit Antikörper bei limbischer Enzephalitis. 4.2.3 Anti-Kalium-Kanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis. 4.2.4 Guillain-Barré-Syndrom. 4.2.4.1 Motorische Beteiligung bei GBS. 4.2.5 Chronische demyelinisierende Polyneuropathie. 4.2.5.2 Sensible Beteiligung bei CIDP. 4.2.6 Paraneoplastische Polyneuropathie. 	81 82 82 82 83 83 87 87
 4 Diskussion	81 82 82 82 83 83 87 87
 4 Diskussion	81 82 82 82 83 85 87 87
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode	81 82 82 82 83 83 87 87 90 90 90 90 91 93 93 93 93 93
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode. 4.2 Diskussion der Ergebnisse. 4.2.1 Negativkontrollen. 4.2.2 Positivkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle 4.2.3 Anti-Kalium-Kanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis. 4.2.4 Guillain-Barré-Syndrom. 4.2.4.1 Motorische Beteiligung bei GBS. 4.2.5 Chronische demyelinisierende Polyneuropathie. 4.2.5.2 Sensible Beteiligung bei CIDP. 4.2.6 Paraneoplastische Polyneuropathie. 4.2.6.1 Motorische Beteiligung bei PNP. 4.2.6.2 Sensible Beteiligung der PNP. 4.2.7 Sensible Polyneuropathie mit IgG und IgM Antikörpern bei IgG-MGUS. 4.3 Klinischer Ausblick. 	81 81 82 82 83 85 87 87 90 90 90 90 91 93 93 93 93
 4 Diskussion	81
 4 Diskussion. 4.1 Diskussion der Methode	8181828282838587909090919393969798100

1 Einleitung

1.1 Ionenkanäle als Grundlage erregbarer Strukturen

Eine wesentliche Aufgabe der Neurone des menschlichen Körpers ist die Informationsweitergabe. Informationen werden durch Polaritätsänderungen des Zellinneren gegenüber dem -äußeren weitergegeben. Dies geschieht unter anderem über Ionenkanäle. Das Innere einer Zelle (IZR) wird vom Extrazellularraum (EZR) durch die Zellmembran getrennt, die unpolar ist. Sie ist aufgebaut aus Lipiden, die sich in wässriger Lösung spontan zu einer Doppellipidschicht zusammenlagern. Aus diesem Grund ist die Membran für Ionen, die Ladungsträger und somit polar sind, undurchlässig. Damit die Ionen zur Informationsweitergabe die Zellmembran passieren können, sind als regulierende Durchtrittsstellen Ionenkanäle vorhanden, die weitgehend selektiv für eine bestimmte Ionenart durchlässig sind. Schon 1902 beschrieb J. Bernstein die gerichtete Weiterleitung von Informationen mittels einer Ladungsverschiebung über eine Membran. Diese Hypothese wurde von Cole und Curtis (1939) sowie von Hodgkin, Huxley und Katz (1949, 1952 a-d) weiterentwickelt und vertieft. Neher und Sakmann (1976) sowie Hamill et al. (1981) wiesen mit der patch-clamp Methode als erste Ionenströme über eine Zellmembran an einem einzigen Kanal nach und konnten somit eine vorangegangene Hypothese verifizieren. Im weiteren Verlauf wurden viele verschiedene, meist selektive Ionenkanäle nachgewiesen, über die ein kontrollierter Austausch von Ionen möglich ist (Hille, 2001).

1.2 Das Ruhemembranpotenzial neuronaler Zellen

Über die unpolare Doppellipidschicht einer Zellmembran herrscht zwischen Intra- und Extrazellularraum eine Potenzialdifferenz von -55 mV bis -100 mV, die vom jeweiligen Zelltyp abhängig ist und bei Neuronen etwa -70 mV bis -100 mV beträgt (Schmidt, Thews, 1997). Das Zellinnere ist dem Zelläußeren gegenüber negativ geladen. Das Ruhemembranpotenzial wird durch eine unterschiedliche Verteilung von Ionen im intra- und extrazellulären Raum (IZR bzw. EZR) hervorgerufen, welche aktiv durch Pumpen aufrechterhalten wird. Natrium-Kalium-Pumpen transportieren unter Energieverbrauch Natrium aus und Kalium in die Zelle. Dadurch kommen die unterschiedlichen Konzentrationen von Natrium und Kalium im IZR bzw. EZR zu Stande. Im IZR beträgt die Konzentration von Natrium nur etwa ein Zwölftel der des EZR, dafür ist die Kaliumkonzentration im IZR etwa 38 Mal höher als im EZR. Stoffaustausche der Zellen finden durch Diffusion, über Transportproteine und Kanäle für Ionen statt. Bei der Permeation von Ionen durch Kanäle fließen messbare Ströme. Einige Kanäle können spontan und hochfrequent zwischen offenen und geschlossenen Zuständen hinund herschalten, sich in einer was Konformationsänderung zeigt. Bei Kaliumkanälen kommt es beispielsweise zu einem Twist, bei anderen Kanälen verschließt eine Aminosäure die Zellpore. Aufgrund reiner Diffusion könnten sich die Konzentrationen der Ionen ausgleichen, da aber mit jedem Ion eine elektrische Ladung verschoben wird, entsteht ein dem elektrochemischen Gradienten entgegengesetztes elektrisches Potenzial. Im Inneren der Zelle gibt es negativ geladene Proteine, die zu groß sind, um die Zellmembran zu passieren. Um einen Ladungsausgleich herbeizuführen, kommt es dadurch im Prinzip zu einem Kaliumionenstrom, der netto jedoch null beträgt, da die gleiche Anzahl von Ionen in die Zelle und aus der Zelle diffundiert. Dieser Zustand beschreibt das Gleichgewichtspotenzial, das sich nach Nernst (Kostyuk et al., 1981c) berechnen lässt. Bei großen Nervenzellen liegt der Wert um -70 mV, da im Ruhezustand eines Neurons überwiegend Kaliumkanäle, jedoch zu einem kleinen Anteil auch Chlorid, Natrium- und unspezifische Kationenkanäle offen sind, und es sich bei dem Ruhemembranpotenzial vorwiegend um ein Kaliumgleichgewichtspotenzial handelt.

1.3 Das Aktionspotenzial neuronaler Zellen



Abbildung 1:Aktionspotenzial eines kleinen Spinalganglienneurons mit einem Durchmesser von etwa 20 µm in einer Dünnschichtpräparation bei Zimmertemperatur in einer HEPES Lösung. Ruhemembranpotenzial -47,3 mV Aufgrund der Dauer des APs am ehesten einem C-Typ Neuron entsprechend. Eigenes Beispiel.

Damit Nervenzellen Informationen weiterleiten, mit anderen Zellen Informationen vergleichen, und die Funktionen anderer Zellen steuern können, bilden sie Aktionspotenziale (siehe Abbildung 1). Zu Beginn eines solchen Aktionspotenzials öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle, um die Membran bis an ein Schwellenpotenzial zu depolarisieren. Durch das Einströmen von Natriumionen in die Zelle wird das Zellinnere positiv, wodurch weitere Natriumkanäle bis zum Natriumumkehrpotenzial aktiviert werden. Vor der Spitze des Aktionspotenzials beginnt die Inaktivierung der Natriumkanäle, spannungsabhängige Kaliumkanäle öffnen sich und die Leitfähigkeit für Kaliumionen steigt an. Es kommt zu einem Overshoot von +30 bis +40 mV und anschließend zur Repolarisation. Bleiben Kaliumkanäle länger geöffnet, kann es zu einer Nachhyperpolarisation kommen, das heißt, dass die Potenziale stärker negativ werden als das ursprüngliche Ruhemembranpotenzial.

1.4 Pathophysiologie des Schmerzes

In dieser Arbeit sollen exemplarisch Neurone, die an der Schmerzverarbeitung beteiligt sind, untersucht werden. Das Schmerzsystem, oder auch das nozizeptive System, leitet im Körper Schmerzreize weiter und verarbeitet sie. Gemessen werden kann die Weiterleitung solcher Reize mit elektrophysiologischen Methoden. Freie Nervenendigungen in der Peripherie des Körpers nehmen Schmerzreize auf und leiten sie, falls sie groß genug sind, mit Hilfe von Aktionspotenzialen über Aδ- und C-Fasern in das Hinterhorn, wo sie umgeschaltet und über den Thalamus in den sensorischen Kortex weitergegeben werden. Es gibt einen physiologischen nozizeptiven Schmerz, der entsteht, wenn das Gewebe verletzt oder entzündet ist. Bei diesem werden Nervenenden im Gewebe gereizt werden. Unterschieden davon wird der neuropathische Schmerz, der bei einer Verletzung oder Erkrankung des Nervs auftritt. Bespiele hierfür sind ein Plexusschaden, eine Axondurchtrennung oder ein Diabetes mellitus. Dieser Schmerz hat häufig einen elektrisierenden oder brennenden Charakter. Zusätzlich können bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen Missempfindungen im Sinne von Allodynien auftreten, die anders als bei Gesunden dermatomüberschreitend sind. Sogenannte ektope Entladungen entstehen im Axon oder im Zellkörper geschädigter Spinalganglienneurone. Sie können intermittierend oder rhythmisch auftreten (Han et al., 2000; Liu et al., 2000). Als Erklärung für ektope Entladungen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Durch eine erhöhte Expression TTX-sensitiver Natriumkanäle, die das Neuron schnell inaktivieren, und eine verminderte Ausbildung TTX-resistenter Natriumkanäle, die zu einer langsameren Inaktivierung führen, werden die Membranpotenziale zu einer erhöhten Erregbarkeit hin verändert (Cummins et al., 2000). Zusätzlich zeigen sich Veränderungen an den Kaliumkanälen (Everill et Kocsis, 1999). Eine andere Erklärung ist die vermehrte Erregung der freien Nervenendigungen durch Entzündungsmediatoren, z.B. Bradykinin, NO und Zytokine.

Bei einem inflammatorischen Schmerz können Natriumkanäle von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandin und Serotonin verändert werden. Dabei kommt es vermutlich über eine AMP-Proteinkinase A-Kaskade (England et al., 1996) zu einer Modulation der TTX-resistenten Natriumströme in Spinalganglienneuronen (Gold et al., 1996). Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der Reaktion wird angenommen, dass vorbestehende Kanäle zum Beispiel durch Phosphorylierung verändert werden. Zusätzlich konnte eine veränderte Genexpression der Natriumkanäle nachgewiesen werden. So untersuchten Tanaka et al. (1998) die Natriumkanalexpression in Spinalganglienneuronen von Ratten, in deren Hinterpfoten vier Tage zuvor Carrageen gespritzt wurde. In den entsprechenden Spinalganglienneuronen konnte eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression für Natriumkanäle und der TTX-resistenten Natriumstromamplitude gegenüber unbehandelten Individuen oder den Neuronen der Gegenseite gefunden werden. Dies könnte ebenfalls für eine erhöhte Anzahl von Natriumkanälen sprechen (Tanaka et al., 1998).

Es gibt mehrere Studien, die zeigen konnten, dass nach der Injektion von Freunds Adjuvant die Expression von Natriumkanälen in den entsprechenden Spinalganglienneuronen anstieg und mindestens zwei Monate anhielt (Gould et al., 1998). Der genaue Mechanismus ist noch unklar, es wird jedoch diskutiert, ob durch veränderte Neurotrophinspiegel vermehrt Natriumkanäle exprimiert werden (Waxman et al., 1999).

1.5 Mit peripheren Neuropathien assoziierte Autoantikörper

Polyneuropathien (PNP) sind Erkrankungen des peripheren Nervensystems aus nicht traumatischer Ursache. Die Ursachen sind sehr mannigfaltig und reichen von hereditär über diabetisch, malnutritiv, infektiös, endokrinologisch, toxisch, immunologisch bis entzündlich. Die häufigste Ursache der axonalen PNP ist der Alkoholmissbrauch, die häufigsten Formen der demyelinisierenden Polyneuropathie sind die diabetische, entzündliche oder genetisch bedingte PNP.

Die hier durchgeführten Experimente befasst sich mit den seltener auftretenden autoimmunen Polyneuropathien. In klinischen und serologischen sowie in wenigen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass bei diesen Erkrankungen Antikörper in der Pathogenese eine maßgebliche Rolle spielen, von denen einige bereits identifiziert wurden (siehe nachfolgende Abschnitte). Nach ihrem Wirkungsort unterscheidet man

- Autoimmune Neuropathien wie das Guillain-Barré Syndrom (GBS), die chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) und ihre Varianten, die multifokale motorische Neuropathie und die paraproteinämische demyelinisierende Neuropathie.
- Autoimmune Erkrankungen der neuromuskulären Synapse wie die Myasthenia gravis (MG) mit Autoantikörpern gegen Acetylcholinrezeptoren (Newsom-Davis, 1988; Wang et al., 2007) und das Lambert-Eaton-Syndrom (LEMS), bei dem Antikörper gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle gebildet werden (Vernino, 2007, Wirtz et al., 2005, Newsom-Davis, 2004; Lang et al., 2003a, b).

Diese Erkrankungen werden in den folgenden Kapiteln bezüglich der Fragestellung noch ausführlich besprochen.

1.6 Entzündliche und paraneoplastische Polyneuropathien

1.6.1 Guillain-Barré Syndrom (GBS)

Epidemiologie

Die jährliche Inzidenzrate des Guillain-Barré Syndroms (GBS) liegt verschiedenen Studien nach zwischen 0,4 bis 4,0 (Median 1,3) pro 100000 Einwohner (Hahn, 1998; Hughes & Rees, 1997), wobei Männer leicht häufiger betroffen sind als Frauen (5:4) (Hughes & Rees, 1997). Es gibt keine regionalen Häufungen, und GBS kann in jedem Alter auftreten. Häufigkeitsgipfel finden sich jedoch besonders oft bei jungen Erwachsenen, da in dieser Altersgruppe die Inzidenz von Zytomegalievirus- und Campylobacter-jejuni- Infektionen hoch ist, sowie bei älteren Menschen mit geschwächter Immunabwehr (Alter 1990; Hughes & Rees, 1997).

Eine Enteritis mit Campylobacter jejuni oder eine Erkrankung der oberen Atemwege gehen dem GBS sehr häufig (14%, Kuwabara et al. 2004; 45%, Hao et al., 1998; 66% GBS-Study-Group, 2000) voran, führen aber nicht zwangsläufig zu einem GBS. Bei Patienten, die an einem GBS erkrankten, nachdem diese eine C. jejuni-Enteritis hatten, konnte auf Gangliosiden von Neuronen eine Struktur nachgewiesen werden, die den Lipopolysacchariden der Oberflächenmembran der C. jejuni ähnlich ist (Sheikh et al., 1998). Die C. jejuni, die diese Struktur nicht besaßen, konnten bei ihren Wirten kein GBS auslösen. Das Serum der Patienten, die an GBS erkrankten, ergab erhöhte

Anti-Gangliosid-Antikörper-Titer. Dies zeigt, dass Patienten, die GBS entwickeln, bestimmte Vorraussetzungen in ihrer Immunantwort besitzen (Feasby & Hughes, 1998). Weitere Ursachen für das Auftreten eines GBS können Impfungen sein, z.B. gegen H1N1-Grippe (Kuwabara, 2004), Influenza, Hepatitis, Meningokokken (Schonberger et al.; 1979, Langmuir et al.; 1984, Breman et al.; 1984, Marks et al.; 1980, Lasky et al. 1998; Souayah et al., 2007); hierbei betrug das Risiko bei der Schweinegrippewelle 1976-77 etwa 7,6 Prozent (Safranek et al., 1991).

Pathogenese und Subtypen

GBS ist eine klinische Diagnose, die in mehrere pathomorphologisch und elektrophysiologisch charakterisierbare Subtypen unterteilt werden kann (Feasby et al.; 1986; Griffin et al., 1995, 1996b). Die Immunpathogenese ist jeweils unterschiedlich. Die Hauptformen sind die akute inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (AIDP), die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN) sowie die seltene akute motorische und sensorische axonale Neuropathie (AMSAN).

Bei Patienten mit GBS tritt in der akuten Krankheitsphase eine Erhöhung der Antikörperkonzentration im Serum (Ilyas et al., 1988; Hartung et al., 1995) sowie im Liquor auf (Mata et al., 2006), die für die Symptome verantwortlich gemacht wird (Yuki et al., 1990; Chiba et al., 1993; Kornberg et al., 1994). Seit Kusunoki et al. 1994 anti-Gangliosid Antikörper (anti-GalNAc-GD1a Antikörper) in den Seren von GBS Patienten gefunden hatte, schlossen sich zahlreiche Studien an, in denen diese Antikörper weiter untersucht wurden (Kusunoki et al., 1994; Hao et al., 1999; Ang et al., 1999; Kaida et al., 2000). Im Serum von Patienten mit rein motorischen und axonal bedingten Ausfällen wurden IgG anti-GalNAc-GD1a-Ak (Yuki et al., 1996) gefunden; bei Patienten, die außerdem Hirnnerven- und sensible Beteiligungen aufwiesen, wurden Antikörper vom IgM Typ gefunden (Kaida et al., 2000, 2001). Außerdem wurden folgenden Subtypen der Erkrankung bestimmte Antikörper zugeordnet. GD1a-, GalNAc GD1a- und GM1-Ak treten bevorzugt bei der AMAN auf (Ilyas et al., 1988; Yuki et al., 1990, 1996; Ho et al., 1995; Lugaresi et al., 1997; Buchwald et al., 2007; Kaida et al., 2003; Kuwabara et al., 1998). Bei einer Unterform, dem Miller-Fisher Syndrom, sind am häufigsten GQ1b vorzufinden (Chiba et al., 1992, 1993; Yuki et al., 1993; Halstead et al., 2004). Bei der akuten und chronischen sensiblen ataktischen Neuropathie finden sich GD1b Antikörper (Willison et al., 1994; O'Leary and Willison, 1997; Eurelings et al., 2001; Pan et al., 2001; Susuki et al., 2001), die auch an verschiedene Neurone in DRGs binden. Das Verteilungsmuster bestimmter Ganglioside im Nervensystem bestimmt auch die klinischen Symptome bei Patienten, die bestimmte Antikörpertypen in ihrem Serum aufweisen. Da die äußeren

Augenmuskeln zum Beispiel eine besonders hohe Dichte des Gangliosids GQ1b aufweisen, ist es verständlich, dass beim Miller-Fisher-Syndrom eine Ophthalmoplegie auftritt (Chiba et al., 1993). Das Gangliosid GM1 ist unter anderen an Hinterwurzelganglien-Neuronen lokalisiert (Gong et al., 2002).

In der folgenden Tabelle sind jeweils die von bestimmten Antikörpern bevorzugten Bindungsstellen an Hinterwurzelganglienneurone bestimmter Größen aufgeführt.

Ganglioside	GD1a-1	GD1a-2b	GD1a/GT1b -2b	GM1-2b	GD1b-1	GT1b-2b
Größe der Neurone	132/17,3%	124/16,2%	109/14,3%	134/17,5%	137/17,9%	128/16,8%
15-30µm	8/70 (11)	54/59 (91)	47/50 (94)	65/76 (85)	12/69 (17)	57/67 (85)
31-42µm	7/31 (22)	7/38 (18)	25/27 (92)	15/33 (45)	37/39 (95)	31/33 (94)
43-60µm	7/31 (22)	3/27 (11)	32/32 (100)	15/25 (60)	29/29 (100)	28/28 (100)

Tabelle 1: Hinterwurzelganglienneuronen: Färbung mit sechs verschiedenen Antikörpern (Gong et al. 2002)

Dies ist insoweit interessant, als in unserer Studie kleine Hinterwurzelganglien-Neurone mit einem Durchmesser von 20 μ m (siehe Zeile 3 in der Tabelle) nach Antikörperapplikation untersucht werden. Aus der Tabelle wird ersichtlich, dass die kleinen Neuronen die Ganglioside GD1a-2b, GD1a/GT1b-2b, GM1-2b und GT 1b-2b aufweisen.

Die AIDP ist in der westlichen Welt die häufigste Form mit anteilsmäßig 85-90% der Patienten (Hadden et al., 1998). Elektrophysiologische und pathomorphologische Studien ergaben, dass die Myelinscheiden das typische Ziel der Immunreaktion sind. Es erfolgt eine ausgeprägte Lymphozyteninfiltration des peripheren Nervs und eine Makrophageninvasion der Myelinscheide (Prineas, 1972, 1981). Zwei komplementäre Mechanismen hierzu werden aktuell diskutiert. Die erste Hypothese besagt, dass aktivierte Helferzellen mit speziellen Antigenen an die Schwannzelloberfläche bzw. Oberfläche der Myelinscheiden binden und aktivierte Makrophagen anlocken. Diese setzen Entzündungsmediatoren wie Metalloproteinasen und andere toxische Mediatoren, verletzten so die Schwannzelle und infiltrieren den peripheren Nerv (Pritchard et al., 2007). Die Alternativhypothese besagt, dass Antikörper an Epitope der Schwannzelloberfläche

binden, Komplement aktivieren und anschließend Makrophagen anlocken (Hughes et al., 2005; Hafer-Macko, 1996).

Die Diagnose einer AIDP wird klinisch sowie durch den gleichzeitigen elektrophysiologischen Nachweis einer Demyelinisierung gestellt (Hadden et al., 1998; Ho et al., 1995).

AMAN ist in China (Ho et al., 1995; McKhann et al., 1991, 1993) und Japan (Kuwabara et al., 1998; Ogawara et al., 2000) die vorherrschende Form des GBS. Elektrophysiologische und pathomorphologische Studien zeigten, dass es sich bei dieser Form um eine rein axonale Neuropathie handelt. Daraus schließt man, dass der Wirkort die Membran des peripheren Nervs ist (Griffin et al., 1996a,b) und die axonale Dysfunktion durch einen reversiblen Leitungsblock an den Ranvier'schen Schnürringen (Kuwabara et al., 1998) hervorgerufen wird. Einer AMAN geht häufig eine Enteritis mit C. jejuni voraus, und im Serum treten Antigangliosid-Antikörper (GM1, GM1b, GD1a, GalNAc-GD1a) auf (Ogawara et al., 2000). Die Diagnose wird elektrophysiologisch gestellt und zeichnet sich durch ein reduziertes Muskelaktionspotenzial ohne signifikanten Leitungsblock aus (Hadden et al., 1998; Ho et al., 1995). AMSAN ist eine Variante des AMAN, bei der sowohl motorische als auch sensible Nerven betroffen sind, was sich elektrophysiologisch als axonale Degeneration zeigt (Griffin et al., 1996a,b).

Klinik

Parästhesien und Hypästhesien treten häufig und früh im Krankheitsverlauf auf, sind jedoch nicht obligat. Die klinische Hauptmanifestation ist Muskelschwäche, die sich mehr oder weniger symmetrisch über eine Periode von einer oder zwei Wochen, selten auch länger, entwickelt. Obwohl einige Patienten sich vollständig erholen, kann die Krankheit bis zur Tetraplegie und im Rahmen einer Parese der Atemmuskulatur zum peripheren Atemversagen führen. Auch autonome Störungen im Rahmen einer Beteiligung der N. vagus sind nicht selten. Die klinischen Ausprägungen können zwischen den einzelnen Typen variieren (Van Doorn et al., 2008).

Therapie

Die Behandlung wird eingeteilt in eine symptomatische und eine spezifische Therapie. Zur spezifischen Therapie gehört die immunmodulatorische Therapie mit Hilfe von intravenösen Immunglobulinen und Plasmapherese.

1.6.2 Chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)

Epidemiologie

Die CIDP ist eine eigenständige Erkrankung, besitzt aber klinische und pathogenetische Gemeinsamkeiten mit dem GBS. Die Unterschiede bestehen in dem meist schleichenden Beginn und dem Ansprechen auf immunsuppressive Medikamente. Schätzungen zufolge liegt die jährliche Inzidenzrate der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie bei 0,25-0,5 pro 100 000 und die Prävalenz bei 1-2 pro 100 000 Einwohnern in der westlichen Welt. Die Erkrankung kann in jedem Lebensalter auftreten und betrifft, wie das GBS, Männer geringfügig häufiger als Frauen. Infektionen gehen auch bei der CIDP in einem Drittel der Fälle voraus (McCombe et al., 1987).

Pathogenese

Die CIDP ist eine erworbene, multifokale, proximal betonte, entzündliche und demyelinisierende Erkrankung, die die Spinalnervenwurzeln, die Spinalnerven, größere Plexus und proximale Nervenbündel befällt. Sie kann auch intramuskuläre Nervenanteile, den Truncus sympathicus sowie autonome Nervenendigungen betreffen (Dyck et al., 1993). Wie beim GBS findet sich eine durch Antikörper hervorgerufene segmentale Demyelinisierung mit mononukleären Zellinfiltrationen der Nervenwurzel und des peripheren Nervs. Bei 32% der Erkrankten liegt eine vorangegangene Erkrankung der oberen Luftwege oder eine maximal 6 Monate zuvor durchgeführte, nicht näher bezeichnete Impfung zu Grunde. Bei CIDP-Patienten lagen signifikant höhere Cytomegalievirus (CMV)-Titer vor als bei gesunden Probanden (McCombe et al., 1987). Bird et al. (1996) und Weiss et al. (1998) fanden eine erhöhte Koinzidenz der Erkrankung bei Patienten, die Melanome aufwiesen. Sowohl Melanozyten als auch Neurone entstammen Geweben ektodermalen Ursprungs. Sie teilen deswegen einige Epitope wie GM3, GM2, GD3, GD2.

Für die Pathogenese entscheidend sind sowohl zelluläre als auch humorale Faktoren. Antikörper stehen im Verdacht eine CIDP auszulösen, da viele Patienten von einer Plasmapherese therapeutisch profitiert haben (Toyka & Hartung, 1996; Hahn et al., 1996; Dyck et al., 1986). Allen et al. konnten 2005 ebenfalls nachweisen, dass Antikörper an Antigene peripherer Nerven binden. Außerdem wurden IgG und IgM sowie Komplementablagerungen in Nervenbiopsien entdeckt (Dalakas et al., 1980; Hays et al., 1988). Tiere, denen von Patienten plasmapheretisch entfernte IgG Antikörper injiziert wurden, entwickelten CIDP typische elektrophysiologische und pathologische Befunde. Diese wurden teilweise durch IgG allein, teils durch IgG in Verbindung mit Komplement ausgelöst (Yan et al., 2000, 2001).

Die pathogenetische Relevanz dieser Antikörper wurde unterstrichen, als Takigawa et al. (2000) nachweisen konnten, dass das anti-GM1-Antiserum eines CIDP-Patienten signifikant innerhalb von 10 Minuten und nach 45 Minuten reversibel Natriumströme in einer Nervenfaser einer Ratte unterdrückte.

Klinik

Die Symptome entwickeln sich progredient bis zu 8 Wochen nach Beginn der Erkrankung, und besteht können fluktuieren. Es meist eine symmetrische generalisierte Schwäche. Muskeleigenreflexe sind in späteren Stadien abgeschwächt oder fehlen ganz. Sensibilitätsstörungen treten häufig auf und können unterschiedliche sensible Qualitäten betreffen. Bei 10% der Patienten dominieren sensible Ausfälle die Klinik. Typischerweise stehen Störungen der Tiefensensibilität im Vordergrund. Schmerzen werden von 20%, Parästhesien von mehr als 50% der Betroffenen angegeben (McCombe et al., 1987; Boukhris et al., 2007). Bei 10-20% der Patienten finden sich Beteiligungen sowohl sensibler als auch motorischer Hirnnerven (Kokubun & Hirata, 2007). Tremor, meist ein Haltetremor, tritt bei einigen Personen auf (Said, 2006). Liquoruntersuchungen zeigen erhöhte Eiweißwerte und in Verbindung mit den elektrophysiologischen Untersuchungsbefunden kann die Diagnose gestellt werden (Said, 2006; Mata et al., 2006; Merkies et al., 2009).

Therapie

Prednison ist wirksam (Dyck et al., 1982), Plasmapherese ist wirkungsvoll (Dyck et al., 1986; Hahn et al., 1996) für die Zeit der Behandlung, kann jedoch nach Ende der Therapie zu einer erneuten neurologischen Verschlechterung führen.

Auch i.v.Ig konnten in placebokontrollierten Doppelblindstudien eindeutig positive Effekte erzielen, die bis 48 Wochen Wirksamkeit zeigten, insbesondere in der Langzeit-Intervalltherapie (van Doorn et al., 1990; Eftimov et al., 2002; Merkies et al., 2009).

1.6.3 Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS)

Übersicht

Paraneoplastische neurologische Syndrome sind eine Gruppe seltener Erkrankungen (weniger als 1% aller Tumorpatienten; Tishler et al., 2000) des Nervensystems, die im Verlauf einer Tumorerkrankung auftreten. Sie können vom Gehirn bis zum Muskel jede Struktur des Nervensystems befallen (Dalmau & Posner, 1997). Da gegen Tumorzellen und das Nervensystem kreuzreagierende Antikörper beschrieben wurden, geht man von einer autoimmunen Ätiologie der paraneoplastischen Syndrome aus (Dalmau & Clouston, 1992). Neuropathien treten oft im Zusammenhang mit Tumoren auf, aber echte paraneoplastische Polyneuropathien stellen klinisch und immunologisch eine weitere heterogene Gruppe von Erkrankungen dar (Sillevis et al., 1995; Antoine et al., 1999). Sie werden nicht durch Infiltration des Tumors oder durch Metastasen ausgelöst und auch nicht durch damit zusammenhängende Mechanismen wie Koagulopathien, Gefäßerkrankungen, Infektionen oder metabolische Faktoren. Paraneoplastische Neuropathien können jede klinische Manifestation haben, wobei das Denny-Brown-Syndrom, die subakute sensible Neuropathie, am häufigsten vorkommt. Sie treten in zwei Drittel der Fälle Monate bis Jahre vor der Diagnose des zu Grunde liegenden Malignoms auf (Rojas et al., 2000).

Pathogenese und Subtypen

Da sowohl im Serum als auch im Liquor von Patienten mit paraneoplastischen Syndromen antineuronale Antikörper gefunden wurden, geht man davon aus, dass es sich um autoimmune Erkrankungen handelt (Newsom-Davis et al., 1999; Dalmau & Posner, 1997; Dalmau et al., 1999; Darnell & Posner, 2006).

Proteine, die normalerweise nur an neuronalen Strukturen vorliegen, können auch von Tumoren in großem Maße exprimiert werden. Gegen den Tumor gerichtete Antikörper kreuzreagieren dann mit bestimmten Neuronen, was ein spezifisches neurologisches Symptom verursacht. Eine durch Antigene hervorgerufene oligoklonale T-Zell-Antwort (Voltz et al., 1998) oder ein Zusammenbruch der Immuntoleranz durch tumorassoziierte immunsuppressive Faktoren (Sutton & Winer, 2002) werden als andere Mechanismen diskutiert.

Verschiedene Tumore sind mit bestimmten Antikörpern assoziiert. In Tabelle 2 sind die jeweiligen Antikörper mit ihren Antigenen, den assoziierten paraneoplastischen Syndromen sowie den zu Grunde liegenden Tumoren aufgeführt.

Abhängig von der Lage des Antigens unterscheidet man zwei Gruppen von paraneoplastischen Syndromen:

 Das Antigen ist an der Zelloberfläche lokalisiert (z.B. spannungsabhängige Kalziumkanäle beim Lambert-Eaton-Syndrom).

Diese Erkrankungen involvieren hauptsächlich das periphere Nervensystem und verbessern sich bei Tumorbehandlung oder Entfernung der Antikörper, unter anderem durch Plasmapherese oder i.v.Ig.

2. Das Antigen liegt intrazellulär (z.B. Hu-, NOVA-, CDR 2 und PCRI).

Diese Erkrankungen können nicht durch Entfernung der Antikörper oder des Tumors gebessert werden.

Antikörper	Tumor	Zielantigene	Paraneoplastische Syndrome
Anti-Hu (ANNA-1)	Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)	Hu-Antigene 35-40 kDa in allen neuronalen Zellkernen	Enzephalomyelitis, sensorische und autonome Neuropathie
Anti-Ri (ANNA-2)	Mammakarzinom	NOVA-1 und NOVA-2, 55 und 80 kD Antigene in neuronalen Zellkernen im ZNS	Zerebelläre Ataxie, Myoklonus, Opsoklonus
Anti-Yo (APCA-1)	Ovar-, Uterus-, Mammakarzinom	CDR 2 / PCRI 32/62 Antigene im Purkinjezellzytoplasma	Paraneoplastische Kleinhirndegeneration
Anti-Tr	Hodgkin Lymphom	Antigene im Purkinjezellzytoplasma	Paraneoplastische Kleinhirndegeneration
Anti-VGKC	Hodenkarzinom, SCLC, Thymom	α-Subtyp des spannungsabhängigen Kaliumkanals	Limbische Enzephalitis Neuromyotonia congenita
Anti-VGCC	SCLC	spannungsabhängiger Kalziumkanal vom P/Q-Typ an der motorischen Endplatte	Lambert-Eaton-Syndrom
Anti- recoverin	SCLC und malignes Melanom	Recoverin, ein photorezeptor- spezifisches Ca-bindendes Protein	Paraneoplastische Retinopathie (CAR)

Tabelle 2: Übersicht der wichtigsten Autoantikörper, der mit ihnen assoziierten Tumore, ihr Zielgewebe und die häufigsten mit ihnen verbundenen Paraneoplasien (modifiziert nach Vincent et al., 1998).

Der häufigste Autoantikörper, der mit Paraneoplasien und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom assoziiert ist, ist anti-Hu. (Dalmau et al., 1992). Die häufigsten mit dem anti-Hu Antikörper assoziierten paraneoplastischen Neuropathien sind die Enzephalomyelitis, die sensorische und autonome Neuropathie (Graus et al., 1986; Lennon, 1991; Greenlee et al., 1993). Ursächlich hierfür ist eine Entzündung der Hinterwurzelganglienneurone durch entzündliche Infiltrate, neuronale Degeneration, Proliferation von Satellitenzellen und konsekutive Waller'sche Degeneration des Rückenmarks (Wanschitz et al., 1997). Bereits zuvor wurden in pathologischen Präparaten auch IgG

Antikörper an Hinterwurzelganglienneuronen im Rahmen paraneoplastischer Syndrome gefunden (Dhib-Jalbut & Liwnicz, 1986). In einer Studie zeigte sich, dass die Sensitivität von anti-Hu Antikörpern für paraneoplastische sensible Neuropathien 82% und die Spezifität 99% betragen (Molinuevo et al., 1998).

Anti-Ri, welcher mit den NOVA-1 und NOVA-2 Antigenen reagiert, ist hauptsächlich mit dem Mammakarzinom assoziiert. Anti-Ri positive Patienten leiden an zerebellärer Ataxie, Opsoklonus und Myoklonus (Anderson et al., 1988; Luque et al., 1991).

Zwei Antikörper, die mit dem Zytoplasma der Purkinjezellen im Kleinhirn reagieren, werden bei Patienten mit subakuter Kleinhirndegeneration beschrieben, der anti-Yo Antikörper tritt im Zusammenhang mit gynäkologischen Tumoren auf (Jaeckle et al., 1985). Anti-Tr wurde bei Hodgkin-Lymphom Patienten beschrieben (Graus et al., 1997a).

Antikörper gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle vom P/Q Typ (anti-Ca_v), die den Kalziumeinstrom an der präsynaptischen Membran der motorischen Endplatte und somit die Acetylcholinfreisetzung hemmen, werden beim Lambert-Eaton-Syndrom gefunden, welches bei kleinzelligem Bronchialkarzinom auftritt (Motomura et al., 1997).

Antikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle treten bei der limbischen Enzephalitis und bei der Neuromyotonia congenita im Rahmen von Thymomen, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom und Hodentumoren auf (Senties-Madrid & Vega-Boada, 2001).

Anti-Recoverin sind Autoantikörper, die gegen das photorezeptorenspezifische Ca⁺-bindende Protein Recoverin in Photorezeptoren der Retina gerichtet sind. Sie treten bei Patienten mit SCLC und malignen Melanomen auf und verursachen die paraneoplastische Retinopathie (CAR), welche zur Erblindung führt (Adamus et al., 1997; Dalmau et al., 1997).

Außerdem existieren bisher als "atypisch" beschriebene antineuronale Antikörper. Das sind Antikörper, welche nicht anti-Hu, anti-Ri oder anti-Yo entsprechende Anfärbungen von Neuronen in der Immunhistochemie zeigen (Blaes et al., 1998).

Antikörper gegen neuronale Strukturen zeigen in verschiedenen Studien eine hohe Spezifität zur Erkennung maligner und paraneoplastischer Erkrankungen (Moll et al., 1990; Dalmau et al., 1992; Blaes et al., 1998).

Graus et al. (1997b) haben gezeigt, dass anti-Hu positive SCLC-Patienten eine bessere Prognose als anti-Hu negative Patienten haben. Das gilt auch für andere Autoantikörper bei Patienten mit einem nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) (Blaes et al., 2000). Der pathogene Effekt von Autoantikörpern, die gegen die neuromuskuläre Synapse gerichtet sind, ist nachgewiesen. Dagegen ist die Rolle der Autoantikörper, die bei zentralnervösen paraneoplastischen Syndromen auftreten, noch unklar. Bekannt ist, dass das Hu-Antigen von SCLC-Tumorzellen und Ganglienzellen des zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert wird (Dalmau et al., 1992), dass Hu-ähnliche Moleküle an der Zelloberfläche exprimiert werden können (Tora et al., 1997) und dass der anti-Hu Antikörper in SCLC-Zelllinien internalisiert werden kann (Senties-Madrid & Vega-Boada, 2001). Es ist jedoch nicht geklärt, ob die anti-Hu Antikörper eine Zellschädigung oder Funktionsstörung bewirken. Tatsächlich rief eine Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten HuD-Antigen zwar hohe Titer von anti-Hu Antikörpern hervor, aber es gab keinerlei Anhaltspunkte für neurologische Erkrankungen bei diesen Tieren. Auch eine Immunisierung von Mäusen mit dem Yo-Protein führte zu einer hochtitrigen Antikörperantwort gegen dieses Protein, hatte aber keine neurologischen Dysfunktionen zur Folge (Tanaka et al., 1995). Eine Injektion von anti-Hu IgG von Patienten mit paraneoplastischen Erkrankungen in Tiere ruft keine klinischen Symptome hervor (Smitt et al., 1995).

Da diese Autoantikörper gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind, wird ihre Pathogenität bei Paraneoplasien kontrovers diskutiert (Greenlee et al., 1993; Hormigo et al., 1994; Jaeckle, 1985; Verschuuren et al., 1997).

Klinik

Die Klinik wird durch das jeweils betroffene Gewebe definiert. Liquoruntersuchungen bei Patienten mit peripherer PNS zeigen hohe Proteinspiegel und Leukozyten-, insbesondere Lymphozytenzahlen (Stefansson & Arnason, 2000; Bunn & Ridgway, 1989; Posner & Furneaux, 1990).

Bei paraneoplastischen Syndromen können das Groß- und Kleinhirn (z.B. limbische Enzephalitis und paraneoplastische zerebelläre Degeneration), die Hirnnerven und Photorezeptoren (z.B. paraneoplastische Retinopathie), das Rückenmark (z.B. Myelitis) und die Hinterwurzeln (z.B. Guillain-Barré-Syndrom), die Spinalganglien und die peripheren Nerven (z.B. sensorische Neuropathie), die neuromuskulären Synapsen (z.B. Lambert-Eaton-Syndrom) und auch das autonome Nervensystem (z.B. gastrointestinale Pseudoobstruktion) betroffen sein (Dalmau et al., 1996; Sodhi et al., 1989).

Therapie

Es gibt zwei Therapieansätze bei paraneoplastischen Neuropathien. Einer besteht in der Entfernung des auslösenden Tumors, ein zweiter besteht in einer immunmodulatorischen Therapie mit i.v.Ig,

einer Plasmapherese oder auch immunsupprimierenden Medikamenten (Voltz, 2002; Blaes 1999). Es hat sich jedoch gezeigt, dass unterschiedliche paraneoplastische Neuropathien unterschiedlich gut auf die i.v.Ig ansprechen. Patienten mit einem Lambert-Eaton-Syndrom sprechen sehr gut auf diese Therapie an, wohingegen Patienten mit Anti-Hu assoziierten Neuropathien nur vereinzelt profitieren (Voltz, 2006).

1.6.4 Lambert-Eaton-Syndrom (LEMS)

Epidemiologie

Das Lambert-Eaton-Syndrom (LEMS) ist eine autoimmunologische Erkankung des peripheren Nervensystems, die ebenfalls paraneoplastischer Genese sein kann. Das Erkrankungsalter liegt zwischen 17 und 79 Jahren, wobei sich eine Häufung bei Patienten über 40 Jahren findet (O'Neill et al., 1988). Männer sind häufiger betroffen als Frauen sowohl bei den Patienten mit als auch ohne begleitenden Tumor (Elmqvist & Lambert, 1968; O'Neill et al., 1988).

Häufig auftretende Tumoren sind das kleinzellige Bronchialkarzinom sowie Non-Hodgkin-Lymphome. Das paraneoplastische Syndrom wird oftmals vor dem Tumor entdeckt (O'Neill et al., 1988), so dass beim Auftreten der Erkrankung immer eine Tumorsuche indiziert ist. Bei 66% wurde im Abstand von 5 Monaten bis 3,8 Jahren eine Tumorerkrankung gefunden, zwei Jahre nach Beginn der Krankheit nimmt die Wahrscheinlichkeit einen bislang unentdeckten Tumor zu finden stark ab, nach fünf Jahren strebt sie gegen Null. Die Prognose der Erkrankung wird durch den Tumor bestimmt (O'Neill et al., 1988).

Pathogenese

LEMS ist eine autoimmunologische neurologische Erkrankung, bei der die neuronal stimulierte Acetylcholinausschüttung an der neuromuskulären Synapse vermindert ist (Lambert et al., 1961; Lambert & Rooke, 1965; O'Neill et al., 1988). Patienten leiden zunächst unter Skelettmuskelschwäche, herabgesetzten Muskeleigenreflexen und autonomer Dysfunktion. Eine autoimmune Genese ergibt sich aus der Wirksamkeit eines Plasmaaustauschs oder einer Immunsuppression und aus der Tatsache, dass durch passiven Transfer von IgG-Antikörpern kranker Patienten in Mäuse diese ebenfalls erkranken (Lang et al., 1981; Lennon et al., 1982; Newsom-Davis & Murray, 1984). Da häufig gleichzeitig mit dem LEMS ein kleinzelliges Bronchialkarzinom auftrat, wurde angenommen, dass gegen den Tumor gerichtete Antikörper im Serum zirkulieren (Lambert & Rooke, 1965; O'Neill et al., 1988). Obwohl die klinischen Beschwerden bei LEMS Rückschlüsse

1.6 Entzündliche und paraneoplastische Polyneuropathien

auf verschiedene Angriffsorte für die Antikörper zulassen, scheint die Sensitivität der neuromuskulären Synapse gegenüber ACh nicht verändert zu werden (Cull-Candy et al., 1980; Lang et al., 1987). Auch die Größe cholinerger Vesikel sowie Inhalte und intraterminale Prozesse bleiben bei LEMS unverändert (Lang et al., 1984; Molenaar et al., 1982). Bereiche der Synapsen, die spannungsabhängige Kalziumkanäle (Ca_V) beinhalten sollen, sind bei Patienten mit LEMS umorganisiert und zahlenmäßig reduziert (Engel et al., 1980). In immunologischen und funktionellen Studien konnte das Vorhandensein von Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle (Ca_V) belegt werden.

Der Einstrom von Kalziumionen in die Nervenendigung ist notwendig für die Koppelung des Aktionspotenzials zur ACh-Ausschüttung (Augustine et al., 1987; Katz & Miledi, 1970; Llinas et al., 1976). Die herabgesetzte ACh-Freisetzung bei LEMS-Patienten kann mit einer (funktionellen) Verminderung der Cav vom P/Q-Typ erklärt werden (Pinto, 2002).

Klinik

Das am häufigsten auftretende Symptom ist die proximal betonte, die untere Extremität bevorzugende Skelettmuskelschwäche (Elrington et al., 1994; Lambert et al., 1961; Lambert & Rooke, 1965; Wise & MacDermot, 1962). Nach Muskelkontraktion ist die maximale Kraftentfaltung größer als wenn der Muskel aus der Ruhe heraus kontrahiert wird.

Muskeleigenreflexe sind abgeschwächt oder erloschen, können aber nach Muskelkontraktion wieder auslösbar oder sogar verstärkt sein (Lambert et al., 1961; Lambert & Rooke, 1965; Wise & MacDermot, 1962).

Autonome Dysfunktionen (trockener Mund, Impotenz, vermindertes Schwitzen, Obstipation, Miktionsstörungen und Akkommodationsschwäche) treten bei 80% der Patienten auf (Henriksson et al., 1977; Khurana et al., 1988; Lambert & Rooke, 1965; Rubenstein et al, 1979). Sensorische Störungen sind selten.

Die elektrophysiologische Untersuchung zeigt typischerweise ein primär niedriges Muskelaktionspotenzial, dessen Stromamplitude bei niedriger Reizrepetition (2-3Hz) weiter abnimmt. Nach starker Willkürkontraktion wird bei erneuter Reizung eine Zunahme der Stromamplitude beobachtet. Bei höherfrequenter Reizung (20-50 Hz) steigt die Stromamplitude bei 95% der Patienten um ein Mehrfaches an, was als Inkrement bezeichnet wird.

Therapie

Die Patienten sprechen auf eine Therapie mit dem Kaliumkanalblocker 3,4-Diaminopyridin an. Hierdurch wird indirekt die Freisetzung von ACh erhöht, da durch die erniedrigte Kaliumleitfähigkeit das Aktionspotenzial verlängert wird. Die Therapie erfolgt mit Immunsuppressiva. Wenn die Behandlung keinen Erfolg zeigt, kann ein Versuch mit Plasmapherese oder mit i.v.Ig erfolgen.

1.6.5 Paraneoplastische limbische Enzephalitis

Pathogenese

Anders als bei den zuvor beschriebenen Neuropathien handelt es sich bei der limbischen Enzephalitis (LE) um eine Erkrankung des zentralen Nervensystems. Die LE ist eine Erkrankung, die idiopathisch oder paraneoplastischen Ursprungs ist, und häufig mit der Produktion von Autoantikörpern einhergeht. Tumoren, die mit ihr assoziiert sind, sind das kleinzellige Bronchialkarzinom, Hodenkarzinome und Brustkrebs (Gultekin et al., 2000). Die Hälfte der Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom und LE weisen in ihrem Blut anti-Hu-Antikörper auf (Alamowitch et al., 1997). Ähnlich wie bei der das periphere Nervensystem betreffenden erworbenen Neuromyotonie oder dem Isaacs Syndrom finden sich hier Antikörper, die sich gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle richten. Im Falle der LE liegen die Antigene im Hippocampus, im gyrus dentatus (Buckley et al., 2001; Vincent et al., 2004) und entsprechen den spannungsabhängigen Kaliumkanalsubtypen Kv 1.1 und Kv 1.2 (Rhodes et al.; 1996; Monaghan et al., 2001). Es können aber auch andere Areale des Nervensystems betroffen sein. So kann die Erkrankung mit einem Befall des limbischen Systems beginnen und über eine Meningoenzephalitis zu einer Entzündung der Spinalganglienzellen führen (Corsellis et al., 1968; Bakheit et al., 1990; Henson et al., 1965). Assoziiert mit der LE sind zwei Arten von Antikörpern. Es gibt intrazellulär gelegene Antikörper wie anti-Hu, anti-Ma2 und CV2/CRMP5 sowie Amphiphysin-Antikörper. Außerdem gibt es extrazellulär gelegene Antikörper wie die gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle und NMDA-Antikörper, die in immunhistochemischen Untersuchungen auf Hippocampus und Zerebellum nachgewiesen werden konnten (Tüzün & Dalmau, 2007). Die für diese Studie interessanten Antikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle sind in 30% der antikörpervermittelten LE vorhanden. In diesen Fällen liegen auch bei 30% der Patienten Tumoren vor.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle gibt es in zahlreichen Varianten, die noch nicht alle beschrieben sind. Kv 1.1, Kv 1.2 und Kv 1.6 sind bereits identifiziert. Kv 1.1 und Kv 1.2 werden im peripheren

Nervensystem exprimiert, insbesondere juxtaparanodal an den Ranvier'schen Schnürringen und an der neuromuskulären Synapse (Devaux et al., 2004). Kv 1.2 treten bei 0-3 Tage alten Tieren zu 100% und bei bis zu 60 Tage alten Tieren zu 85-90% an Spinalganglienneuronen auf. Durch die Blockade der spannungsabhängigen Kaliumkanaäle, die mit α -Dendrotoxin erfolgt, kommt es zu einer erhöhten Erregbarkeit bei Neuronen vom C-Typ und einer vermehrten Bildung von Aktionspotenzialen bei Neuronen vom A-Typ (Glazebrook et al., 2002). Dies ist klinisch gut mit einem vermehrten Schmerzempfinden vereinbar.

Antikörper an spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Kv) können immunhistochemisch auf Xenopus Oozyten und speziell hergestellten Zelllinien nachgewiesen werden (Hart et al., 1997; Kleopa et al., 2006). Es wurde nachgewiesen, dass Antikörper oder IgG Fraktionen Kaliumströme in Zellen, die den Kv 1.2 aufweisen (Sonoda et al., 1996), komplementunabhängig reduzieren (Tomimitsu et al., 2004). Weiterhin gibt es bei motorischen und sensiblen Nerven unterschiedliche Kaliumströme, was sich in elektrophysiologischen Studien gezeigt hat (Wang et al, 1993; Sheng, et al., 1992; Drewe et al., 1992; Veh et al., 1995). So könnte es sein, dass von bestimmten Patienten Antikörper gegen Kaliumkanäle an motorische Nerven und bei einigen Patienten Antikörper gegen Kaliumkanäle an motorische Nerven, Hinterwurzelganglien und Neurone des zentralen Nervensystems binden (Kocsis et al., 1986; Applegate & Burke, 1989).

Klinik

Die LE ist eine Erkrankung, die klinisch mit einem Verlust des Kurzzeitgedächtnisses, epileptischen Anfällen, Wesensveränderung und Verwirrtheit einhergeht.

Therapie

Primär sollte bei der paraneoplastischen LE der zu Grunde liegende Tumor entfernt werden. Weiterhin wirksam sind Corticosteroide, i.v.Ig und Plasmapherese (Vedeler & Storstein, 2009). Je nach Lage des Antikörpers sind die Ansprechraten auf die immunsupprimierende Therapie unterschiedlich. Bei Patienten mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle beträgt die Ansprechrate 80%, (Tüzün & Dalmau, 2007), bei Patienten, deren Antikörper intrazellulär liegt, ist sie bedeutend niedriger.

1.6.6 Neuropathien assoziiert mit monoklonalen Gammopathien

Pathogenese

Hierbei handelt es sich um eine heterogene Form von Neuropathien, die mit einer heterogenen Gruppe monoklonaler Gammopathien assoziert sind.

Das Spektrum der monoklonalen Gammopathien umfasst die nicht malignen Gammopathien vom Typ IgM, IgG und IgA sowie die malignen Gammopathien vom Typ des multiplen Myeloms, dem Morbus Waldenström, der B-Zell-Leukämie und der chronisch lymphatischen Leukämie. Neuropathien treten häufiger bei den nicht malignen Formen der Erkrankung auf. Die Prävalenz steigt mit dem Alter von 0,1% in der dritten Dekade auf 3% in der achten Dekade und 19% bei über 95-Jährigen (Axelsson et al., 1966; Radl et al., 1985, 1975; Kyle et al., 1972). Am häufigsten (60% der Fälle) liegen bei den Gammopathien Antikörper vom Typ IgG vor, je nach Literatur gleich häufig treten Antikörper vom Typ IgM (10-27%) und vom Typ IgA (13-30%) auf (Radl, 1985; Kyle et al., 1972; Ameis et al., 1976). Die assoziierten Neuropathien sind ebenfalls heterogen. Etwa 60% der Neuropathien haben IgM M-Proteine, 30% weisen IgG M-Proteine auf und 10% IgA M-Proteine (Gosselin et al, 1991; Yeung et al., 1991; Suarez & Kelly, 1993). Das in dieser Studie vorliegende Serum wurde von einem Patienten entnommen, der an einer Gammopathie vom IgG-Typ litt und Antikörper vom IgG und IgM-Typ enthielt. Im weiteren Verlauf wird hierauf näher eingegangen.

Die Ursachen für Neuropathien von Patienten mit Gammopathien sind noch weitgehend ungeklärt, es finden sich jedoch Hinweise auf eine Kreuzreaktion von M-Proteinen, die in 50% der Fälle anti-MAG-Antikörpern entsprechen, mit neuronalen Antigenen wie dem myelinassoziierten Antigen. Dieses befindet sich in der Myelinscheide zentraler und peripherer Nerven. Eine nachfolgende Komplementreaktion führt dann zu einer Nervenschädigung. Außerdem wird diskutiert, ob die Nervenschädigung durch einen sekundären toxischen oder metabolischen Effekt hervorgerufen wird (Ramchandren & Lewis, 2009). Hinweise auf die Immunpathogenese der Erkrankung ergaben sich durch Häufungen von Antikörpern gegen neuronale Strukturen im Patientenserum, durch den immunfluoreszenztechnischen Nachweis von Immunglobulinen und Komplement im Endoneurium (Latov et al., 1988; Nobile-Orazio et al., 1994; Ellie et al., 1996) und durch die klinische Besserung nach Plasmapherese oder im Rahmen einer Immunsuppression auftritt (Oksenhendler et al., 1995; Notermans et al., 1996). Für eine autoimmune Genese sprechen ebenfalls die durch systemische Applikation oder durch direkte neurale Injektion von Autoantikörpern hervorrufbare demyelinisierende Polyneuropathie (Hays et al., 1987; Tatum, 1993) bei Ratten. In pathologischen Studien treten im Zusammenhang mit IgM-MAG-Antikörpern eine Erweiterung der Myelinlamelle auf oder eine Ablagerung von IgM und Komplement an der Myelinscheide sowie eine segmentale Myelinierung und Demyelinierung (Gross et al., 1983). Anti-Chondroitinsulfat-Antikörper rufen intraneurale IgM-Ablagerungen hervor. Bei peripheren Nervenbiopsien wurden teilweise Antikörper in den demyelinisierten Myelinscheiden gefunden ohne Nachweis von Entzündungszellen, was für einen primär Antikörper vermittelten Prozess sprechen könnte.

Klinik und Diagnostik

Elektrophysiologisch findet sind bei der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz vom IgG-Typ (IgG-MGUS) häufig eine distale sensible Polyneuropathie. Manche Patienten weisen hauptsächlich eine small-fiber-Neuropathie mit ausgeprägten neuropathischen Schmerzen auf. In anderen Fällen ähnelt das klinische und elektrophysiologische Bild dem einer CIDP. Teilweise werden Antikörper vom IgG und IgM-Typ nachgewiesen, die gegen Antigene am neuronalen Axon oder gegen die Oberfläche von Spinalganglienneuronen gerichtet sind (Gorson et al., 1997; Quattrini et al., 1992).

Diagnostiziert werden monoklonale Gammopathien durch Serumproteinelektropherese und Immunelektropherese. In der Urinproteinelektropherese können Bence-Jones-Proteine nachgewiesen werden.

Therapie

Therapeutisch wirksam sind i.v.Ig, Plasmapherese, Prednison oder Chemotherapeutika (Dyck et al., 1991).

1.7 Anatomie der Spinalganglien

Spinalganglien oder Hinterwurzelganglien sind makroskopisch spindelförmige Auftreibungen im Bereich der hinteren Spinalnervenwurzel. Sie liegen bei der Ratte in den Foramina intervertebralia proximal der Vereinigung der vorderen mit der hinteren Wurzel, und sind von den Rückenmarkshäuten umgeben. Die Hinterwurzeln enthalten überwiegend marklose Fasern und die Hinterwurzelganglienzellen sind die ersten Neurone der afferenten sensiblen Fasern. Die Spinalganglien werden von einer Bindegewebskapsel, dem Perineurium, umgeben und sind von mit Bindegewebe umgebenen Gefäßen durchzogen. Die pseudounipolaren Neurone liegen zumeist am Rande des Ganglions, den zentralen Teil bilden die Nervenfortsätze, die sich bei Austritt aus dem Ganglion in einen zentralen und einen peripheren Fortsatz aufteilen (Andres, 1961). Der zentrale Teil, das ursprüngliche Axon des Neurons, zieht als Hinterwurzel ins Rückenmark, der periphere Teil, der sich aus einem in der Peripherie verzweigten Dendriten entwickelt hat, bildet den Spinalnerv. Die Fortsätze lassen sich den Neuronen nicht immer direkt zuordnen, da sie oft ineinander verwunden verlaufen und andere Neurone umschlingen. Die Neurone in den Ganglien werden von flachen bis isoprismatischen Mantel- und Gliazellen umhüllt, die Axone distal des Ganglions werden von Schwannzellen ummantelt (Pannese, 1960). In Spinalganglien unterscheidet man nach licht- und elektronenmikroskopisch morphologischen Kriterien verschiedene Zelltypen. Eine Einteilung nach Andres (1961) zeigt Tabelle 3.

Zelltyp	Zelldurch- messer [µm]	Nissl-Substanz/Zytoplasma	Vorkommen [%]
Al	40-75	Helles Zytoplasma, gleichmäßig verteilte Nissl-Schollen	37
A2	45	Weite, helle Neuroplasmazonen zwischen den Nissl-Schollen, dicker markhaltiger Neurit	2
A3	30-40	Helles Zytoplasma, kleiner markhaltiger Neurit	7
B1	25-40	Dunkles Zytoplasma, dadurch Maskierung der Nissl- Schollen, dünne markarme/-lose Neuriten	47
B2	18-30	Geringer ausgeprägte Maskierung der Nissl-Schollen	6
<i>B3</i>	≤18	Dunkles Zytoplasma	1

Tabelle 3: Morphologische Kriterien verschiedener Spinalganglienzellen (Ratte/Katze) nach Andres1961

Den kleinen Neuronen (B1, B2 und B3) der Hinterwurzelganglien mit einem Durchmesser von etwa 20 mm sind die dünn myelinisierten A δ - (Hautafferenzen für Temperatur und Nozizeption) und die marklosen C-Fasern (Hautafferenzen für Nozizeption) mit einer Leitungsgeschwindigkeit von 2 - 8 m/s, bzw. <1m/s zugeordnet. Ihre Somata weisen eine dunkle Färbung auf (Harper & Lawson, 1985 a, b; Villiere & McLachlan, 1996).

Die A-Typ-Zellen, große und mittelgroße Neurone, repräsentieren die epikritische Sensibilität (Clark, 1926; Hirt, 1928) und die Somato- und Viszerosensibilität. A α - und A β -Fasern können den größeren helleren Neuronen zugeordnet werden. Für A δ -Fasern findet sich keine eindeutige

Zuordnung zu einer bestimmten Zellgröße bzw. –färbung (Harper & Lawson, 1985 a, b; Reeh et al., 1987). In dieser Arbeit wurden hauptsächlich kleine Spinalganglienneurone vom Typ B1, B2 und B3 untersucht.

1.8 Fragestellung

Das Guillain-Barré-Syndrom, die chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie und paraneoplastische Polyneuropathien sind Erkrankungen, die mit Schmerzen einhergehen können.

Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom klagen über nächtlich betonte (Ropper et al. 1984) starke Schmerzen mit unterschiedlichen Charakteristika und Lokalisationen (Rückenschmerzen 33%, interskapulär 28%, muskulär (24%), radikuläre Schmerzen (18%) und schmerzhafte Par- und Dysästhesien (Ruts et al., 2007; Moulin et al., 1997; Trojaborg 1998)). Da schmerzleitende Fasern weder dick myelinisiert sind noch Acetylcholin als Neurotransmitter agiert, liegt wahrscheinlich ein anderer Pathomechanismus zu Grunde als eine primäre Demyelinisierung.

Auch die chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie ist eine Erkrankung, in deren Verlauf schmerzhafte Episoden auftreten können (Boukhris 2007; McCombe et al., 1987), ohne dass der Pathomechanismus dafür bekannt ist.

Bei paraneoplastischen Polyneuropathien, bei denen in der Pathogenese ebenfalls Autoantikörper gegen neuronale Strukturen eine Rolle spielen, treten ebenfalls Schmerzen auf (Oki et al., 2007; Camdessanché et al., 2002), so dass auch hier geklärt werden muss, ob Antikörper diese direkt auslösen, indem sie an kleine Neurone in Hinterwurzelganglien (DRG) binden oder ob Komplement und zelluläre Mechanismen zusätzlich vorhanden sein müssen (Vernino, 2007).

Da der Mechanismus zur Schmerzentstehung bei entzündlichen und paraneoplastischen Neuropathien ungeklärt ist, jedoch eine therapeutische Bedeutung haben kann, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die von humanen Individuen gebildeten IgG Antikörper, die beim Guillain-Barré-Syndrom, der chronischen inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie und bei paraneoplastischen Polyneuropathien vorkommen, nicht nur an bestimmte Epitope des primären sensorischen Neurons von Ratten binden, sondern dort auch eine antikörpervermittelte Reaktion auslösen.

Neben den IgG Antikörpern, die aus dem Serum erkrankter Patienten (siehe Tabelle 4) isoliert wurden, werden als Negativkontrollen Antikörper vom Typ IgG klinisch gesunder Probanden und

als Positivkontrolle Antikörper, die gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle gerichtet sind, von Patienten mit einem Lambert-Eaton-Syndrom getestet.

Im *voltage-clamp* Modus werden bei verschiedenen Potenzialen die durch Antikörper vermittelten akuten Veränderungen der gesamten Einwärts- und Auswärtsströme untersucht. Im *current-clamp* Modus werden die Aktionspotenziale abgeleitet, die sich nach Anlage eines Stroms bilden. Diese werden nach Applikation der IgG-Fraktionen hinsichtlich der veränderten Ruhepotenziale, der Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen (*threshold*), ihrer Dauer und Amplitude ausgewertet. Neurone, die während eines 40 ms dauernden Reizes in der Lage waren, mehrere Aktionspotenziale zu bilden, wurden außerdem über eine Dauer von 1000 ms gereizt, um die Veränderung der Feuerfrequenz nach Antikörperapplikation zu dokumentieren.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengruppen und Probenzusammenstellung

In dieser Arbeit wurden IgG-Fraktionen aus Seren und Plasmapheraten, die jeweils im Rahmen der Therapie anfielen, von insgesamt 14 Patienten und sechs gesunden Probanden verwendet. Die untersuchten IgG-Fraktionen verteilen sich auf verschiedene Erkrankungsgruppen. Diese wurden anhand von klinischen Angaben, einem klinisch neurologischen Untersuchungsbefund, elektrophysiologischen Untersuchungen sowie laborchemischen Parametern, die allesamt aus den Arztbriefen der Patienten während der entsprechen Aufenthalte in der neurologischen Universitätsklinik Gießen entnommen wurden, in Tabelle 4 zusammengestellt.

Patient/ Geschlecht	Erkrankung	Autoantikörper i.d. Immunfluoreszenz	Anzahl der unter- suchten Zellen	Betroffenes System
1 W	Gesund		4	
2 W	Gesund		4	
3 W	Gesund		2	
4 W	Gesund		4	
5 M	Gesund		4	
6 M	Gesund		3	
7 M	LEMS	VGCC P/Q-Typ	5 (1,5 g/l) 6(0,5 g/l)	Motorik
8 W	Limbische Enzephalitis	VGKC	4	
9 M	GBS		8	Motorik
10 M	GBS		12	Sensomotorik
11 W	GBS		5	Sensomotorik
12 ?	GBS		7	Sensomotorik
13 M	GBS		4	Sensomotorik
14 W	CIDP		6	Motorik
15 W	CIDP		6	Sensomotorik
16 ?	PNP		3	Motorik
17 M	PNP	anti-Hu	5	Motorik
18 W	PNP	anti-Hu	4	Sensomotorik
19 M	PNP		6	Sensomotorik
20 ?	PNP IgM		5	Sensorik

Tabelle 4: Klinische Daten der untersuchten Patienten

2.2 IgG Aufreinigung

Die IgG-Fraktionen wurden aus dem Serum oder Plasmapheraten gewonnen.

Dazu wurde das Serum bzw. das Plasmapherat mit einem Glycinpuffer (0,1 molar) pH 9 im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 verdünnt und auf eine Protein G Säule (Pharmacia Hi Trap) aufgetragen. An diese binden die IgG Antikörper mit ihrem Fc-Teil. Das restliche Serum wurde mit Glycinpuffer pH 9 herausgewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Proteinsäule mit einem Glycinpuffer (0,1 molar) pH 2,7 gespült, um die gebundenen Antikörper in Milliliterfraktionen aus der Säule zu eluieren. Bei 280 nm Wellenlänge wurde im Photometer die Extinktion bestimmt, und nur die Fraktionen, die einen supramaximalen Wert erzielten, wurden verwendet. Um den pH-Wert der IgG-Fraktionen wieder auf physiologische Werte einzustellen, wurden sie in einen semipermeablen Dialyseschlauch gefüllt und im Volumenverhältnis 1:200 gegen PBS-Puffer (Phosphate-Buffered Saline, pH 7,4) dialysiert. Dieser Schritt wurde insgesamt fünfmal für jeweils 24 Stunden durchgeführt. Danach wurden die IgG-Fraktionen gegen HEPES-Puffer (pH 7,4) im Verhältnis 1:100 nochmals 24 Stunden dialysiert. Nach der Dialyse wurde der IgG Wert nephelometrisch bestimmt und auf eine bestimmte Konzentration verdünnt, die in den jeweils durchgeführten Experimenten angegeben ist.

2.3 Lösungen

2.3.1 Die Innenlösung

Die Innenlösung für die Patchpipette enthielt 10 mmol/l HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1ethansulfonsäure)) als Puffer und wurde mit KOH-Lösung mit einer pH-Elektrode (Ingold Elektrode, Merck, Deutschland) auf einen pH-Wert von 7,30 eingestellt. Die Substanzen wurden bei der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen. Tabelle 5 zeigt eine Übersicht über die Zusammensetzung.

Lösungsname	Na^+	$K^{\scriptscriptstyle +}$	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Chelator	Puffer
High-K _i	5	155	1	3	10 EGTA	<i>10 HEPES</i>

Tabelle 5: Zusammensetzung der Innenlösung (Konzentrationen in mmol/l)

2.3.2 Übersicht der Außenlösungen

Die Kontroll-CO₂-Lösung wurde mit Carbogen-Gas (95% O₂, 5% CO₂) auf einen pH zwischen 7,25 und 7,30, die HEPES-Lösung wurde mit 10 mmol/l HEPES auf einen pH-Wert von 7,40 eingestellt (Tabelle 6). Um ein Aufschäumen der IgG-Fraktionen durch die Begasung zu vermeiden, wurden diese mit HEPES-Lösung gepuffert, da diese zur pH-Wert Einstellung keine Begasung benötigt. Die erste Messung wurde immer in der Kontroll-CO₂ gepufferten Lösung durchgeführt, die daraufhin gegen Kontroll HEPES getestet wurde.

Lösungsname	Na ⁺	$K^{\scriptscriptstyle +}$	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Glucose	Puffer
Kontroll-CO ₂	141	5,6	2,2	1	11	25 NaHCO3
Kontroll-HEPES	141	5,6	2,2	1	11	10 HEPES

Tabelle 6: Zusammensetzung der Außenlösung (Konzentrationen in mmol/l); Anionen entsprechen Chloridionen.

2.3.3 Präparation der Ganglienzellen

Für die Schnittpräparation wurden Hinterwurzelganglien von Laborratten (Wistar) aus der Zucht des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universtität verwendet, und wie beschrieben präpariert (Safronov et al., 1996). Das Töten der Ratten erfolgte gemäß den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes (25.05.1998, §7). Hierbei wurden zwischen drei und neun Tage alte weibliche und männliche Ratten gleichermaßen verwendet. Sie wurden dekapitiert und sofort in eine mit eiskalter (2-6° C) Kontroll- CO₂ gefüllte Petrischale gelegt, die ständig mit Carbogen-Gas (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffdioxid) begast wurde. Die folgenden Präparationsschritte fanden unter den genannten Bedingungen statt, um durch die niedrige Temperatur den Sauerstoffverbrauch und den Schadstoffanfall in der Zelle zu vermindern und durch die Carbogenbegasung den Sauerstoffgehalt und den pH-Wert der Präparationslösung zu gewährleisten. Dann wurde von kaudal aus die Wirbelsäule als Ganzes herausgeschnitten. Unter einer Lupe (6,4- bis 40-fache Vergrößerung, Wild M3, Heerbrugg, Deutschland) wurde dann mit Hilfe von Irisschere und Pinzette der Spinalkanal von ventral her geöffnet. Die Vorder- und Hinterwurzeln wurden vorsichtig mit der Schere durchtrennt und das Rückenmark aus dem Spinalkanal entnommen, wobei die Spinalganglien in den Intervertebrallöchern verblieben. Von distal aus wurden bis zu fünf lumbale Spinalganglien dann mit einer Pinzette an den Spinalnerven aus den Intervertebrallöchern gezogen.

Anschließend wurden die Nervenfortsätze abgetrennt und die Ganglien von ihrer Bindegewebshülle befreit.

Die Ganglien wurden in 40° C warmen und flüssigen Agar gebettet. Dieser Agar (2%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) wurde zuvor in 20 ml carbogenisierter Ringerlösung unter ständigem Rühren zweimalig aufgekocht und auf 40° C abgekühlt.

Das Becherglas mit den in Agar eingebetteten Ganglien wurde nun in eine 23%ige NaCl-Lösung gestellt, die zuvor mehrere Stunden im Eisfach auf –18 bis –22° C abgekühlt war, bis der Agar fest wurde. Beachtet wurde, dass die Ganglien von allen Seiten gut mit Agar bedeckt waren und der Agar nicht am Becherglas festfror.

Anschließend wurde der Agar als Ganzes aus dem Becherglas herausgelöst und die Ganglien mit einer Skalpellklinge grob quadratisch umschnitten. Unter der Lupe wurden die Quader zu Pyramiden zurechtgeschnitten, wobei die Ganglien sich etwa in der Mitte befanden. Nun wurden die Pyramiden mit der Pinzette aus der Präparierschale genommen und kurz an der Basis getrocknet, damit der Kleber besser haftete. Mit Acrylcyanat ("Sekunden-Alleskleber", UHU GmbH, Bühl, Deutschland) wurden die Pyramiden an der Basis auf ein Metallplättchen geklebt, welches in die Halterung des Vibratoms (FTB 1.4, Ulrich Meier, Bensheim, Deutschland) eingespannt wurde.

Diese Halterung besteht aus einer runden Aluminiumschale mit Metalluntersatz, welcher über einen Magneten am Vibratom befestigt ist. Auch die Schale des Vibratoms war mit eiskalter begaster Ringerlösung gefüllt. Nun wurde das Messer (Rasierklinge, Wilkinson) in einem Winkel von 15° zur Horizontalen festgestellt und parallel zur Basis der Agarstücke ausgerichtet. Die Schnittgeschwindigkeit betrug 3-4 mm/min, die Schichtdicke der Schnitte betrug 150 µm, womit die Schnitte mechanisch stabil genug und unter dem Mikroskop ausreichend lichtdurchlässig waren. Die beim Slicen mit dem Vibratom entstandenen Schnitte wurden mit einer Glaspipette in ein mit begaster Ringerlösung gefülltes Becherglas gegeben und dieses 30 Minuten lang im Wasserbad (Colora Kryothermostat WK5, Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Deutschland) bei 37° C inkubiert. Danach konnten sie in begaster Lösung bis zu zehn Stunden bei Temperatur (ca. 21-25° C) aufbewahrt werden. Eine mit Standard-Lösung gefüllte Pasteur-Pipette diente dem Transport der Schnittpräparate in die Experimentierkammer.

2.4 Die patch-clamp Technik

Alle Experimente in dieser Arbeit beruhen auf der *patch-clamp* Technik (Hamill et al., 1981), die von Neher und Sakmann 1976 zuerst beschrieben wurde. Ihnen gelang es, mit Hilfe von Elektroden, die sich in speziell hergestellten Pipetten befanden, einen Abdichtwiderstand zur Zellmembran im Gigaohmbereich zu erzielen und mit einer entsprechenden Verstärkertechnik Ströme im pA-Bereich darzustellen.

Ein Teil der Experimente wurde im *voltage-clamp* Modus, der Spannungsklemme, durchgeführt, dessen Grundlagen von Huxley, Hodgkin und Katz beschrieben wurden (Hodgkin & Huxley, 1952 a-d; Hodgkin et al., 1952).

Als Vereinfachung der *voltage-clamp* Methode kann man die Zellmembran als elektrischen Schaltkreis annehmen, bei dem die Doppellipidschicht als Kondensator, der Ionenkanal als Widerstand und das Membranpotenzial als Spannungsquelle betrachtet wird. Aus dem elektrischen Widerstand der Pore kann man über eine Wheaton'sche Brückenschaltung mit der Messelektrode deren Leitfähigkeit berechnen. Die Membran kann man somit als RC-Glied vereinfacht darstellen. Während des *voltage-clamp* Modus wird das Potenzial über der Membran durch den Rückkoppelungsmechanismus des *patch-clamp* Verstärkers bei einem innerhalb von Grenzen beliebig einstellbaren Potenzial konstant gehalten und der über die Zellmembran fließende Ausgleichsstrom mit dem Verstärker gemessen. Dieser Ausgleichsstrom besteht aus dem Strom durch die Ionenkanäle und dem Leckstrom, der über den Abdichtwiderstand fließt. Einen Gigaseal erreicht man, indem ein Unterdruck an die Pipette angelegt wird, durch den der Abdichtwiderstand sprunghaft auf bis zu 100 G Ω ansteigt (*cell attached* Konfiguration) und der Membranfleck unter der Pipette von dem Rest der Zellmembran nahezu komplett elektrisch isoliert ist.

Durch von dem eingestellten Potenzial ausgehende depolarisierende Potenzialsprünge können spannungsabhängige Ionenkanäle aktiviert werden, woraufhin sich die Leitfähigkeiten für bestimmte Ionen ändern. Im *current-clamp* Modus wird ein Membranpotenzial aufgezeichnet, nachdem mittels der Elektrode Strom in die Zelle appliziert wird. Entgegen dem *voltage-clamp* Modus, in dem das Membranpotenzial von dem Untersucher vorgegeben wird, kann es im *current-clamp* Modus variieren und der Verstärker zeichnet auf, was die Zelle selbst generiert oder nach Stimulation auftritt. Mit Hilfe des *current-clamp* Modus kann die Reaktion einer Zelle auf Ströme untersucht werden, die ein Aktionspotenzial auslösen kann.


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer patch-clamp Anordnung (nach Gruß 1998)

Mit der *patch-clamp* Technik können vier verschiedenen Sealkonfigurationen gemessen werden. Für die Experimente wurde die *whole-cell* Konfiguration verwendet. Bei dieser wird nach Erreichen des Gigaseals in der *cell-attached* Konfiguration mit Hilfe eines Unterdrucks auf die Pipette die Zellmembran angesogen. Diese reißt an dieser Stelle durch und somit ist ein elektrischer Zugriff auf die ganze Zelle möglich.



Abbildung 3: Spinalganglienneuron mit patch-Pipette, Messbalken entspricht 10 μ m (eigenes Beispiel)

2.5 Versuchsstand

2.5.1 Experimentierkammer

Die Experimentierkammer (Werkstatt, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen) besteht aus einer 2 mm dicken, im Durchmesser 30 mm großen Delrinscheibe (Krüger, Hamburg), in die in der Mitte ein Loch mit einem Durchmesser von 8 mm gefräst ist. Das Volumen der Kammer beträgt etwa 1,5 ml. Der Boden wird aus einem mit Silikonkleber festgeklebten Deckgläschen gebildet (Abb. 3).

In das Innere der Kammer mündet eine Zuleitung (Werkstatt, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen), die aus einer speziell gebogenen Kanüle aus inertem Material mit einem Innendurchmeser von 0,8 mm besteht. Von drei verschiedenen Perfusorspritzen (50 ml), die sich in einer Halterung im oberen Teil des Versuchsstandes befinden, erhält die Zuleitungskanüle über einen Verteiler (Werkstatt, Physiologisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen), die jeweilige Testlösung. Die Absaugung der Außenlösung aus der Experimentierkammer erfolgt ebenfalls über eine speziell gebogene Metallkanüle mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm (Werkstatt, Physiologisches Institut, Gießen), die durch einen Teflonschlauch mit einer einen Unterdruck erzeugenden Pumpe (Wisa, Wuppertal) verbunden ist. Die Zulaufgeschwindigkeit beträgt etwa 3,5 ml pro Minute, die Ablaufgeschwindigkeit liegt geringgradig höher, damit im Abflussschlauch Luftblasen auftreten, die eine Antennenwirkung und somit elektrische Störungen in der Kammer verhindern sollen. Der Schnitt wird mit Hilfe eines Grids, das einem mit ca. vier bis fünf Einzelsträngen eines Zahnseidefadens bespannten Platinrahmens entspricht, am Boden der Experimentierkammer fixiert.



Abbildung 4: Die Objektkammer in Aufsicht und Querschnitt. Das Schnittpräparat befand sich in der Kammer und wurde von einem mit Zahnseidefäden bespannten Gitter (grid) aus Platindraht am Boden der Kammer gehalten. In dieser Kammer wurden alle patch-clamp Experimente durchgeführt. Modifiziert nach Gruß, 1998.

2.5.2 Pipetten

Die Pipetten wurden aus Borosilikatglas (GC150F-7,5, mit Filament, Clark Medical Instruments, Pangbourne, England) hergestellt, da es wegen seiner geringen Leitfähigkeit und seiner günstigen kapazitiven Eigenschaften sehr gut für *patch-clamp* Registrierungen geeignet ist. Die Rohpipetten wurden aus Kapillaren von 75 mm Länge (Außendurchmesser 1,5 mm, Innendurchmesser 0,86 mm) hergestellt, wobei mit Hilfe eines Horizontalziehers (Modell P97, Instrument Co., Sutter, USA) in mehreren Stufen gezogen wurde (*pulling*).

Diese wurden unmittelbar vor der Verwendung "feuerpoliert" unter mikroskopischer Kontrolle mittels eines von Strom durchflossenen Platindrahtes (0,127 mm, Johnson Matthey GmbH,

Karlsruhe, Deutschland), der von einer Glaskugel eingeschlossen war. Die so erhaltenen Pipetten hatten einen Eingangswiderstand von 3-4 M Ω , gemessen in der Badlösung (CO₂-Kontrolllösung) Anschließend wurden die Pipetten von der Rückseite durch 2 ml oder 5 ml Spritzen mit aufgesetzten Filtern (0,2 µm, Renner, Dannestadt, Deutschland) und speziellen nicht metallisierenden Nadeln (Microfil, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) mit der Innenlösung (Kap. 2.3.1) befüllt.

Dabei wurde die Pipette nur so weit gefüllt, dass der Elektrodendraht etwa 3-4 mm tief in die Lösung eintaucht, wodurch das Hintergrundrauschen und der Offset-Spannungsfehler verringert wurden.

Als Pipettenelektrode und als Badelektrode dienten Silberdrähte (0,5 mm, Johnson Matthey GmbH, Karlsruhe, Deutschland), die regelmäßig in 1 molarer KCl- Lösung chloriert wurden.

2.5.3 Manipulator, Pipettenhalter und Mikroskop

Der Pipettenhalter bestand aus Kunststoffen mit relativ hoher Dielektrizitätskonstante, um das Rauschen möglichst gering zu halten. Das hydrophobe Oberflächenmaterial (Delrin, Krüger, Hamburg, Deutschland) sollte die einzelnen Anteile vor einem Wasserfilm schützen. Dieser Halter wurde auf einem dreiachsigen Mikromanipulator (ZSS 32-200-1.2, Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) in einem Winkel von 30-50° gegen die Horizontale, montiert. Gesteuert wurde der Mikromanipulator mit einer Handsteuerung (3-Achs-Joystick).

Das Mikroskop, ein aufrechtes Immersionsmikroskop (Axioskop FS, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer Vergrößerung bis zu 400-fach war auf einem schwingungsgedämpften Tischgestell (T250, Physik Instruments, Waldbrunn, Deutschland) montiert. Die Objektive sind vom Mikroskop elektrisch isoliert, um Störungen bei der Signalableitung des Ionenflusses zu vermeiden. Mit Hilfe einer Videokamera (WV-BP500, Panasonic Deutschland GmbH, Deutschland), die das Bild auf einen Bildschirm (WV-5410N, Panasonic Deutschland GmbH, Deutschland) übertrug, konnte die Zelle während des gesamten Experiments weiter beobachtet werden.

2.5.4 Verstärker

Als *patch-clamp* Verstärker diente ein Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, USA) mit einem Verstärkungsbereich von 0,5-500 mV/pA. Mit diesem Verstärker können Ströme bis zu 20 nA gemessen werden und Potenziale von –200 bis +200 mV können an die Zellmembran gelegt werden. Die Daten wurden vom Rechner über den Digital-Analog Wandler (Digidat 1200A, Axon

Instruments, Foster City, USA) via Axopatch zur Headstage (CV201 AU, Axon Instruments, Foster City, USA) in die Pipette übermittelt. Zuerst wurde mittels kleiner Impulse der Pipettenwiderstand ermittelt. Die bei *whole-cell* Ableitungen durch die Reizimpulse entstehenden relativ großen kapazitiven Ströme konnten in zwei Zeitbereichen direkt elektronisch kompensiert werden. Die Signale wurden durch den eingebauten Tiefpass-Filter des Axopatch 200A (-3 dB, 4-Pol Bessel) und eine weitere Tiefpass-Filtereinheit mit Filterfrequenzen von 0,5-20 kHz (-3dB, 10-Pol Bessel, Werkstatt Physiologisches Institut, Giessen, Chip: Maxim Integrated Products, USA) gefiltert.

2.5.5 Aufzeichnungs-, Auswertungs- und Darstellungsverfahren

Die experimentellen Rohdaten wurden mittels eines AD/DA-Wandlers (Digidat 1200A, Axon Instruments, Foster City, USA) und der Aufzeichnungssoftware (Clampex 9, Axon Instruments, Foster City, USA) auf dem Computer aufgezeichnet und gespeichert. Danach konnten sie graphisch dargestellt und ausgewertet werden.

Mit dem Programm Clampfit (9, Axon Instruments, Foster City, USA) erfolgte die Ausmessung der Stromamplituden und die Kurvenanpassung.

Ein Teil der Kurvenanpassung, die statistische Auswertung und die graphische Darstellung wurden mit Origin (Version 7, Microcal Software Inc., Northampton, USA) durchgeführt. Die schematischen Abbildungen wurden mit Corel Draw (Version 8, Corel, Ottawa, Kanada) erstellt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben. Wenn die Fehlerbalken kleiner waren als die Symbolgröße, wurden diese im Graphen weggelassen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten Students t-Test. Das Signifikanzniveau beträgt 0,05.

Alle Potenziale in den Experimenten sind als tatsächliche transmembranäre Potenziale angegeben. In den *voltage-clamp* Experimenten wurde zur Bestimmung des unspezifischen Leckstroms und zur Korrektur der verbliebenen kapazitiven Artefakte 10 Potenzialsprünge in hyperpolarisierende Richtung durchgeführt und die so erhaltenen passiven Membranantworten wurden gemittelt mit einem Korrekturfaktor zu den Originalregistrierungen addiert. Die Originalregistrierungen in den Abbildungen sind mit dieser Korrektur dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Neuronen mit Hilfe der patch-clamp Technik

In dieser Arbeit wurde anhand von 107 kleinen oberflächlich gelegenen Neuronen aus Hinterwurzelganglien mit Hilfe der *patch-clamp* Technik an Dünnschichtpräparaten der akute Effekt von Antikörpern verschiedener Polyneuropathien auf Ionenkanäle untersucht. Hierbei wurde aus Patientenserum bzw. Plasmapherat aufgereinigtes IgG einer definierten Konzentration für jeweils drei Minuten mit einer Flussrate von 3,0 ml/min über die sich in der Objektkammer befindlichen Schnittpräparate geleitet, so dass der Inhalt der Objektkammer mehrfach ausgetauscht wurde. Zur Kontrolle der Untersuchung diente IgG, das aus dem Serum von gesunden Probanden isoliert wurde. Im *voltage-clamp* Modus wurden die Gesamteinwärts- und Auswärtsströme gemessen, in der *current-clamp* Einstellung wurden Ruhepotenziale, Schwellen und Dauer von Aktionspotenzialen sowie bei repetitiv feuernden Neuronen die Feuerfrequenz betrachtet. Hierbei wurden alle Aktionspotenziale gewertet, deren Spitze größer als 0 mV waren.

3.2 Ergebnisse der gesunden Probanden

Für diese negative Kontrollgruppe wurde das Serum von neurologisch phänotypisch unauffälligen menschlichen Individuen (davon 2 männliche und 4 weibliche) verwendet. Die Aufreinigung des Serums erfolgte mit Hilfe einer Protein G-Säule wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Die Abbildung 5 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs einer Probandin der Kontrollgruppe. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis + 70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet. Anschließend wurde jeweils ein Korrekturfile durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.5) und von den Strömen subtrahiert. Abgebildet sind die korrigierten Registrierungen. Die negativ dargestellten Ströme sind einwärts gerichtete Ströme, also zu einem großen Teil Natrium- und eventuell Kalziumströme. In dieser Studie werden die Gesamtströme betrachtet. Die Auswertung der Strom/Spannungskurven erfolgt jedoch getrennt für Einwärts- und Auswärtsströme. Bei einem gesunden Probanden erwarten wir keine antikörpervermittelte Alteration der Ströme an den Spinalganglienneuronen.



Abbildung 5: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1g/l von einer gesunden Probandin für drei Minuten superfundiert wurden. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial E= - 80 mV.

In Abbildung 6 sind die Strom-Spannungskurven (I/U-Beziehung) der gesamten gemittelten Auswärtsströme (links), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Peakeinwärtsströme (rechts), die Natriumströme und Kalziumströme darstellen, abgebildet. Diese werden aus Registrierungen im voltage-clamp Modus generiert. Bei den Auswärtsströmen wird der Durchschnittswert der Stromamplitude zwischen 180 und 200 ms normiert zur maximalen Stromamplitude bei einem Potenzial von E = +70 mV und in Beziehung zum Testpotenzial gesetzt. Bei den Einwärtsströmen werden die Peakströme gemittelt und zum maximalen Wert der Stromamplitude (E = 10 mV) normiert und in Beziehung zum Testpotenzial gebracht.



Abbildung 6: A.B. I/V-Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnittswert bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment für die Auswärtsströme und 10 mV für Einwärtsströme.

Bei den gesunden Probanden konnte, wie erwartet, weder eine signifikante Veränderung der Auswärtsströme (Kontroll-HEPES 6481 ± 676 pA; Kontroll-HEPES und IgG 6268 ± 571 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 6187 ± 629 pA) noch der Einwärtsströme vor oder nach IgG-Einwasch gefunden werden (Kontroll-HEPES -4157 ± 432 pA; Kontroll-HEPES und IgG -3886 ± 460 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -3518 ± 463 pA).

Die Abbildung 7 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs einer Probandin der Kontrollgruppe. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der 0 mV Grenze.



Abbildung 7: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einer gesunden Probandin für drei Minuten superfundiert wurde. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E = 0 mV am Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial 51,8 mV Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Aus den Originalregistrierungen im c*urrent-clamp* Modus werden die durchschnittllichen Werte berechnet und in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Grafik links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein vollständiges Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Grafik in der Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (Grafik rechts). Es sind jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Das Ruhepotenzial, die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen und die Aktionspotenzialdauer waren ebenfalls wie erwartet vor und nach IgG-Applikation nicht signifikant verändert (p<0,05). Das Ruhepotezial betrug in Kontroll-HEPES -52,4 \pm 2,1 mV, in Kontroll-HEPES und IgG -51,8 \pm 1,6 mV und im Auswasch mit Kontroll-HEPES -52,2 \pm 1,9 mV. Die Schwelle zum Auslösen von Aktionspotenzialen betrug in Kontroll-HEPES 0,23 \pm 0,04 nA, in Kontroll-HEPES und IgG 0,22 \pm 0,03 nA und im Auswasch mit Kontroll-HEPES 0,21 \pm 0,03 nA. Die Dauer des Aktionspotenzials wurde ebenfalls nicht signifikant verändert von 4,7 \pm 0,29 ms in Kontroll-HEPES auf 4,4 \pm 0,29 ms in Kontroll-HEPES mit IgG und 4,5 \pm 0,30 ms im Auswasch mit Kontroll-HEPES.

3.3 Positive Kontrollgruppen

3.3.1 Lambert-Eaton Syndrom (LEMS)

Nachdem durch Antikörper humaner gesunder Probanden keine signifikanten und relevanten Veränderungen der gemessenen Parameter auffielen, wurde mit einer Positivkontrolle getestet, ob überhaupt durch Antikörper akute und komplementunabhängige Veränderungen der neuronalen Ionenflüsse innerhalb von drei Minuten ausgelöst werden konnten. So wurde aus dem Plasmapherat eines Patienten mit LEMS und nachgewiesenen Kalziumkanal-Antikörpern vom PQ-Typ die IgG-Fraktion isoliert und getestet. In einer Konzentration von 1,5 g/l und einer Geschwindigkeit von 3 ml/min wurde die Immunglobulinfraktion über die Spinalganglienschnitte geleitet. Die Abbildung 9 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit einem Lambert-Eaton-Syndrom. Ausgehend von einem Haltepotenzial von - 80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis + 70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.

3.3 Positive Kontrollgruppen



Abbildung 9: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1,5 g/l von einem Patienten mit LEMS für drei Minuten superfundiert wurden. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial E = -80 mV.

In Abbildung 10 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die größtenteils Natriumströme und Kalziumströme darstellen, abgebildet. Diese werden aus Registrierungen im *voltage-clamp* Modus generiert. Bei den Auswärtsströmen wird der Durchschnittswert der Stromamplitude zwischen 180 und 200 ms normiert zur maximalen Stromamplitude (E = +70 mV) und in Beziehung zum Potenzial gesetzt. Bei den Einwärtsströmen werden die Peakströme gemittelt und zum maximalen Wert der Stromamplitude (E = 10 mV) normiert und in Beziehung zum Potenzial gebracht.



Abbildung 10: A.B. I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen zum jeweiligen Potenzial. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial E = -80 mV. IgG von einem männlichen Patienten mit LEMS wurde verwendet.

A. Bei Patienten mit Lambert-Eaton-Syndrom, die Antikörper gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle vom P/Q-Typ aufweisen, konnte bei den Stromamplituden der Einwärtsströme eine signifikante (p<0,05) reversible Erniedrigung bei 10 mV (Kontroll-HEPES - 4186 ± 377 pA; IgG(LEMS) + Kontroll-HEPES -3124 ± 432 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -4034 ± 432 pA) gezeigt werden. Dies ist als Hinweis auf eine Kalziumkanalblockade zu werten.

B. Bei den Stromamplituden der Auswärtsströme konnte bei 40 mV keine signifikante Veränderung gemessen werden. (In Kontroll-HEPES 7589 \pm 1248 pA, in IgG(LEMS) + Kontroll-HEPES 9593 \pm 2527 pA und im Auswasch mit Kontroll-HEPES 7627 \pm 1342 pA).

Die Abbildung 11 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit LEMS. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle .



Abbildung 11: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1,5 g/l von einem Patienten mit LEMS für drei Minuten superfundiert wurden. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0mV am Aktionspotenzial am zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -52,4 mV. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

An den hier abgebildeten Originalregistrierungen lassen sich keine Unterschiede hinsichtlich der Aktionspotenzialdauer in den verschiedenen Experimenten nachweisen. Auch wenn man die Mittelwerte aus den gesamten Experimenten betrachtet, die in Abbildung 12 dargestellt sind, lassen sich keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Parameter finden.



Abbildung 12: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E = 0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Graph links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein vollständiges Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Graph Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Ausllösung eines Aktionspotenzials im currentclamp Modus gemessen (Graph rechts). Mittelwert \pm Standardfehler.

Trotz der signifikanten Verminderung der Einwärtsströme unter IgG-Applikation waren das Ruhepotenzial, die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen und die Aktionspotenzialdauer und -amplitude vor und nach IgG-Applikation nicht signifikant verändert. Das Ruhepotenzial verminderte sich von -50.8 ± 1.4 mV in Kontroll-HEPES auf -59.1 ± 3.7 mV in IgG auf $-52,6 \pm 1,6$ mV im Auswasch mit Kontroll-HEPES, die Aktionspotenzialschwelle betrug in Kontroll-HEPES 0.39 ± 0.06 nA, in IgG+HEPES 0.39 ± 0.07 nA und im Auswasch mit Kontroll-HEPES $0,40 \pm 0,06$ nA. Die Aktionspotanzialdauer wurde in IgG von $5,3 \pm 0,9$ auf $4,4 \pm 1,1$ ms reduziert und stieg im Auswasch mit Kontroll-HEPES auf $4,7 \pm 0,8$ ms an. Die Amplitude des Aktionspotenzials betrug in Kontroll-HEPES 55.0 ± 5.4 mV. in Kontroll-HEPES+IgG.54,0 \pm 3,9 mV und im Auswasch 51,5 \pm 3,5 mV (ohne Abbildung).

Außerdem wurde als Kontrolle das IgG von Patienten mit Lambert-Eaton Syndrom in einer Konzentration von 0,5 g/l verwendet. Hier ist paradoxerweise nach IgG-Applikation bereits in den Originalregistrierungen eine Verminderung der Auswärtsströme zu beobachten.



Abbildung 13: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG-Antikörpern der Konzentration 0,5 g/l eines Patienten mit LEMS für drei Minuten superfundiert wurde. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial E = -80 mV.

In Abbildung 14 sind die Strom-Spannungskurven analog zu den Untersuchungen in einer Konzentration mit 0,5 g/l dargestellt. Hier lässt sich eine signifikante partiell reversible Reduktion sowohl der Auswärtsströme als auch der Einwärtsströme erkennen.



Abbildung 14: A.B. I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial – 80 mV. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, p<0,05.

A. Analog zu den Experimenten mit IgG von Patienten mit LEMS und einer Konzentration von 1,5 g/l kann auch in einer deutlich geringeren Konzentration, nämlich 0,5 g/l bei den Einwärtsströmen bei 0 mV (Kontroll-HEPES -3506 ± 1467 pA; IgG(LEMS)+Kontroll-HEPES -2471 ± 1139 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -2950 ± 1382 pA) eine signifikante Erniedrigung gezeigt werden (p<0,05).

B. Zusätzlich dazu konnte auch bei den Auswärtsströmen bei 40 mV (Kontroll-HEPES 5338 ± 1314 pA; IgG(LEMS)+Kontroll-HEPES 4211 ± 1052 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 5055 ± 1311 pA) eine partiell reversible signifikante Reduktion nachgewiesen werden (p<0,05).

Die Abbildung 15 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit LEMS. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bei einem 40 ms dauernden Reiz.



Abbildung 15: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 0,5 g/l von einem Patienten mit LEMS für drei Minuten superfundiert wurden. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E = 0 mV am Aktionspotenzial bei dem 2. Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -40,7 mV. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Die Aktionspotenzialdauer, die Aktionspotenzialschwelle und die Höhe des Ruhepotenzials werden im *current-clamp* Modus gemessen und in Abbildung 16 visualisiert.



Abbildung 16: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E = 0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Graph links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Graph Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im currentclamp Modus gemessen (Graph rechts). Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes.

Das Ruhepotenzial verminderte sich nicht signifikant (Kontroll-HEPES $-49,3 \pm 2,3$ mV, IgG(LEMS)+Kontroll-HEPES $-43,0 \pm 4,0$ mV, Auswasch mit Kontroll-HEPES $-49 \pm 2,9$ mV) (p<0,05); die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen (Kontroll-HEPES 0.2 ± 0.04 nA, IgG(LEMS)+Kontroll-HEPES 0.2 ± 0.04 nA, Auswasch mit Kontroll-HEPES 0.19 ± 0.03 nA) und die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES $6,6 \pm 0.9$ ms, IgG(LEMS)+Kontroll-HEPES $8,7 \pm 1,8$ ms, Auswasch mit Kontroll-HEPES $6,6 \pm 1,2$ ms) waren vor und nach Applikation des LEMS IgG mit einer Konzentration von 0,5 g/l trotz signifikanter Verminderung der Einwärtsströme und Auswärtsströme nicht signifikant verändert. Die Amplitude des Aktionspotenzials allerdings verringerte sich reversibel und signifikant (Kontroll-HEPES $53,0 \pm 4,0$ mV, Kontroll-HEPES+IgG $43,3 \pm 2,5$ mV und im Auswasch $53,0 \pm 3,3$ mV; keine Abbildung; p<0,05).

Interessant ist, dass sich unter den untersuchten Neuronen einige befanden, die in der Lage waren, bei einem 1000 ms langen Reiz repetitiv Aktionspotenziale zu bilden. Abbildung 17 zeigt die Aktionspotenziale eines solchen Neurons.



Abbildung 17: Impulsprotokoll und current-clamp Originalregistrierungen, die durch eine Depolarisation von 1000 ms in Kontroll-HEPES, IgG(LEMS)+Kontroll-HEPES sowie im Auswasch in Kontroll-HEPES ausgelöst wurden mit einer Konzentration von 0,5 g/l (Graph links). Ruhepotenzial -42,5 mV. Gemittelte Anzahl der Aktionspotenziale und Standardfehler des Mittelwertes über alle Experimente (n=2), in denen mehrere Aktionspotenziale ausgelöst werden konnten (Graph rechts).

Nach Applikation von IgG eines Patienen mit LEMS in einer Konzentration von 0,5 g/l konnte eine reversible Erniedrigung der Feuerfrequenz gezeigt werden. Die Anzahl der Aktionspotenziale wurde in der ersten Registrierung oberhalb der Schwelle bestimmt.

3.3.2 Anti-Kaliumkanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis

Eine weitere Positivkontrolle wurde mit dem Plasmapherat von Patienten mit Antikörpern gegen Kaliumkanäle verwendet. Das Plasmapherat spannungsabhängige wurde vor der Immunglobulinisolation an der Protein G-Säule im Verhältnis 1:3 mit Glycinpuffer verdünnt, wie in Kap. 2.2 beschrieben aufgereinigt und gegen PBS-Puffer und HEPES-Puffer dialysiert. In einer Konzentration von 1 g/l und einer Geschwindigkeit von 3 ml/min wurde die Immunglobulinfraktion über die Spinalganglienschnitte geleitet. Abbildung 18 ist ein typisches Beispiel für voltage-clamp Registrierungen einer Spinalganglienzelle vor, während und nach Applikation des IgGs eines Patienten mit Anti-Kalium-Kanal-Antikörpern. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis +70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.



Abbildung 18: Impulsprotokoll und voltage-clamp Original-Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einer Patientin mit anti-Kaliumkanal-Antikörpern für drei Minuten superfundiert wurden. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial E= -80 mV.

In Abbildung 19 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die größtenteils Natriumströme darstellen, abgebildet.



Abbildung 19: A.B. I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial -80 mV. Mittelwert ± Standardfehler. IgG von einer Patientin mit anti-Kaliumkanal-Antikörpern wurde verwendet.

A. Bei der Patientin mit Anti-Kaliumkanal-Antikörpern konnten weder bei den Auswärtsströmen bei 40 mV (Kontroll-HEPES 6405 ± 1 pA; $IgG(K_v)$ +Kontroll-HEPES 6202 ± 1285 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 5381 ± 1631 pA) noch bei den

B. Einwärtsströmen bei 10 mV (Kontroll-HEPES -4473 ± 1414 pA; IgG(K_v)+Kontroll-HEPES -4231 ± 1252 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -3204 ± 953 pA) eine signifikante Veränderung an den Hinterwurzelganglienneuronen gemessen werden (n=4 Zellen).

Die Abbildung 20 zeigt ein typisches Beispiel für current-*clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit Anti-Kaliumkanal-Antikörpern. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial am zweiten Impuls oberhalb der Schwelle.



Abbildung 20: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einem Patienten mit anti-Kaliumkanal-Antikörpern für drei Minuten superfundiert wurden. Die Aktionspotenzialdauer wurde im currentclamp Modus bei E=0 mV am Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -56,3 mV. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Die Aktionspotenzialdauer, die Aktionspotenzialschwelle und die Höhe des Ruhepotenzials werden im *current-clamp* Modus gemessen und sind in Abbildung 21 dargestellt.



Abbildung 21: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Abbildung links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Abbildung Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (Abbildung rechts). Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes.

Das Ruhepotenzial war in Kontroll-HEPES mit $-54,9 \pm 1,3$ mV, in IgG(K_v)+Kontroll-HEPES mit $-55,5 \pm 0,9$ mV und im Auswasch mit Kontroll-HEPES mit $-50,5 \pm 5,9$ mV nicht signifikant verändert worden. Die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen betrug in Kontroll-HEPES $0,4 \pm 0,1$ nA, in IgG(K_v)+Kontroll-HEPES $0,53 \pm 0,17$ nA und im Auswasch mit Kontroll-HEPES $0,3 \pm 0$ nA. Die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES $5,66 \pm 0,56$ ms, in IgG(K_v)+Kontroll-HEPES $4,81 \pm 0,19$ ms und im Auswasch mit Kontroll-HEPES $4,77 \pm 0,15$ ms) war vor und nach IgG-Applikation ebenfalls nicht signifikant verändert. Auch die Amplitude der Aktionspotenziale war nicht signifikant alteriert (Kontroll-HEPES $49,7 \pm 4,6$ mV, Kontroll-HEPES+IgG $50,9 \pm 0,05$ mV, Auswasch $51,7 \pm 0,8$ mV; ohne Abbildung).

3.4 Guillain-Barré-Syndrom

3.4.1 Guillain-Barré-Syndrom mit rein motorischer Komponente

Für diese Experimente wurde das Plasmapherat eines Patienten, der nur eine motorische Beteiligung im Laufe ihrer Erkrankung aufwies, in einer Konzentration von 2g/l und einer Geschwindigkeit von 3 ml/min über die Schnitte in der Objektkammer geleitet. Abbildung 21 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen einer Spinalganglienzelle vor, während und nach Applikation des IgGs eines Patienten mit einem rein motorischen Guillain-Barré-Syndrom. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis +70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.



Abbildung 22: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 2 g/l eines Patienten mit motorischem GBS für drei Minuten superfundiert wurden. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial E = -80 mV.

In Abbildung 23 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die Natrium- und Kalziumströme darstellen, abgebildet.



Abbildung 23: I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial -80 mV. Mittelwert ± Standardfehler. IgG von einem männlichen Patienten mit motorischem GBS wurde verwendet.

Bei Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom mit nur motorischer Beteiligung zeigten weder die Auswärtsströme bei 40 mV (Kontroll-HEPES 4729 ± 753 pA; IgG(GBS_m)+Kontroll-HEPES 4841 ± 901 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 4776 ± 856 pA) noch die Einwärtsströme bei 0 mV (Kontroll-HEPES -3456 ± 7212 pA; IgG(GBS_m)+Kontroll-HEPES -3092 ± 730 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -3009 ± 752 pA) eine signifikante Veränderung.

Die Abbildung 24 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit motorischem GBS. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial am zweiten Impuls oberhalb der Schwelle.



Abbildung 24: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einem Patienten mit motorischem GBS für drei Minuten superfundiert wurden. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -61,2 mV Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Aus den Aufzeichnungen im *current-clamp* Modus wurden die Aktionspotenzialdauer, die Aktionspotenzialschwelle und die Höhe des Ruhepotenzials bestimmt und gemittelt in den folgenden Diagrammen dargestellt.



Abbildung 25: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Mitte). Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (rechts). Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Das Ruhepotenzial (Kontroll-HEPES $-52,6 \pm 2,2 \text{ mV}$; IgG(GBS_m)+Kontroll-HEPES $-50,7 \pm 2,3 \text{ mV}$; Auswasch mit Kontroll-HEPES $-52,0 \pm 2,2 \text{ mV}$), die Aktionspotenzialschwelle (Kontroll-HEPES $0,14 \pm 0,1 \text{ nA}$; IgG(GBS_m)+Kontroll-HEPES $0,1 \pm 0,0 \text{ nA}$; Auswasch mit Kontroll-HEPES $0,1 \pm 0,0 \text{ nA}$) und die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES $4,9 \pm 0,3 \text{ ms}$; IgG(GBS_m)+Kontroll-HEPES $4,9 \pm 0,2 \text{ ms}$; Auswasch mit Kontroll-HEPES $4,8\pm0,3 \text{ ms}$) waren vor und nach IgG-Applikation nicht signifikant verändert. Auch die Aktionspotenzialamplitude war vor und nach Einwasch der Immunglobulinfraktionen nicht signifikant verändert (Kontroll-HEPES $57,6 \pm 6,2 \text{ mV}$, IgG+HEPES $58,7 \pm 6,4 \text{ mV}$, Auswasch $58,8 \pm 3,8 \text{ mV}$ (nicht abgebildet).

3.4.2 Guillain-Barré-Syndrom mit sensomotorischer Komponente

Für diese Experimente wurden die IgG-Fraktionen von vier Patienten, die eine sensible Beteiligung in Form von Schmerzen im Laufe ihrer Erkrankung hatten, in einer Konzentration von 1 g/l und einer Geschwindigkeit von 3 ml/min über die Schnitte in der Objektkammer geleitet. Abbildung 26 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen einer Spinalganglienzelle vor, während und nach Applikation des IgGs eines Patienten mit einem sensomotorischen Guillain-Barré-Syndrom. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis +70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.



Abbildung 26: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1g/l eines Patienten mit sensomotorischer Beteiligung bei Guillain-Barré Syndrom für drei Minuten superfundiert wurden.

In Abbildung 27 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die Natrium- und Kalziumströme darstellen, abgebildet. Diese werden aus Registrierungen im voltage-clamp Modus generiert. Bei den Auswärtsströmen wird der Durchschnittswert der Stromamplitude zwischen 180 und 200 ms normiert zur maximalen Stromamplitude (E=+70 mV) und in Beziehung zum Potenzial gesetzt. Bei den Einwärtsströmen werden die Peakströme gemittelt und zum maximalen Wert der Stromamplitude (E=10 mV) normiert und in Beziehung zum Potenzial gebracht.



Abbildung 27: I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial -80 mV. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, p<0,05. IgG von zwei Patienten und einer Patientin mit einem sensorischen GBS wurden verwendet.

Bei Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom mit sensibler Beteiligung zeigten die Auswärtsströme bei 40 mV (Kontroll-HEPES 6334 ± 580 pA; IgG(GBS_s)+Kontroll-HEPES 6241 ± 589 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 5888 ± 578 pA) eine nicht signifikante Verminderung und die Einwärtsströme eine signifikante (p<0,05) Verminderung bei 0 mV (Kontroll-HEPES -4202 ± 323 pA; IgG(GBS_s) +Kontroll-HEPES -4248 ± 340 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -3896 ± 327 pA) jeweils nach IgG Auswasch. Dies kann eine Verminderung der Natriumströme darstellen.

Die Abbildung 28 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit sensiblem GBS. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle.



Abbildung 28: Impulsprotokoll und current-clamp Originalregistrierungen von Aktionspotenzialen bei einem 40 ms dauernden Reiz in Kontroll-HEPES Lösung, GBS sensomotorisch IgG+HEPES sowie im Auswasch. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -40,6 mV. Temperatur 23°C.

Die aus den Originalregistrierungen im *current-clamp* Modus ermittelte Aktionspotenzialdauer, die Aktionspotenzialschwelle und die Höhe des Ruhepotenzials sind in Abbildung 28 dargestellt.



Abbildung 29: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde. (Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (rechts). Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Das Ruhepotenzial war nicht signifikant verändert (Kontroll-HEPES -53,4 \pm 2,1 mV, IgG(GBS_s) +Kontroll-HEPES -52,8 \pm 2,0 mV und im Auswasch mit Kontroll-HEPES -53,3 \pm 2,2 mV). Die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen (Kontroll-HEPES 0,29 \pm 0,05 nA, IgG(GBS_s) +Kontroll-HEPES 0,30 \pm 0,0 nA, Auswasch mit Kontroll-HEPES 0,28 \pm 0,04 nA) war signifikant (p < 0,05) und reversibel erhöht und die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES 5,28 \pm 0,43 ms, IgG(GBS_s)+Kontroll-HEPES 4,29 \pm 0,29 ms, Auswasch mit Kontroll-HEPES 4,60 \pm 0,35 ms) war signifikant (p < 0,05) erniedrigt. Die Amplitude des Aktionspotenzials war nach Immunglobulin-applikation nicht signifikant verändert (Kontroll-HEPES 53,2 \pm 2,9 mV, IgG+HEPES 52,8 \pm 2,7 mV, Auswasch 51,9 \pm 3,0 mV (nicht abgebildet).

Damit in Einklang steht die in Abbildung 30 dargestellte Reduktion der Feuerfrequenz nach IgG-Einwasch bei 1000 ms langem Reiz. Durch die Erhöhung der Aktionspotenzialschwelle wurden nach IgG-Applikation reversibel weniger Aktionspotenziale gebildet.



Abbildung 30: Impulsprotokoll und Current-clamp Originalregistrierungen, die durch eine Depolarisation von 1000 ms in Kontroll-HEPES, IgG+HEPES sowie im Auswasch ausgelöst wurden (Graph links). Bei einem Patienten mit sensorischer Beteiligung bei GBS konnte bei der Feuerfrequenz unter IgG Einwasch eine signifikanteErniedrigung gezeigt werden. Sie wurde in der zweiten Registrierung oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -48,7 mV. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes; n=2 (Graph rechts).

3.5 Chronische inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie

3.5.1 CIDP mit rein motorischer Komponente

Für diese Experimente wurde die isolierte Immunglobulinfraktion von Patienten, die nur eine motorische Beteiligung im Laufe ihrer Erkrankung hatten, in einer Konzentration von 1 g/l und einer Geschwindigkeit von 3 ml/min über die Schnitte in der Objektkammer geleitet. Abbildung 31 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen einer Spinalganglienzelle vor, während und nach Applikation des IgGs eines Patienten mit einer chronischen inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie, die eine motorische Beteiligung aufwiesen. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis +70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.



Abbildung 31: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen von einem Hinterwurzelganglienneuron, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l eines Patienten mit motorischer CIDP für drei Minuten superfundiert wurden.

In Abbildung 32 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die größtenteils Natriumund Kalziumströme darstellen, abgebildet. Diese werden aus Registrierungen im *voltage-clamp* Modus generiert. Bei den Auswärtsströmen wird der Durchschnittswert der Stromamplitude zwischen 180 und 200 ms normiert zur maximalen Stromamplitude (E=+70 mV) und in Beziehung zum Potenzial gesetzt. Bei den Einwärtsströmen werden die Peakströme gemittelt und zum maximalen Wert der Stromamplitude (E=10 mV) normiert und in Beziehung zum Potenzial gebracht.



Abbildung 32: I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial -80 mV. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. IgG von einem männlichen Patienten mit motorischer CIDP wurde verwendet.

Bei Patienten mit chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie mit nur motorischer Komponente konnte bei IgG Auswasch eine signifikante (p<0,05) Erniedrigung der Auswärtsströme bei 40 mV im Auswasch (Kontroll-HEPES 5660 ± 714 pA, IgG(CIDP_m)+Kontroll-HEPES 5708 ± 732 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 5192 ± 606 pA) gemessen werden. Die Einwärtsströme bei 0 mV (Kontroll-HEPES -4185 ± 394 pA; IgG(CIDP_m)+Kontroll-HEPES -3892 ± 414 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -3607 ± 517 pA) waren nicht signifikant alteriert (p<0,05).

Die Abbildung 33 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit motorischer CIDP. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle.



Abbildung 33: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einem Patienten mit motorischer CIDP für drei Minuten superfundiert wurden. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV bei dem zweiten Impuls am Aktionspotenzial oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -58,3 mV Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Die Durchschnittswerte für die Aktionspotenzialdauer, die Aktionspotenzialschwelle und die Höhe des Ruhepotenzials werden im *current-clamp* Modus gemessen und sind in Abbildung 34 dargestellt.


Abbildung 34: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Graph links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Graph Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (Graph rechts). Es sind der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Das Ruhepotenzial (Kontroll-HEPES-56,5 \pm 2,4 mV; IgG(CIDP_m)+Kontroll-HEPES -56,8 \pm 2,2 mV; Auswasch mit Kontroll-HEPES -55,8 \pm 2,6 mV), die Aktionspotenzialschwelle (Kontroll-HEPES 0,21 \pm 0,05 pA; IgG(CIDP_m)+Kontroll-HEPES 0,22 \pm 0,06 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 0,19 \pm 0,04 pA) und die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES 4,72 \pm 0,51 ms; IgG(CIDP_m)+Kontroll-HEPES 4,76 \pm 0,47 ms; Auswasch mit Kontroll-HEPES 4,58 \pm 0,38 ms) waren nicht signifikant verändert (p<0,05). Auch die Amplitude des Aktionspotenzials war nach IgG-Applikation nicht signifikant verändert (Kontroll-HEPES 50,2 \pm 6,0 mV, Kontroll-HEPES und IgG 51,3 \pm 5,9 mV; Auswasch 51,8 \pm 5,6 mV; keine Abbildung; n=6 Zellen).

3.5.2 CIDP mit sensomotorischer Komponente

Für diese Experimente wurde die isolierte Immunglobulinfraktion von Patienten, die eine sensible Beteiligung in Form von Schmerzen im Laufe ihrer Erkrankung aufwiesen, in einer Konzentration von 1 g/l und einer Geschwindigkeit von 3 ml/min über die Schnitte in der Objektkammer geleitet. Abbildung 35 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen einer Spinalganglienzelle vor, während und nach Applikation des IgGs eines Patienten mit einer chronischen inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie mit sensomotorischer Beteiligung. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis +70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.



Abbildung 35: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l eines Patienten mit sensibler CIDP für drei Minuten superfundiert wurden. Temperatur 23°C.

Bereits in den Originalregistrierungen sieht man nach IgG Einwasch eine Verminderung der Einwärtsströme.

In Abbildung 36 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die größtenteils Natriumströme darstellen, abgebildet. Diese werden aus Registrierungen im *voltage-clamp* Modus generiert. Bei den Auswärtsströmen wird der Durchschnittswert der Stromamplitude zwischen 180 und 200 ms normiert zur maximalen Stromamplitude (E=+70 mV) und in Beziehung zum Potenzial gesetzt. Bei den Einwärtsströmen werden die Peakströme gemittelt und zum maximalen Wert der Stromamplitude (E=10 mV) normiert und in Beziehung zum Potenzial gebracht.



Abbildung 36: A.B. I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial -80 mV. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. IgG einer Patientin mit sensomotorischer CIDP wurde verwendet.

A. Bei Patienten mit sensibler Beteiligung bei chronischer inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie konnte bei den Auswärtsströmen bei 40 mV (Kontroll-HEPES 5304 ± 1059 pA; IgG(CIDP_s)+Kontroll-HEPES 5121 ±1012 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 4876 ± 876 pA) keine signifikante Veränderung gefunden werden.

B. Analog zu den Patienten, die eine sensible Beteiligung bei GBS aufwiesen, findet sich auch bei einer Patientin mit einer sensiblen Beteiligung bei CIDP eine signifikante (p<0,05) Verminderung der Einwärtsströme bei 0 mV (Kontroll-HEPES -5250 \pm 1079 pA; IgG(CIDP_s)+Kontroll-HEPES -4521 \pm 898 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -4535 \pm 1001 pA), die in drei Minuten nicht reversibel ist.

Die Abbildung 37 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit sensibler CIDP. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle.



Abbildung 37: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einem Patienten mit sensibler CIDP für drei Minuten superfundiert wurde. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -57,9 mV. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Die Mittelwerte der Aktionspotenzialdauer, der Aktionspotenzialschwelle und der Höhe des Ruhepotenzials werden im *current-clamp* Modus gemessen und sind in Abbildung 38 dargestellt.



Abbildung 38: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Graph links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Graph Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (Graph rechts). Es sind der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Ruhepotenzial (Kontroll-HEPES $-56,6 \pm 2,1$ mV, IgG(CIDP_s)+Kontroll-HEPES $-53,9 \pm 2,4$ mV, Auswasch mit Kontroll-HEPES -55.9 ± 2.2 mV), die Schwelle zur Auslösung von (Kontroll-HEPES 0.14 ± 0.05 nA, Aktionspotenzialen IgG(CIDP_s)+Kontroll-HEPES 0.12 ± 0.04 nA, Auswasch mit Kontroll-HEPES 0.14 ± 0.04 nA), die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES $3,74 \pm 0,53$ ms, IgG(CIDP_s)+Kontroll-HEPES $3,87 \pm 0,58$ ms, Auswasch mit Kontroll-HEPES $3,86 \pm 0,56$) sowie die Amplitude des Aktionspotenzials (Kontroll-HEPES $52,3 \pm 1,5$ mV; Kontroll-HEPES+IgG $50,4 \pm 1,9$ mV; Auswasch $53,3 \pm 1,4$ mV; ohne Abbildung) waren nicht signifikant verändert.

3.6 Paraneoplastische Polyneuropathie

3.6.1 Paraneoplastische Polyneuropathie mit rein motorischer Komponente

Für diese Experimente wurde das Plasmapherat von Patienten, die lediglich eine motorische Beteiligung im Laufe ihrer Erkrankung aufwiesen, im Verhältnis 1:3 mit Glycinpuffer verdünnt an der Protein-G-Säule aufgereinigt. Nach der Dialyse mit PBS- und HEPES-Puffer wurde die isolierte Immunglobulinfraktion in einer Konzentration von 1 g/l und einer Geschwindigkeit von 3 ml/min über die Schnitte in der Objektkammer geleitet. Abbildung 39 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen einer Spinalganglienzelle vor, während und nach Applikation des IgGs eines Patienten mit einer paraneoplastischen Polyneuropathie mit rein motorischer Beteiligung. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis +70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.



Abbildung 39: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l eines Patienten mit motorischer paraneoplastischer PNP (PNP_m) für drei Minuten superfundiert wurde.

In Abbildung 40 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die größtenteils Natriumund Kalziumströme darstellen, abgebildet. Diese werden aus Registrierungen im *voltage-clamp* Modus generiert. Bei den Auswärtsströmen wird der Durchschnittswert der Stromamplitude zwischen 180 und 200 ms normiert zur maximalen Stromamplitude (E=+70 mV) und in Beziehung zum Potenzial gesetzt. Bei den Einwärtsströmen werden die Peakströme gemittelt und zum maximalen Wert der Stromamplitude (E=10 mV) normiert und in Beziehung zum Potenzial gebracht.



Abbildung 40: A.B. I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial -80 mV. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. IgG von einem Patienten und einer Patientin mit motorischer PNP wurden verwendet.

A.B. Die Auswärtsströme bei 40 mV (Kontroll-HEPES 6178 ± 1071 pA; IgG(PNP_m)+Kontroll-HEPES 5604 ± 980 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 5550 ± 1064 pA) und Einwärtsströme bei 0 mV (Kontroll-HEPES -4974 ± 870 pA; IgG(PNP_m)+Kontroll-HEPES -4931 ± 767 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -4650 ± 821 pA) waren nach IgG-Applikation nicht signifikant verändert.

Die Abbildung 41 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit motorischer PNP. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle.



Abbildung 41: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einem Patienten mit motorischer PNP für drei Minuten superfundiert wurden. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -55,2 mV. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Im *current-clamp* Modus werden die Aktionspotenzialdauer, die Aktionspotenzialschwelle und die Höhe des Ruhepotenzials gemessen und sind in Abbildung 42 aus den Experimenten gemittelt abgebildet.



Abbildung 42: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Graph links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Graph Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (Graph rechts). Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Ruhepotenzial (Kontroll-HEPES $-51,7 \pm 1,8$ mV, IgG(PNP_m)+Kontroll-HEPES Auch das -49.5 ± 2.2 mV, Auswasch mit Kontroll-HEPES -49.7 ± 1.4 mV), die Schwelle zur Auslösung von $0,11 \pm 0,03$ nA, Aktionspotenzialen (Kontroll-HEPES IgG(PNP_m)+Kontroll-HEPES 0.14 ± 0.04 nA, Auswasch mit Kontroll-HEPES 0.13 ± 0.03 nA), die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES $3,53 \pm 0,41$ ms, IgG(PNP_m)+Kontroll-HEPES $3,59 \pm 0,39$ ms, Auswasch mit **Kontroll-HEPES** $3,66 \pm 0,42$ ms) und die Aktionspotenzialamplitude (Kontroll-HEPES $58,0 \pm 1,8$ mV; Kontroll-HEPES+IgG $60,3 \pm 3,0$ mV, $58,2 \pm 2,3$ mV; ohne Abbildung) wurden durch IgG-Applikation nicht signifikant verändert.

3.6.2 Paraneoplastische Polyneuropathie mit sensomotorischer Beteiligung

Für diese Experimente wurde das Plasmapherat von Patienten, die eine sensible Beteiligung in Form von Schmerzen im Laufe ihrer Erkrankung hatten, im Verhältnis 1:3 mit Glycinpuffer verdünnt an der Protein-G-Säule aufgereinigt. Nach der Dialyse mit PBS- und HEPES-Puffer wurde die isolierte Immunglobulinfraktion in einer Konzentration von 1 g/l und einer Geschwindigkeit von 3 ml/min über die Schnitte in der Objektkammer geleitet. Abbildung 43 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen einer Spinalganglienzelle vor, während und nach Applikation des IgGs eines Patienten mit einer paraneoplastischen Polyneuropathie mit sensomotorischer Beteiligung. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis +70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.



Abbildung 43: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l eines Patienten mit sensibler PNP (PNP_s) für drei Minuten superfundiert wurde.

In Abbildung 44 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die größtenteils Natrium- und Kalziumströme darstellen, abgebildet. Diese werden aus Registrierungen im *voltage-clamp* Modus generiert. Bei den Auswärtsströmen wird der Durchschnittswert der Stromamplitude

zwischen 180 und 200 ms normiert zur maximalen Stromamplitude (E=+70 mV) und in Beziehung zum Potenzial gesetzt. Bei den Einwärtsströmen werden die Peakströme gemittelt und zum maximalen Wert der Stromamplitude (E=10 mV) normiert und in Beziehung zum Potenzial gebracht.



Abbildung 44: I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial -80 mV. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes. IgG von einem männlichen Patienten und einer Patientin mit sensibler PNP wurden verwendet.

Die Auswärtsströme bei 40 mV (Kontroll-HEPES 6953 ± 655 pA; IgG(PNP_s)+Kontroll-HEPES 6079 ± 764 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 6354 ± 562 pA) und Einwärtsströme bei 0 mV (Kontroll-HEPES -4374 ± 696 pA; IgG(PNP_s)+Kontroll-HEPES -3935 ± 788 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -3756 ± 776 pA) wurden durch IgG-Applikation nicht signifikant verändert (p<0,05).

Die Abbildung 45 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit sensibler PNP. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle



Abbildung 45: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einem Patienten mit sensibler PNP für drei Minuten superfundiert wurden. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -56,0 mV Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Die Mittelwerte der Aktionspotenzialdauer, der Aktionspotenzialschwelle und der Höhe des Ruhepotenzials werden im *current-clamp* Modus gemessen und sind in Abbildung 46 dargestellt.



Abbildung 46: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Graph links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Graph Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (Graph rechts). Es sind der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Das Ruhepotenzial (Kontroll-HEPES -58,8 ± 2,1 mV; IgG(PNP_s)+Kontroll-HEPES -53,5 ± 2,7 mV; Auswasch mit Kontroll-HEPES -56,9 ± 2,4 mV) und die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES 3,94 ± 0,34 ms; IgG(PN P_s)+Kontroll-HEPES 4,40 ± 0,48 ms; Auswasch mit Kontroll-HEPES 4,14 ± 0,41 ms) wurden durch IgG-Applikation nicht signifikant verändert. Die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen wurde signifikant (p<0,05) herabgesetzt (Kontroll-HEPES 0,25 ± 0,02 nA; IgG(PNP_s)+Kontroll-HEPES 0,19 ± 0,03 nA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 0,20 ± 0,02 nA. Die Aktionspotenzialamplitude war nach IgG-Applikation signifikant und reversibel erniedrigt (Kontroll-HEPES 52,3 ± 2,8 mV; Kontroll-HEPES+IgG 45,2 ± 4,7 mV; Auswasch 51,6 ± 3,4 mV; ohne Abbildung; p<0,05).

3.7 Sensible Polyneuropathie mit IgG und IgM Antikörpern

Für diese Experimente wurde das Plasmapherat von Patienten, die eine sensible Polyneuropathie mit IgG und IgM Antikörpern in Form von Schmerzen im Laufe ihrer Erkrankung hatten, im Verhältnis 1:3 mit Glycinpuffer verdünnt an der Protein-G-Säule aufgereinigt. Nach der Dialyse mit PBS- und HEPES-Puffer wurden die isolierte Immunglobulinfraktion in einer Konzentration von IgG 2 g/l und IgM 1 g/l in einer Geschwindigkeit von 3 ml/min über die Schnitte in der Objekt-kammer geleitet. Abbildung 47 ist ein typisches Beispiel für *voltage-clamp* Registrierungen einer Spinalganglienzelle vor, während und nach Applikation des IgGs eines Patienten mit einer sensiblen Polyneuropathie mit IgG und IgM-Antikörpern. Ausgehend von einem Haltepotenzial von -80 mV wurden 15 Potenzialsprünge um jeweils 10 mV bis +70 mV durchgeführt und die Ströme abgeleitet.



Abbildung 47: Impulsprotokoll und voltage-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l eines Patienten mit sensibler PNP mit IgM (PNP_{IgM}) für drei Minuten superfundiert wurden.

In Abbildung 48 sind die Strom-Spannungskurven der gesamten Auswärtsströme (A), die hauptsächlich die Kaliumströme repräsentieren, und der Einwärtsströme (B), die größtenteils Natriumund Kalziumströme darstellen, abgebildet. Diese werden aus Registrierungen im *voltage-clamp* Modus generiert. Bei den Auswärtsströmen wird der Durchschnittswert der Stromamplitude zwischen 180 und 200 ms normiert zur maximalen Stromamplitude (E=+70 mV) und in Beziehung zum Potenzial gesetzt. Bei den Einwärtsströmen werden die Peakströme gemittelt und zum maximalen Wert der Stromamplitude (E=10 mV) normiert und in Beziehung zum Potenzial gebracht.



Abbildung 48: A.B. I/U Beziehung von Einwärts- und Auswärtsströmen, gemessen als Durchschnitt bei 180-200 ms des Impulses und normiert zur Stromamplitude bei 70 mV in jedem Experiment. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High- K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C, Haltepotenzial -80 mV. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, p<0,05. IgG von einem männlichen Patienten mit sensibler PNP wurde verwendet.

A. Bei Patienten mit sensibler Polyneuropathie mit IgG und IgM Antikörpern zeigten die Auswärtsströme bei 40 mV eine signifikante (p<0,05) Erniedrigung (Kontroll-HEPES 9339 \pm 1426 pA, IgG(PNP_{IgM})+Kontroll-HEPES 7224 \pm 1566 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES 8880 \pm 1512 pA).

B. Die Einwärtsströme bei 0 mV (Ringer +HEPES -4389 ± 755 pA; IgG(PNP_{IgM})+Kontroll-HEPES -4540 ± 799 pA; Auswasch mit Kontroll-HEPES -4780,1 ± 721,8 pA) waren nicht signifikant verändert.



Abbildung 49: Impulsprotokoll und current-clamp Registrierungen eines Hinterwurzelganglienneurons, das mit IgG Antikörpern der Konzentration 1 g/l von einem Patienten mit sensibler PNP mit IgM für drei Minuten superfundiert wurde. Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle bestimmt. Ruhepotenzial -56,3 mV. Außenlösung Kontroll-HEPES, Pipettenlösung High-K_{in} mit Aspartat. Temperatur 23°C.

Die Abbildung 49 zeigt ein typisches Beispiel für *current-clamp* Registrierungen eines Spinalganglienneurons vor, während und nach der Applikation des IgGs eines Patienten mit sensibler PNP mit IgM. Dargestellt ist jeweils das Aktionspotenzial bei dem zweiten Impuls oberhalb der Schwelle.

Die Mittelwerte der Aktionspotenzialdauer, der Aktionspotenzialschwelle und der Höhe des Ruhepotenzials werden im *current-clamp* Modus gemessen und sind in Abbildung 50 dargestellt.



Abbildung 50: Die Aktionspotenzialdauer wurde im current-clamp Modus bei E=0 mV am zweiten Aktionspotenzial oberhalb der Reizschwelle bestimmt (Graph links). Als Aktionspotenzialschwelle wurde im current-clamp Modus der Strom gewählt, bei dem zuerst ein Aktionspotenzial ausgelöst wurde (Graph Mitte). Ruhepotenzial der verwendeten Zellen. Es wurde über eine manuell gewählte Länge von 5 ms vor Auslösung eines Aktionspotenzials im current-clamp Modus gemessen (Graph rechts). Es sind der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Das Ruhepotenzial (Kontroll-HEPES $-60,3 \pm 1,3$ mV; IgG(PNP_{1gM})+Kontroll-HEPES $-57,6 \pm 2,9$ mV; Auswasch mit Kontroll-HEPES $-60,5 \pm 2,8$ mV), die Aktionspotenzialschwelle (Kontroll-HEPES $0,05 \pm 0,16$ nA; IgG(PNP_{1gM})+Kontroll-HEPES $0,03 \pm 0,13$ nA; Auswasch mit Kontroll-HEPES $0,04 \pm 0,15$ nA) und die Aktionspotenzialdauer (Kontroll-HEPES $4,0 \pm 0,3$ ms; IgG(PNP_{1gM})+Kontroll-HEPES $4,0 \pm 0,4$ ms; Auswasch mit Kontroll-HEPES $3,9 \pm 0,4$ ms) waren vor und nach IgG-Applikation ebenfalls nicht signifikant verändert. Allerdings war die Amplitude des Aktionspotenzials nach IgG-Applikation deutlich erhöht (Kontroll-HEPES $42,4 \pm 4,3$ mV; Kontroll-HEPES+IgG $50,5 \pm 3,5$ mV; Auswasch $39,5 \pm 7,6$ mV; ohne Abbildung; p<0,05).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

Die Hinterwurzelganglienzellen wurden nach einer Methode von Safronov et al. (1996) und Scholz et al. (1998a) präpariert und in 150 µm dicken Schnitten verwendet. Ein Vorteil der Slicetechnik, die erstmals von Edwards et al. (1989) beschrieben wurde, ist die weitgehend physiologische Unversehrtheit (Scholz et al., 1998b; Scholz & Vogel, 2000; Yusaf et al. 2001) der Zellen, da sowohl das Axon als auch der gesamte umgebende Zellverbund erhalten bleiben. Durch den Verzicht auf eine enzymatische Präparation kann eine Beeinträchtigung der Kanal- und Rezeptoreigenschaften durch eine Veränderung der Kanalproteine weitgehend vermieden werden (Hestrin & Korenbrot, 1987). Dabei ist der Zugriff im Spinalganglienschnitt jedoch auf die kleinen oberflächlich liegenden Neurone beschränkt. Im Gegensatz zu den beschriebenen Reinigungstechniken für Schnitte von Gehirn und Rückenmark (Edwards et al., 1989; Takahashi, 1990), bei denen mit Hilfe einer anderen Pipette durch Überdruck die oberflächlichen Gewebsschichten entfernt werden konnten, ist dies bei Hinterwurzelganglienneuronen nicht möglich (Safronow et al., 1996), da sich das umliegende Gewebe als zu fest erwies. Die Ruhemembranpotenziale bei enzymatisch behandelten Zellen lagen bei etwa E=-30 mV (Kostyuk et al., 1981a-d) bzw. um 20 - 30 mV depolarisierter als in einer *slice*-Präparation (Scholz et al., 1999).

Im Gegensatz dazu befanden sich die in dieser Arbeit verwendeteten Zellen in einem guten Zustand, was sich in einem durchschnittlichen Ruhemembranpotenzial von $E=-53,8\pm0,90$ mV (n = 107) in Kontroll-HEPES zeigte. Im Jahr 1995 konnten Cowan et al. zeigen, dass durch Verwendung von HEPES-Puffer statt CO₂-Puffer eine Verminderung der Negativität des Membranpotenzials um bis zu 11 mV verursacht werden kann, was erklärt, warum die Neurone in den vorliegenden Experimenten ein Ruhepotenzial weniger negativ als - 70 mV aufweisen.

Einer der Nachteile von Neuronen in einer Schnittpräparation besteht darin, dass nach Einwaschen insbesondere hochmolekularer oder lipophiler Substanzen die Experimentierkammer und der Schnitt kontaminiert sind. Der Auswasch kann somit kein vollständiges Entfernen der eingewaschenen Substanzen sicherstellen. Auch ist ein schnelles Wechseln der applizierten Substanzen nicht möglich, da das Volumen der Experimentierkammer (1,5 ml) mehrfach ausgewechselt werden muss und sich die Austauschzeit bei einem *flow* von 3ml/min im Bereich von 1-3 Minuten befindet. Spinalganglienneurone stellen das erste Neuron im sensiblen System dar. Sie weisen an ihrer Oberfläche unterschiedliche Kanaltypen mit einem variablen Verteilungsmuster auf. Hierzu gehören

verschiedene spannungsabhängige Kaliumkanäle, ionen- und ligandengesteuerten Kaliumkanäle, verschiedene spannungsabhängige Natrium- sowie Kalziumkanäle.

Als Folge der unterschiedlichen Kanaltypen weisen die Neurone eine Mischung von verschiedenen Strömen und Aktionspotenzialen auf. Das Öffnen der Ionenkanäle kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Hierzu zählen die Änderung des Membranpotenzials, die Bindung von externen Modulatoren oder der Ablauf intrazellulärer Signalkaskaden. Ein zusätzlicher limitierender Faktor in Bezug auf die Haltbarkeit der Neuronen ist ein *rundown*, der sich insbesondere durch ein vermindertes Ansprechen der Kalziumströme bemerkbar macht. Dieser wird durch eine Reduktion der Kalziumionenkonzentration in der Zelle hervorgerufen (Fenwick et al., 1982).

Für die Durchführung der Experimente sollte der Effekt von humanem IgG gemessen werden. Ein komplementunabhängiger Effekt von IgG hat sich bereits in mehreren experimentellen Studien gezeigt. Buchwald et al. (1998a) zeigten, dass eine Blockade der neuromuskulären Synapse gleichermaßen durch Serum und aufgereinigtes IgG von Patienten mit GBS hervorgerufen werden konnte. Schäfer et al. fanden 2000 eine komplementunabhängige Zytotoxizität durch IgG von Patienten mit paraneoplastischer Neuropathie an Plexus myentericus Neuronen von Ratten. Antikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle wiesen Tomimitsu et al. (2004) durch eine Blockade in neuronalen Zelllinien nach. Taguchi et al. hatten 2004 eine komplementunabhängige Reaktion an Ionenkanälen auf Vorderhornzellenkulturen, ausgelöst von menschlichen Anti-GD1a-Antikörpern. Im Jahre 2007 konnten Buchwald et al. einen komplementunabhängigen Effekt von anti-Gangliosid-Antikörpern von GBS-Patienten an der neuromuskulären Synapse finden. Nakatani et al. (2007) zeigten für das GBS, dass durch GM1-Antikörper komplementunabhängige Reduktionen der Ströme an spannungsabhängigen Kalziumkanälen an neuronalen Zellen auftraten. Diese Arbeitsgruppe (Nakatani et al., 2009) konnte außerdem eine reversible Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle durch GM1-Antikörper an Purkinjezellen nachweisen. Somit ist evident, dass Antikörper prinzipiell in der Lage sind, komplementunabhängige Effekte zu erzielen, weswegen in der vorliegenden Arbeit die aufgereinigten Immunglobulinfraktionen ohne den Einsatz zusätzlicher Komplementfaktoren verwendet wurden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Negativkontrollen

Bei den Negativkontrollen, für die die Seren neurologisch unauffälliger Individuen verwendet wurden, konnten keine relevanten Veränderungen bei den verschiedenen Strömen festgestellt werden. Die Aktionspotenzialschwelle, die Aktionspotenzialdauer und das Ruhepotenzial wurden hierdurch ebenfalls nicht verändert.

Die Immunglobuline, die von gesunden Probanden isoliert wurden, reagierten nicht relevant in der verwendeteten Konzentration in der angegebenen Zeitspanne. Dies entspricht unserer Hypothese und zeigt, dass auch keine relevanten unspezifischen Effekte durch in Kontroll-HEPES gepufferte Antikörper von Menschen an Spinalganglienneuronen hervorgerufen werden.

4.2.2 Positivkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle

Immunglobuline von Patienten mit LEMS, die zur Kontrolle des Systems eingesetzt wurden, wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet.

- In einer Konzentration von 1,5 g/l konnte eine statistisch signifikante (p<0,05) durch IgG ausgelöste und partiell reversible Reduktion der Amplitude der Spitzeneinwärtsströme (E=0 mV) ausgelöst werden. Die Amplitude der Auswärtsströme, die Aktionspotenzialschwelle, deren Dauer und das Ruhepotenzial waren nicht signifikant alteriert. Es lagen keine Neurone vor, die bei der Konzentration von 1,5 g/l und einem 1000 ms dauernden Stimulus repetitiv feuerten.
- In einer Konzentration von 0,5 g/l wurde durch den Einwasch von Immunglobulinen ebenfalls eine akute und signifikante (p<0,05) partiell reversible Verminderung der Amplitude der Spitzeneinwärtsströme (E=0 mV) hervorgerufen. Zusätzlich wurden auch die Amplitude der Auswärtsströme partiell reversibel reduziert. Ruhepotenzial, Aktionspotenzialschwelle und Aktionspotenzialdauer waren nicht signifikant verändert.

Zusätzlich konnte bei einer Immunglobulinkonzentration von 0,5 g/l bei der Aufzeichnung im *current-clamp* Modus eine reversible Reduktion der Feuerfrequenz beobachtet werden.

Die Veränderungen der gemessenen Parametern war bei einer Konzentration von 0,5 g/l und 1,5 g/l nicht sehr unterschiedlich.

Auf Spinalganglienneuronen finden sich spannungsabhängige Kalziumkanäle, die die neuronale Aktivität und somit auch die Bildung von Aktionspotenzialen im nozizeptiven System steuern (Boroujerdi et al., 2008; Motin et al., 2007). Beim LEMS finden sich Antikörper gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle vom P/Q-Typ im Serum, die an der präsynaptischen Membran an der neuromuskulären Synapse Kalziumströme inhibieren und somit die durch Kalziumionen getriggerte Freisetzung von Acetylcholin vermindern. Experimentell hervorgerufen werden kann ein LEMS, indem Tiere mit einem LEMS-Antigen immunisiert werden. Somit ist der Antikörper als krankheitsauslösende Entität zu sehen (Newsom-Davis & Murray, 1984). In den hier vorliegenden Zellen erwarteten wir eine Blockade der Kalziumströme.

In der Literatur beschrieben sind verschiedene Versuchsanordnungen, um die durch LEMS-IgG ausgelösten Effekte zu untersuchen. So fanden Buchwald et al. (2005), dass im Mausmodell des Hemidiaphragmas mit Phrenikusnerv ein durch IgG ausgelöster Effekt nach einer Stunde bei einer Temperatur von 37° C nicht reversibel auftrat und von der Konzentration der Antikörper und ihrer Einwirkzeit abhängig war. Hewett und Atchison zeigten (1992a, b, 1991), dass unter IgG in einer Konzentration von 2-4 g/l eine komplementabhängige Verminderung der Kalziumaufnahme in die präsynaptische Membran erfolgt. Unterhalb dieser Konzentration konnten sie keine Effekte nachweisen, Konzentrationen des IgG oberhalb dieser Spanne konnten keine weiteren Effekte auslösen.

Dass Antikörper gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle nicht nur an der neuromuskulären Synapse reagieren, konnten Engisch et al. (1999) zeigen. Sie beobachteten, dass Antikörper an chromaffine Zellen und Neuroblastomzellen banden und dort nach 30 Minuten Inkubationszeit den Kalziumeinstrom in die Zellen hemmten. Johnston et al. (1994) fanden, dass LEMS IgGs verschiedene Antikörperbindungsstellen aufwiesen und nicht nur selektiv Kalziumkanäle vom PQ-Typ, sondern auch an L- oder N-Typ Kalziumkanäle banden. Peers et al. (1993) zeigten eine antikörpervermittelte, komplementunabhängige Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle, die zu einer reduzierten Ausschüttung von Acetylcholin an der motorischen Endplatte bei Mäusen führte (direkte Messung).

In unseren Experimenten wurden die Messungen nach 3-5 Minuten und bei Zimmertemperatur durchgeführt. Dies könnte zu einem geringeren Effekt der Antikörper führen, da bei erhöhter Temperatur Reaktionen schneller ablaufen. Möglich ist auch eine unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von der Spezifität der Gewebe. Im Gegensatz zu Buchwald et al. (2005), die das Modell der neuromuskulären Synapse am Hemidiaphragma verwendeten, lagen in unserer

Studie Spinalganglienneurone vor, die das erste Neuron im sensiblen System darstellen (Cull-Candy, 1980; Lang, 1987). Außerdem wurden die Neurone in unserem Modell nur durch die Morphologie ausgewählt, Funktionstestungen oder andere Differenzierungen erfolgten nicht. Dadurch ist es möglich, dass verschiedene Zelltypen mit verschiedenen Kanaltypen untersucht wurden, die für die vorliegenden Antikörper weniger spezifisch waren, was zu einer weiteren Reaktionsverzögerung geführt haben kann.

Eine Inkubationszeit von mehreren Stunden ist in unserer Versuchsanordnung aufgrund des unspezifischen *rundowns* der Ströme der Neuronen nicht möglich; außerdem sollte in dieser Studie geklärt werden, ob durch Antikörper direkt Veränderungen der Ionenströme ausgelöst werden können, wodurch auch der sofortige Effekt durch eine Plasmapherese erklärt werden könnte. Eine Inkubation der Zellen mit den verschiedenen IgG außerhalb der Versuchsanordnung nach Messung in HEPES ist nicht möglich, da die Zellen nicht unbeschädigt markiert, gemessen und nach weiterer Inkubation erneut verwendet werden können.

Sowohl in einer Konzentration von 0,5 g/l als auch bei 1,5 g/l zeigte sich eine signifikante Reduktion der Einwärtsströme. Zusätzlich konnte in einer Konzentration von 0,5 g/l eine signifikante Verminderung der Auswärtsstromamplitude beobachtet werden. Da es sich bei Kalziumströmen um Einwärtsströme handelt, ist das Ergebnis unserer Untersuchung mit in der Literatur gefundenen Ergebnissen vereinbar. Somit ist unser Modell eine geeignete Methode zur Untersuchung von akuten Effekten von Antikörpern an Hinterwurzelganglien-Neuronen.

4.2.3 Anti-Kalium-Kanal-Antikörper bei limbischer Enzephalitis

Immunglobuline, die von einem Patienten mit anti-Kaliumkanal Antikörpern bei limbischer Enzephalitis isoliert wurden, zeigten keine signifikante Veränderung der Einwärts- oder Auswärtsströme, des Ruhepotenzials, der Aktionspotenzialschwelle oder -dauer an Spinalganglienneuronen. In der Literatur beschrieben sind bei der LE eine erhöhte Menge an Antikörpern gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle, deren reduzierte Menge nach Therapie mit der klinischen Besserung der Symptome korrelierte und somit als krankheitsauslösende Entität zu erwägen ist (Vincent et al., 2004). Immunhistochemisch konnte deren Lokalisation in der Molekularschicht im Gyrus dentatus des Hippocampus dargestellt werden (Buckley et al., 2001). Radioimmunologisch entsprach die Bindungsstelle den Kanalsubtypen Kv1.1 und teilweise auch Kv1.2, die im gyrus dentatus vorhanden sind (Rhodes et al., 1996; Monaghan et al., 2001; Kleopa et al., 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen in dem den humanen Kv1.1 codierenden Genabschnitt bei einigen Patienten zu einer klinischen Befundtrias von Ataxie, Myokymie und Epilepsie führten (Zuberi., 1999) und sich bei Kv1.1-*knockout*-Mäusen epileptische Anfälle entwickelten, deren Ursprünge man auf das limbische System zurückführte (Smart, 1998). Andere Mäuse entwickelten Gedächtnisprobleme (Gratacos et al., 1998). In neuropathologischen Studien von Patienten mit LE fanden sich neuronale Schäden, Mikrogliose und Infiltrate zytotoxischer T-Zellen sowie B-Zellen in Hippocampus und Amygdala. Komplementablagerungen fanden sich nicht (Graus et al., 2008; Khan et al., 2009).

Kürzlich veröffentlicht wurde eine Studie (Lai et al., 2010), in der diskutiert wurde, ob die Antikörper bei LE tatsächlich die Funktion spannungsabhängiger Kaliumkanäle einschränken, da zwar von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden konnte, dass Antikörper aus Patientenseren mit Zellen, die verschiedene Untertypen der VGKC an der Oberfläche exprimierten, reagierten, obwohl nur 20-38% der Zellen von Antikörpern erkannt wurden (Kleopa et al., 2006). Lai et al. (2010) versuchten selbst die Reaktivität von Antikörpern, die von Patienten mit Neuromyotonia congenita, Morvans-Syndrom und LE gewonnen wurden, an VGKC zu testen, was ihnen nicht gelang. Daher nahmen sie an, dass die Antikörper gegen andere Antigene auf der Zelloberfläche gerichtet sein müssten. Die Arbeitsgruppe fand eine Reaktivität aller Antikörper von Patienten mit limbischer Enzephalitis auf ein neuronales Protein, LGI1, das als Ligand für zwei epilepsieassoziierte Proteine, ADAM 22 und ADAM 23 dient. Eine Reaktivität mit VGKC vom Typ Kv 1.1 und Kv 1.4 fand sich nicht (Lai et al., 2010).

In der Literatur sind Veränderungen an Spinalganglienneuronen durch Kaliumkanalblocker unter anderem von Birinyi-Strachan et al. (2005) beschrieben. Diese beobachteten eine durch Pacific Ciguatoxin ausgelöste erniedrigte Schwelle zum Auslösen eines Aktionspotenzials. Die Aktionspotenzialdauer war außerdem verlängert und die Fähigkeit mehrere Aktionspotenziale zu bilden war erhöht. Gruß et al. (2006) konnten in Spinalganglienneuronen durch milde Hypoxie eine Verminderung von spannungsabhängigen Kaliumströmen beobachten, was ebenfalls zu einer Verlängerung der Aktionspotenziale und einer herabgesetzten Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen führte.

Insgesamt konnten in der hier vorliegenden Studie keine wesentlichen Veränderungen an den Ionenflüssen und den Aktionspotenzialen festgestellt werden. Eine Alteration der Feuerfrequenz von Spinalganglienneuronen konnten in den vorliegenden Experimenten nicht nachgewiesen werden, da sich keine repetitiv feuernden Neurone fanden. Die durch medikamentöse Kaliumblocker ausgelösten Veränderungen der Ionenströme und die daraus resultierende erhöhte Erregbarkeit konnten in unseren Experimenten nicht nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür könnte das Fehlen der spezifischen Kanäle an den untersuchten Neuronen sein, da diese nur anhand der Größe differenziert wurden. Zudem könnte eine Reaktionsdauer von länger als wenigen Minuten sowie eine Beteiligung von Komplement und Entzündungszellen ursächlich sein, wofür auch die neuropathologischen Ergebnisse sprechen, bei denen es zu einer Infiltration von T-Zellen und neuronalen Schäden im Verlauf der Erkrankung kommt. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass der VGKC nicht das Epitop ist, an das die anti-VGKC-Antikörper bei LE binden.

4.2.4 Guillain-Barré-Syndrom

Motorische Beteiligung bei GBS

IgG von Patienten mit rein motorischem Guillain-Barré Syndrom löste bei einer Einwaschzeit von drei Minuten und in einer Konzentration von 1 g/l keine signifikante Veränderung der Ströme, des Ruhepotenzials, der Aktionspotenzialschwelle oder der Aktionspotenzialdauer aus. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Antikörper weder beim Patienten noch im Experiment an Epitope binden, die auf den Gangliosiden sensibler Nerven zu finden sind, was wiederum für eine spezifische Reaktion der Antikörper sprechen würde.

Sensible Beteiligung bei GBS

In dieser experimentellen Arbeit löste IgG in einer Konzentration von 1 g/l von Patienten mit sensibler Beteiligung bei Guillain-Barré Syndrom innerhalb von drei Minuten eine signifikante (p<0,05) Verminderung der Auswärtsströme und eine Verminderung der Einwärtsströme beim Auswasch aus. Das Ruhepotenzial wurde nicht signifikant verändert. Die Aktionspotenzialschwelle wurde erhöht und die Dauer der Aktionspotenziale wurde signifikant (p<0,05) und reversibel erniedrigt. Auch die Aktionspotenzialfeuerfrequenz wurde durch das IgG reversibel und signifikant (p<0,05) erniedrigt, und zwar am ehesten durch die Erhöhung der Aktionspotenzialschwelle.

Dass Effekte, die durch Antikörper hervorgerufen werden, beim GBS komplementunabhängig und innerhalb weniger Minuten auftreten können, zeigte die Arbeitsgruppe um Buchwald (1998b) am Beispiel des GBS und des Miller-Fisher-Syndroms (MFS). Beim MFS, das eine Unterform des Guillain-Barré-Syndroms darstellt, konnten experimentell komplementunabhängige, innerhalb von 2-3 Minuten auftretende und reversible Effekte nachgewiesen werden. Die Verminderung der Übertragungsrate an der neuromuskulären Synapse schreibt die Arbeitsgruppe der verminderten Freisetzen

von Acetylcholin in den synaptischen Spalt. Ähnliche Beoachtungen veröffentliche diese Gruppe auch für Antikörper von Patienten mit klassischen GBS. Komplementunabhängig und partiell reversibel konnte die Übertragungsrate an der neuromuskulären Synapse am Modell des Hemidiaphragmas der Maus reduziert werden, nachdem sowohl IgG als auch Serum von Patienten mit GBS appliziert worden waren. 2002 fand dieselbe Arbeitsgruppe zusätzlich zu der durch Antikörper ausgelösten Blockade von präsynaptischen Kalziumkanälen eine Interaktion der Antikörper von GBS-Patienten mit Acetylcholinrezeptoren (Buchwald et al., 2002b).

Die in der hier vorliegenden experimentellen Arbeit gefundene akute Verminderung der Einwärtsströme spricht für eine durch die Antikörper hervorgerufene Natriumkanalblockade. Diese ist von mehreren Arbeitsgruppen in der Literatur beschrieben worden. Einige Autoren beobachteten eine Abhängigkeit der Reaktion von Komplement, bei anderen war dies nicht notwendig. Dritte wiederum konnten keine Verminderung der Natriumkanalströme messen, was im Folgenden näher erläutert wird.

Komplementabhängig konnten Weber et al. (2000) zeigen, dass aus Kaninchenserum isolierte GM1 Antikörper an neuronenähnlichen Zellen aus einer Neuroblastom/Gliom-Hybridzelle reversibel und innerhalb von Sekunden die Natriumkanäle blockieren und somit den Natriumeinstrom in Nervenzellen hemmen. Der Effekt war mit IgGs ohne Komplement in etwa so groß wie der der Kontrolle allein (10%), in Verbindung mit Komplement (Kaninchen) jedoch wurde die Stromamplitude der Natriumströme teilweise um bis zu 50% reduziert. Komplementfaktoren, Antikörper oder Kaninchenserum allein hatten einen wesentlich geringeren Effekt. Besonders GM1-Antikörper hatten einen großen Effekt auf die Ströme, was auf eine starke Selektivität des IgGs auf die Kanäle hinweist. Wichtig für die Experimente von Weber et al. (2000) war die Abhängigkeit der Reaktion von der Konzentration und bei niedriger Konzentration die Abhängigkeit von Komplement. In niedrigen Konzentrationen und mit Hilfe von Komplementfaktoren konnten die Antikörper direkt die Kanalpore verschließen. Dies wiederum führte zu einer Heraufsetzung der Aktionspotenzialschwelle, die sich auch in unseren Experimenten darstellt.

1995 fanden Takigawa et al., dass durch GM1-Antikörper zwei verschiedene Reaktionen hervorgerufen werden konnten, abhängig von der Präsenz von Komplement. In Abwesenheit von Komplement konnte die Arbeitsgruppe eine Zunahme der Auswärtsströme sowie eine Veränderung der Kaliumkanalkinetik nachweisen. In Anwesenheit von Komplement kam es neben der Zunahme der Kaliumströme zu einer Abnahme von Natriumströmen. Dies führte zu der Annahme, dass die Antikörper mit dem Komplement Komplexe bilden und die Natriumkanäle somit blockieren. Im Jahr 2000 untersuchte diese Arbeitsgruppe erneut den Effekt von GM1-Antikörpern von Kaninchen und Menschen auf Spinalganglienneurone von Ratten. Erneut fand sich eine durch GM1-Antikörper in Verbindung mit Komplement aufgetretene Reduktion der Natriumeinwärtsströme. Interessant war hier die Feststellung, dass der Effekt, der durch Antikörper, die aus Kaninchen isoliert wurden, eine stärkere Reduktion der Natriumströme in nur der Hälfte der Zeit (30 vs 60 Minuten) hervorrief als die Antikörper von Menschen. Hierbei konnte nicht unterschieden werden, ob dies an der besseren Kompatibilität des aus Meerschweinchen gewonnenen Komplements lag oder an der besseren Affinität des Antikörpers zum Antigen.

Hirota et al. kamen 1997 zu unterschiedlichen Ergebnissen. Sie konnten in ihrem in vivo Modell, in dem einzelne Nervenfasern der ventralen Wurzel der Spinalnerven von Ratten nach Antikörperapplikation von Kaninchen und Menschen untersucht wurden, einen durch ein anderes Gangliosid hervorgerufenen Leitungsblock, nämlich Gal-C-Ak, die aus IgM Makromolekülen bestehen, beobachten. Durch GM1-Ak Applikation konnte diese Gruppe nur bei den wenigsten Nervenfasern einen Leitungsblock finden.

Ein Jahr später (1998) wiesen Kuwabara et al. in einer klinischen Studie nach, dass Pat. mit GM1-Antikörpern wesentlich weniger häufig als Pat. ohne Antikörper an elektrophysiologisch nachgewiesenen Demyelinisierungen erkrankten (Yuki et al., 1990). Sie sahen dies als Erklärung dafür, dass die GM1-Ak nicht eine Demyelinisierung der Nervenfasern hervorrufen, sondern durch Antikörper Natriumkanäle an den Ranvier'schen Schnürringen inaktiviert werden (Griffin et al., 1995; Hafer & Macko, 1996; Ho et al., 1997; Waxman et al., 1995) und es damit zu einem Leitungsblock kommt. Bereits 1993 konnte auch von Arasaki et al. mit einer in vitro Präparation von Ischiadicusnerven von Ratten nachgewiesen werden, dass GM1-Antikörper von Kaninchen und Menschen in hohen Titern einen Leitungsblock in myelinisierten Fasern hervorrufen können. Und auch Santoro et al. konnten 1992 einen Leitungsblock an Ischiadicusnerven von Ratten experimentell nachweisen, nachdem sie Serum eines Patienten mit GM1-Antikörpern und aktiviertes Komplement injizierten.

Komplementunabhängige Reaktionen wurden von der Gruppe um Buchwald (1998a) beschrieben. Sie konnten eine Blockade der neuromuskulären Synapse gleichermaßen durch Serum und durch aufgereinigtes IgG von Patienten mit GBS nachweisen. Hierbei lagen keine spezifischen Anti-GM1-Antikörper vor. Im Jahr 2007 fand die selbe Arbeitsgruppe einen komplementunabhängigen Effekt von anti-Gangliosid-Antikörpern von GBS Patienten ebenfalls an der neuromuskulären Synapse. Nakatani et al. zeigten 2007 für das GBS, dass durch GM1-Antikörper komplementunabhängige Reduktionen der Ströme an spannungsabhängigen Kalziumkanälen an artifiziellen neuronalen Zellen, nämlich den *nerve-growth-factor-differentiated* PC12-Zellen, auftraten. Im Jahr 2009 konnte diese Arbeitsgruppe den Kanal spezifizieren, nämlich den spannungsabhängigen Kalziumkanal Cav 2.1 an Purkinjezellen.

Taguchi et al. fanden 2004 eine reversible und komplementunabhängige Kontraktionsverminderung am Muskel nach Applikation von GBS IgG durch eine signifikante Verminderung der Übertragungsrate an der neuromuskulären Synapse innerhalb weniger Minuten.

Die Abnahme der Peakeinwärtsströme in die Zellen, also im Wesentlichen der Natriumströme und/oder Kalziumströme konnte in unseren Experimenten im Auswasch nachvollzogen werden. Dass der Effekt kleiner ist als in der Literatur beschrieben, könnte mehrere Ursachen haben. In unseren Untersuchungen wurde kein Komplement verwendet, da wir den Effekt, der nur von Antikörpern ausgelöst wird, dokumentieren wollen. Dass die Reaktion erst im Auswasch auftritt und nicht direkt, könnte an einer Reaktionszeit liegen, die länger dauert als drei Minuten und die nicht sofort auswaschbar ist. Die Arbeitsgruppe um Buchwald verwendet outside-out-patches und einen ultraschnellen Lösungsaustausch. Wie zuvor erwähnt, muss in unserem Versuchsaufbau die gesamte Lösung der Versuchskammer ausgewechselt werden. Zudem kann sich auf den unterschiedlichen Neuronen ein unterschiedlicher Kanalbesatz befinden, so dass unterschiedlich spezifische Bindungen mit den Kanälen auftreten können.

Ein weiterer Grund für einen gering ausgeprägten Effekt könnte eine geringe Spezifität des Gewebes sein. GM1-Antikörper, die in der oben erwähnten Literatur einen Großteil der Antikörperspezifitäten ausmachen, treten bei der AMAN auf, bei der sie an motorische Neurone binden, allerdings findet man sie kaum bei der AIDP oder bei Patienten, die vorwiegend sensible Beschwerden aufwiesen (Irie et al., 1997). In unserer Studie wurden die Antikörper von Patienten isoliert, die vorwiegend sensible Beschwerden hatten und aufgrund ihrer kaukasischen Abstammung an AIDP und nicht der in Japan verbreiteten AMAN litten. Zwar sind GM1-Antigene auch in kleinen Spinalganglienneuronen vorhanden, allerdings treten diese Ganglioside bevorzugt an den Ranvier'schen Schnürringen auf. Somit ist unsere Studie nur eingeschränkt mit den anderen Studienergebnissen vergleichbar, da dort motorische Nerven untersucht wurden und das IgG von Patienten mit motorischer Beteiligung. In unserer Studie wurde das erste sensorische Neuron untersucht und IgG von Patienten mit sensiblen Symptomen verwendet. Ob nun wirklich eine Natriumstrom- oder eine Kalziumstromreduktion oder aber eine Erhöhung der Auswärtsströme eine Pseudoeinwärtsstromreduktion hervorgerufen hat, wird sich erst nach weiteren Studien sagen lassen, in denen die Ionenströme selektiv untersucht werden. In dieser experimentellen Arbeit findet sich Evidenz dafür, dass durch Antikörper von Patienten mit Guillain-Barré Syndrom eine akute und komplementunabhängige Reaktion an Spinalganglienneuronen ausgelöst wird. Als Folge davon kommt es zu einer Erhöhung der Auslösbarkeitsschwelle von Aktionspotenzialen. Dies ist zwar keine Erklärung für die im Krankheitszusammenhang vermehrt auftretenden Schmerzen, allerdings könnte dies eine Erklärung für ein mögliches vermindertes Schmerzempfinden sein, wie es auch im Verlauf eines GBS auftreten kann und sich in den hier vorliegenden Experimenten gezeigt hat (Abb. 30).

4.2.5 Chronische demyelinisierende Polyneuropathie

Motorische Beteiligung bei CIDP

Antikörper von für diese Experimente ausgewählten Patienten, die im Verlauf ihrer chronischen inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie keine sensible Beteiligung aufwiesen, zeigten lediglich im Auswasch eine signifikante Verminderung der Auswärtsströme. Die anderen gemessenen Parameter waren nicht signifikant verändert. Die Reduktion der Auswärtsströme kann auf einen unspezifischen *rundown* zurückgeführt werden (Hille, 2001).

Sensible Beteiligung bei CIDP

Immunglobuline, die von Patienten mit sensibler Beteiligung einer chronischen inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie durch Plasmapherese gewonnen und aufgereinigt wurden, lösten im Experiment in der Konzentration von 1g/l innerhalb von drei Minuten eine signifikante (p<0,05) und irreversible Erniedrigung der Einwärtsströme bei 0 mV aus. Auswärtsströme, das Ruhepotenzial, die Aktionspotenzialschwelle sowie die Aktionspotenzialdauer waren davon unbeeinflusst. Einwärtsstrompeaks bestehen wie vorher beschrieben zu einem Großteil aus Natriumströmen, zu einem geringeren Anteil allerdings auch aus Kalziumströmen.

Antikörper werden bei chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyneuropathie als pathogen angesehen. Dies konnte sowohl in histologischen Studien, in klinischen und in experimentellen Studien belegt werden. Histologisch fanden sich in Nervenbiopsien Immunglobuline vom IgG und IgM Typ neben Komplementablagerungen (Dalakas & Engel, 1980; Hays et al., 1988). Klinisch besserten sich Symptome bei Patienten nach Plasmapherese (Toyka & Hartung, 1996; Hahn et al., 1996). Bei Patienten, die von einer Plasmapherese profitierten, konnte experimentell deren aufgereinigtes IgG, das in Tiere injiziert wurde, eine Demyelinisierung und einen Leitungsblock hervorrufen. Im Jahr 2001 fanden Yan et al., dass sich das Glykoprotein P0, das sich an peripheren Nerven befindet, eine Zielstruktur für die Antikörper darstellt. Ein anderes auch in der Pathogenese der CIDP vorkommendes Antigen ist das Gangliosid GM1. Ebenso wie bei dem GBS konnten Takigawa et al. (2000) auch für die chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie zeigen, dass GM1 Antikörper komplementabhängig und reversibel die Natriumkanäle in einzelnen myelinisierten Nervenfasern von Ratten blockiert und somit die Stromamplitude des Aktionspotenzials reduziert. Bei Patienten, die nur am GBS erkrankt waren und keine anti-GM1-Antikörper aufwiesen, wurden die Natriumkanäle nicht signifikant blockiert. Den Patienten wurden nach der therapeutischen Plasmapherese erneut Antikörper entnommen und getestet. Nach der Plasmapherese konnten die gezeigten Effekte nicht mehr hervorgerufen werden, was für einen antikörpervermittelten Effekt spricht. Saito und Yokota zeigten 1993 ebenfalls, dass das GM1-Antikörper enthaltende Serum bei Patienten mit CIDP zu einer Blockade von spannungsabhängigen Natriumkanälen führt, was wiederum einen Leitungsblock zur Folge haben kann. Hirota et al. fanden 1997 keinen signifikanten Leitungsblock, als sie GM1-Ak und Komplementfaktoren auf ventrale Wurzeln applizierten. Auch Benatar et al. (1999) konnten keinen Effekt von GM1-Ak auf Natriumkanäle von motorischen Nervenzelllinien (NSC 19) nachweisen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Untersuchungen teilweise in vitro und andere in vivo durchgeführt wurden. Das endotheliale Milieu, bestehend aus Bindegewebe, der Basalmembran und der endoneuralen Flüssigkeit, könnten die Aktivität der Antikörper oder Kanalfunktion beeinträchtigen.

Eine weitere Beobachtung ist, dass verschiedene Antikörperklassen verschiedene Wirkpotenzen besitzen. IgM Antikörper sind - auch vor dem Hintergrund, dass IgM-Ak stärker die klassische Komplementaktivierung hervorruft - wesentlich stärker an der Reduktion von Natriumströmen beteiligt als die der IgG Klasse (Takigawa et al., 2000). In unseren Experimenten verwendeten wir Antikörper der IgG-Fraktion, so dass dies ein weiterer Grund für eine signifikante, aber insgesamt gering ausgeprägte Natriumstromreduktion war.

Die Antikörper, die für unsere Experimente verwendet wurden, wurden nicht auf bestimmte Antigene getestet, sondern anhand von klinischen Daten der Patienten ausgewählt. Es kann demzufolge keine Aussage über das etwaige Vorliegen bestimmter anti-Glykolipid-Antikörpern getroffen werden. In unseren Experimenten kam es zu einer Reduktion der Einwärtsströme, die nach drei Minuten nicht reversibel war. Diese kann durch eine Natriumkanalblockade ausgelöst worden sein. Auch Takigawa et al. (2000) sowie Saito (1993) fanden diese Natriumkanalblockade.

Allerdings erklären diese Phänomene nicht das vermehrte Auftreten von Schmerzen. Bei neuropathischen Schmerzen erwartet man die Hochregulierung von Natriumkanälen am peripheren Nerv (Tanaka et al., 1998), die jedoch bei akuten Schmerzen nicht auftritt, sondern sich erst im Verlauf darstellt. Eine andere mögliche Erklärung ist jedoch eine durch die Antikörper hervorgerufene verminderte Übertragung von Informationen an das nozizeptive System durch Reduktion der Natriumströme. Dies wäre klinisch eher mit einer Hypästhesie zu erklären.

Insgesamt zeigt sich in dieser Untersuchung analog zu den Ergebnissen für die akute Form der demyelinisierenden Polyneuropathie bei der CIDP eine Verminderung der Einwärtsströme, die durch eine Natriumstrom- oder Kalziumstromblockade oder aber durch eine Erhöhung der Kaliumauswärtsströme verursacht werden kann, so dass es hier von Interesse ist, auch in Hinsicht auf eine mögliche Behandlung der Symptome, weitere Untersuchungen von spezifischen Ionenströmen durchzuführen.

4.2.6 Paraneoplastische Polyneuropathie

Motorische Beteiligung bei PNP

Bei Patienten mit rein motorischer paraneoplastischer Polyneuropathie waren Ein- und Auswärtsströme, Aktionspotenzialschwelle und Dauer dieser sowie das Ruhepotenzial vor und nach IgG Einwasch über einen Zeitraum von drei Minuten in einer Konzentration von 1 g/l nicht signifikant verändert. Analog zu den anderen Neuropathien ist als Ursache dafür eine fehlende Bindungsfähigkeit der Antikörper, die beim Patienten motorische Symptome hervorrufen, an sensible Strukturen möglich. Weiterhin gelten für die motorischen paraneoplastischen Antikörper dieselben Grundregeln, die im folgenden Kapitel für die sensiblen Neuropathien dargelegt sind.

Sensible Beteiligung der PNP

Antikörper von Patienten, die unter einer paraneoplastischen Polyneuropathie mit sensomotorischer (p < 0.05)Komponente litten. führten einer signifikanten Herabsetzung zu der Aktionspotenzialschwelle (Abb. 46). Die Auswärts- und Einwärtsströme, die Aktionspotenzialdauer und das Ruhepotenzial waren zwar nicht signifikant verändert, es zeigt sich jedoch eine deutliche Tendenz zur Verminderung der Auswärts- und somit der Kaliumströme, was eine Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit verursachen könnte. Es lagen in diesem Fall keine repetitiv feuernden Neurone vor, so dass unklar bleibt, ob nur die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen herabgesetzt wurde oder ob es auch zu einer Erhöhung der Feuerfrequenz kam.

Das Hu-Antigen als Ziel des anti-Hu-Antikörpers wird von allen neuronalen Zellkernen des ZNS und der Spinalganglien sowie in geringerem Maße auch deren Zytoplasma exprimiert (Dalmau et al., 1990). Das Hu-Antigen besitzt drei bekannte RNA-Bindungsstellen (Szabo et al., 1991). Weiterhin kann das Hu-Antigen in allen Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms gefunden werden. In der Literatur beschrieben ist die subakute sensorische Neuronopathie, eine paraneoplastische Erkrankung, die hauptsächlich bei Patienten mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom auftritt. In ihrem Zusammenhang treten anti-Hu-Antikörper auf, von denen unklar ist, ob sie pathogen sind oder lediglich einen diagnostischer Marker darstellen. Für die paraneoplastische Neuronopathie gibt es kein Tiermodell, das zum besseren Verständnis des Pathomechanismus beiträgt. Verschiedene Versuche, Tieren den anti-Hu Antikörper oder das Antigen zu injizieren, lösten zwar eine Antikörperaugmentation aus, führten jedoch nicht zu Symptomen einer Neuropathie (Sillevis-Smitt et al., 1995). Im Jahr 1996 konnte diese Arbeitsgruppe im Nervensystem von Ratten nach Immunisierung mit Hu-Antigen keine Antikörper wie beim Menschen finden. Daher postulierten sie für humane paraneoplastiche Syndrome einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke oder den Transport von Lymphozyten in das Nervensystem, damit diese dort Antikörper produzieren können.

Dass Hu-Antikörper an der Pathogenese beteiligt sein könnten, zeigten Greenlee et al. 1993 in einem in-vitro Experiment. Sie wiesen eine durch menschliche Hu-Antikörper induzierte Zelllyse in Körnerzellkulturen von Rattenkleinhirn nach. Hierbei konnten als Negativkontrolle verwendete Antikörper gesunder Probanden nicht im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden. Dies diente als Hinweis auf eine komplementgetriggerte Internalisation der pathologischen Antikörper. Zu einem geringeren Anteil können auch nicht pathologische Antikörper über unspezifische Endozytose in Zellen aufgenommen werden, die in der Immunfluoreszenz jedoch aufgrund ihrer geringen Menge nicht abgebildet werden (Greenlee et al., 1993; Hormigo & Liebermann, 1994). Insgesamt ist jedoch die Hypothese pathogener Effekte von Autoantikörpern gegen intrazelluläre Antigene äußerst umstritten. Der mutmaßliche Wirkort der Antikörper in der Zelle ist die neuronenspezifische RNA-Prozessierung, die eine Rolle in der neuronalen Entwicklung spielt (Greenlee et al., 1993; Sillevis-Smitt et al., 1996; Szabo et al., 1991). Ein weiterer Wirkort der Hu-Antikörper liegt im Plexus myentericus. De Giorgio et al. (2003) zeigten, dass Neurone aus Zellkulturen des Plexus myentericus komplementunabhängig durch Hu-Antikörper lysiert werden können. Dass Serum von Patienten mit Anti-Hu positiver Neuronopathie toxisch ist, fanden auch Verschuuren et al. (1997). Sie untersuchten verschiedene Tumorzelllinien auf den zytotoxischen

Effekt von Serum, IgG und IgG freiem Serum. Sowohl das IgG freie Serum als das Serum mit IgG wiesen eine zytotoxische Wirkung auf, die sich sowohl in Hu-positiven als auch -negativen Zellen entwickelten. Dies spricht für eine zytotoxische Wirkung, die nicht durch Antikörper allein hervorgerufen wird.

In Autopsiestudien konnten anti-Hu Antikörper an Spinalganglienneuronen beim Menschen mit subakuter sensorischer Neuronopathie nachgewiesen werden (Dhib-Jalbut & Liwnic, 1986; Graus et al., 1988; Dalmau et al., 1991). Diese wurden hauptsächlich in *nuclei*, nicht aber im Zytoplasma gefunden (Yamada et al., 1994). Zusätzlich fand sich eine umgebende Entzündungsreaktion, die je nach Arbeitsgruppe aus zellulären und/oder humoralen Infiltraten bestand. Graus et al. (1990) beschrieben hauptsächlich mononukleäre Zellen, die aus T-Zellen bestanden, begleitet von IgG-Ablagerungen in der Peripherie der Neurone. Jean et al. (1994) fanden perivaskuläre Infiltrate bestehend aus B- und T-Zellen, zusätzlich interstitielle T-Zellen und vereinzelte B-Zellen sowie intraneuronale IgG-Ablagerungen. Panegyres et al. (1993) konnten nur T-Zellen und weder B-Zellen noch IgG nachweisen. Wanschitz et al. (1997) fanden neben IgG zusätzlich T-Helferzellen als Ursache der Ganglionitis bei der subakuten sensorischen Neuronopathie. Drlicek et al. (2000) fanden ähnliche Ergebnisse bei einer Hu-negativen paraneoplastischen Neuropathie.

Die in dieser Untersuchung fehlende Signifikanz der Veränderungen der Ströme kann verschiedene Ursachen haben. Wie bereits erwähnt, ist es umstritten, ob Antikörper allein überhaupt die Krankheit auslösen, oder ob sie nur eine antikörpervermittelte zelluläre Entzündung bewirken, wie sich dies in den zuvor erwähnten pathologischen Präparaten gezeigt hat. Verschiedene Studien weisen auf die intrazelluläre Lokalisation des Hu-Antigen hin. So fanden Hormigo et al. (1994) eine Antikörperreaktivität zuerst in dem Zytoplasma der HuD-positiven Zellen und kurz darauf auch im Zellkern. Die Reaktionszeit hing dabei von der anti-Hu IgG Präparation und der Zelllinie ab. Innerhalb von 1-4 Stunden konnte bei NCI-H69 Zellen intrazelluläres IgG angefärbt werden, wohingegen es bis zu 24 Stunden dauerte, bis in PC12 Zellen Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Aufnahme des Antikörpers in die Zelle könnte durch kreuzreagierende Epitope, die sich auf der Zelloberfläche befinden, Fc-getriggerten Transport des Antikörpers in die Zelle oder unspezifische Endozytose bewirkt werden (Hormigo et al., 1994; Adamus et al., 1997). Die fehlende Veränderung der Ionenströme durch die IgG Fraktionen an den Zellen in unseren Experimenten könnte dadurch bedingt sein, dass die Antikörper nicht direkt an Ionenkanäle an der Zelloberfläche binden, da sich dort die entsprechenden Antigene nicht befinden. Der Prozess der

Internalisierung der Antikörper und die erst sehr viel später stattfindende Reaktion im Zellinneren kann mit dem in der Arbeit verwendeten Ansatz nach wenigen Minuten nicht erfasst werden.

Insgesamt sind die Ergebnisse aus den vorliegenden Experimenten mit bekannten Studienergebnissen gut vereinbar. Allerdings wäre es interessant zu untersuchen, ob anti-Hu Antikörper in vitro nicht nur im Zytoplasma und den *nuclei* von Spinalganglienneuronen nachgewiesen werden können, sondern ob sie dort auch einen durch Antikörper vermittelten Effekt auslösen können. Dazu ist die Durchführung weiterer Studien erforderlich. Denn reversible Effekte, die an Neuronen entstehen, können nicht durch Apoptose, die sowohl an Plexus myentericus Neuronen als auch an Körnerzellen aus Kleinhirnen beschrieben sind, erklärt werden, da dies ein irreversibler Prozess ist. Interessant ist die in den von uns durchgeführten Experimenten erhöhte Erregbarkeit der Neurone nach Antikörperapplikation. Dies kann aufgrund der intrazellulären Lage des anti-Hu Antigens nur ein unspezifischer Effekt der Antikörper sein, zum Beispiel hervorgerufen durch eine Kaliumkanalblockade. Es wäre in dieser Hinsicht sicher interessant gewesen, selektiv die Kaliumkanäle zu untersuchen. Klinisch erklärt eine resultierende vermehrte Bildung von Aktionspotenzialen in nozizeptiven Fasern gut das vermehrte Auftreten von Schmerzen.

4.2.7 Sensible Polyneuropathie mit IgG und IgM Antikörpern bei IgG-MGUS

Die Immunglobulinfraktion, die aus Seren von Patienten von monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz vom Typ IgG mit sensibler Neuropathie gewonnen wurden, lösten eine signifikante und reversible Erniedrigung der Auswärtsströme aus. Diese bestehen zu einem Großteil aus Kaliumionen. Unter der Vorstellung, dass Kaliumströme nach dem Aktionspotenzial zu einer Repolarisation der Zellmembran führen, kann eine Kaliumkanalblockade zu einer Verlängerung des Aktionspotenzials und einer Erniedrigung der Aktionspotenzialschwelle führen, was sich im Experiment allerdings nicht niederschlägt. Repetitiv feuernde Neurone lagen leider bei dieser Messreihe nicht vor, so dass über eine mögliche Zunahme der Feuerfrequenz keine Aussage getroffen werden kann. Allerdings ist eine Abnahme des Kaliumstromes mit einer klinisch beobachteten vermehrten Aktionspotenzialbildung vereinbar. Somit rufen die Antikörper der IgG und IgM-Klasse bei dieser Polyneuropathie mit den klinischen Beobachtungen übereinstimmende Effekte an Spinalganglienneuronen hervor.

Hiermit könnten Antikörper prinzipiell nicht nur einen diagnostischen Marker, sondern tatsächlich eine die Krankheit auslösende Entität darstellen.

Die signifikante Reduktion der Auswärtsströme, die jedoch ohne Veränderung der Aktionspotenziale einhergeht, könnte durch eine schlechte Verfügbarkeit des Antikörpers an der Zellmembran durch das umliegende Bindegewebe bedingt sein. In immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich bei Paparounas et al. (1999), dass Antikörper unter bestimmten Inkubationskonditionen und vor allem Superfusionsdauern nicht zu den entsprechenden Bindungsstellen am Neuron vordringen konnten. Aber auch unter besseren Untersuchungsbedingungen zeigte sich lediglich eine Ablagerung der Antikörper und der Komplementfaktoren an den erwarteten Antigenen, eine Änderung der elektrophysiologischen Parameter war nicht detektierbar.

4.3 Klinischer Ausblick

Insgesamt konnte mit Hilfe der *patch-clamp* Technik an Spinalganglienneuronen eine akute antikörpervermittelte, komplementunabhängige Reaktion durch Immunneuropathien festgestellt werden.

Interessanterweise lösten Antikörper von Patienten mit motorischen Immunneuropathien keine Effekte aus, wohl aber Antikörper von Patienten mit sensiblen Störungen. Dies weist auf eine gezielte und spezifische Reaktion der Antikörper mit einem bestimmten Antigen hin, das noch genauer bestimmt werden muss. Statistisch signifikante Effekte ließen beim sensiblen GBS und CIDP sowie der sensiblen Polyneuropathie mit IgG und IgM-Antikörpern bei IgG-MGUS nachweisen, wodurch dem Antikörper eine direkte pathogene Rolle zugesprochen werden kann. Bei den paraneoplastischen Neuropathien ließ sich kein akuter antikörpervermittelter Effekt nachweisen, was die bestehende These stützt, dass das Antigen intrazellulär lokalisiert ist und weitere Faktoren wie Komplement und eine durch inflammatorische Zellen hervorgerufene Reaktion zu Grunde liegen.

Um Aussagen darüber treffen zu können, welche Ionenströme durch die Antikörper genau alteriert wurden, ist es von Nöten mit Hilfe von Kanalblockern und einer Variation der verwendeten Innenund Außenlösungen die betroffenen Ionenkanaltypen zu bestimmen, damit der genaue Mechanismus der Erkrankungen besser verstanden werden kann. Durch genaue Lokalisation des Epitops der Antikörperreaktion könnte eine gezielte Therapie durchgeführt und schon im Frühstadium der Verlauf von Erkrankungen günstig beeinflusst werden.

Zwar sind limitierende Faktoren in der Therapie der verschiedenen Neuropathien nicht die Schmerzen, die die Patienten erleiden, sondern die motorischen und autonomen Störungen, die insbesondere beim Guillain-Barré Syndrom auftreten und zu verheerenden Folgen führen können wie beispielsweise der peripheren Atemlähmung, der Bildung tiefer Beinvenenthrombosen und Ablösung einer Lungenarterienembolie infolge peripherer Extremitätenlähmungen oder der autonomen Dysregulation mit Ausbildung von Herzrhythmusstörungen.

Sie können jedoch helfen, beim wachen Patienten die Lebensqualität in der Phase großer Schmerzen gezielt zu verbessern. Interessant wäre auch, ob durch kompetitive Hemmung an Ionenkanälen wie zum Beispiel durch 3,4 Diaminopyridin an Kaliumkanälen beim LEMS eine Wirkung erzielt werden kann (Maddison & Newsom-Davis, 2005). Positiv wäre ein Schutz der betroffenen Kanäle durch Substanzen, die nicht nur Schmerzen reduzieren könnten, sondern außerdem eine Verminderung des Schmerzempfindens, das als Schutzorgan wichtige Aufgaben wahrnimmt, verhindern.

5 Zusammenfassung

In dieser experimentellen Arbeit wurden IgG-Fraktionen von Patienten mit verschiedenen entzündlichen Polyneuropathien mit Hilfe der *patch-clamp* Technik auf ihren akuten Effekt an Hinterwurzelganglienneuronen von Ratten getestet. Die Hinterwurzelganglienneurone von jungen Ratten wurden mit Hilfe einer speziellen slice-Technik präpariert. Es erfolgten Messungen der gesamten Ionenströme und der Aktionspotenziale in HEPES-Lösung, drei Minuten nach Antikörpersuperfusion und drei Minuten nach Auswasch einer Antikörperfraktion mit HEPES-Lösung. Als Negativkontrollen wurden IgG-Fraktionen von neurologisch gesunden Probanden und als Positivkontrolle IgG-Fraktionen von Patienten mit Lambert-Eaton-Syndrom verwendet.

Hierbei ergaben sich für die Kontrollseren von gesunden Patienten keine Änderungen in den jeweils untersuchten Parametern. Die Positivkontrollen mit Antikörpern gegen spannungsabhängige Kalziumkanäle bei Lambert-Eaton-Syndrom (LEMS) zeigten eine Reduktion der Spitzeneinwärtsströme wie sie bei einer Kalziumkanalblockade, die beim LEMS typisch ist, vorkommt. Damit ist das Modell grundsätzlich für Untersuchungen dieser Art geeignet.

Bei der Untersuchung entzündlicher Polyneuropathien wie dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS), der chronischen inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) und paraneoplastischen Polyneuropathien wurde zwischen rein motorischen und sensiblen Formen unterschieden. Bei rein motorischem GBS und CIDP fanden sich vor und nach IgG-Applikation keine Änderungen der gemessenen Parameter. Die IgG-Applikation von Patienten mit GBS und CIDP mit sensibler Beteiligung erbrachte eine Reduktion der Einwärtsströme unter IgG Superfusion, was für einen akuten Effekt der Antikörper spricht. Hierbei kann es sich um eine Reduktion der Natriumströme oder der Kalziumströme handeln oder durch eine Erhöhung der Auswärtsströme um eine Pseudoeinwärtsstromreduktion. Diese erklärt jedoch als klinisches Korrelat nicht das vermehrte Auftreten von Schmerzen, sondern eher eine Hypästhesie.

Bei der paraneoplastischen Neuropathie, bei der als Kreuzreaktion Antikörper gegen neuronale Strukturen auftreten, von denen nicht geklärt ist, ob sie nur einen diagnostischen Marker darstellen oder pathogen wirksam sind, verursachten die IgG von Patienten keine Änderung der Ionenströme. Die Schwelle zur Auslösung von Aktionspotenzialen war allerdings herabgesetzt, was zum vermehrten Auftreten von Schmerzen passt. Ursächlich für eine fehlende Alteration der Ströme können ein komplizierter Aufnahmemechanismen der Antikörper in die Zelle bei intrazellulärer Lage des Antigens sein oder ein zusätzliches Erfordernis von Komplement und Enzündungszellen.
Bei der sensiblen Polyneuropathie mit IgG und IgM-Antikörpern bei MGUS konnte eine deutliche Reduktion der Auswärtsströme, die vereinbar ist mit einer Kaliumstromblockade, nachgewiesen werden. Dies führt zu einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit, wozu als klinisches Korrelat ein vermehrtes Schmerzempfinden passt.

Diese Experimente zeigen, dass IgG Antikörper von Patienten mit sensiblen Immunneuropathien einen akuten Effekt an Hinterwurzelganglienneuronen auslösen. Die beobachteten Phänomene weisen auf eine hohe Spezifität der jeweils produzierten Antikörper hin, da die von Patienten produzierten Antikörper nur auf ganz bestimmte Antigene reagieren. Zur Spezifizierung der Ionenkanäle ist jedoch eine weitere Testung an Einzelkanälen oder zumindest mit Blockern für bestimmte Ionenkanäle erforderlich.

6 Summary

In this study we examined the effect of different IgG-fractions of patients with different neuropathies on rat DRG neurones by means of the *patch-clamp* technique. The neurons were prepared in a special thin-slice technique. We recorded inward-, outward-currents and action potentials in HEPES-solution, three minutes after antibodysuperfusion and after three minutes of washout in HEPES-solution. The system was tested with IgG by controls from healthy volunteers. As a positive control we used antibodies against voltage-gated-calcium-channel from a patient with Lambert-Eaton-Syndrome (LEMS)

Healthy controls did not reveal any changes in the recorded parameters. Positive controls with LEMS-antibodies revealed decreased inward currents as in a calcium channel blockade typical of LEMS. This shows that the system is an acceptable model for the study.

For inflammatory neuropathies such as Guillain-Barré-Syndrom (GBS), chronic inflammatory demyelinating Polyneuropathy (CIDP) and paraneoplastic Neuropathy we split the groups into motor and sensory according to their clinical features. None of the patients with motor symptoms only revealed any significant change in the recorded parameters. The sensory GBS and CIDP showed a decrease of inward currents, which can be explained by a sodium-channel-blockade, a calcium-channel-blockade or an pseudo-inward-current-reduction by an increase of outward currents. That does not explain pain but reflects the clinical situation of hypaesthesia.

In the sera of patients with paraneoplastic neuropathies exist antibodies. It is still unclear, whether these antibody are only a diagnostic marker or whether they are pathogenic themselves. In this study IgG from patients with paraneoplastic neuropathy showed an increased excitability of the neurons matching the clinical symptoms of pain but did not show any changes in the currents. This might be caused by a complicated mechanism of internalizing the antibody, an intracellular position of the antigene or the need of complement and inflammatory cells.

Antibodies from patients with sensory Polyneuropathy with IgG and IgM-Antibodies in MGUS caused a significant decrease in outward currents revealing a potassium-channel blockade. This causes an increased excitability explaining the clinical condition of pain.

This study shows that IgGs of patients with sensory immunoneuropathies do effect ion channels in sensory neurones. The observations reveal great specificity of the produced antibody as they react only with certain antigenes.

It might be interesting to investigate single channels or to examine specific ionic currents (i.e. potassium or sodium), as they might reveal an underlying specific mode of action.

Literaturverzeichnis

Adamus G, Machnicki M, Seigel GM. Apoptotic retinal cell death induced by antirecoverin autoantibodies of cancer-associated retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997; 38: 283-91.

Alamowitch S, Graus F, Uchuya M, Reñé R, Bescansa E, Delattre JY. Limbic encephalitis and small cell lung cancer. Clinical and immunological features. Brain. 1997;120: 923-8.

Allen D, Giannopoulos K, Gray I, Gregson N, Makowska A, Pritchard J, Hughes RA. Antibodies to peripheral nerve myelin proteins in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. J Peripher Nerv Syst. 2005;10:174-80.

Alter M. The epidemiology of Guillain-Barré syndrome. Ann Neurol. 1990; 27 Suppl:S7-12.

Ameis A, Ko HS, Pruzanski W. M-Components - a review of 1242 cases. Can Med Assoc J. 1976;114: 889-92, 895.

Anderson NE, Posner JB. Antineuronal autoantibodies in neurologic paraneoplastic syndromes. Ann N Y Acad Sci. 1988; 540: 440-1.

Andres KH. [Research on the fine-structure of spinal ganglia.] Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1961;55:1-48.

Ang CW, Yuki N, Jacobs BC, Koga M, van Doorn PA, Schmitz PIM, et al. Rapidly progressive, predominantly motor Guillain-Barré syndrome with anti-GalNAc-GD1a antibodies. Neurology 1999; 53: 2122–7.

Antoine JC, Mosnier JF, Absi L, Convers P, Honnorat J, Michel D. Paraneoplastic demyelinating neuropathy, subacute sensory neuropathy, and anti-Hu antibodies: clinicopathological study of an autopsy case. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1999; 67:7-14.

Applegate C, Burke D. Changes in excitability of human cutaneous afferents following prolonged high-frequency stimulation. Brain. 1989; 112: 147-64.

Arasaki K, Kusunoki S, Kudo N, Kanazawa I. Acute conduction block in vitro following exposure to antiganglioside sera. Muscle Nerve 1993; 16: 587-93.

Augustine GJ, Charlton MP, Smith SJ. Calcium action in synaptic transmitter release. Ann Rev Neurosci. 1987; 10: 633-93.

Axelsson U, Bachmann R, Hällén J. Frequency of pathological proteins (M-components) on sera from an adult population. Acta Med Scand. 1966; 179: 235-47.

Bakheit AM, Kennedy PG, Behan PO. Paraneoplastic limbic encephalitis: clinico-pathological correlations. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1990; 53: 1084-8.

Benatar M, Willison HJ, Vincent A. Immune-mediated peripheral neuropathies and voltage-gated sodiums channels. Muscle Nerve 1999; 22: 108-10.

Bernstein, J. Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme. Erster Teil. Pflügers Archiv 1902; 92: 561-562.

Bird SJ, Brown J, Shy ME, Scherer SS. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy associated with malignant melanoma. Neurology 1996; 46: 822-24.

Birinyi-Strachan LC, Gunning SJ, Lewis RJ, Nicholson GM. Block of voltage-gated potassium channels by Pacific ciguatoxin-1 contributes to increased neuronal excitability in rat sensory neurons. Toxicol Appl Pharmacol. 2005; 204: 175-86.

Blaes F, Klotz M, Huwer H, Straub U, Kalweit G, Schimrigk K, Schäfers HJ. Antineural and antinuclear autoantibodies are of prognostic relevance in non-small-cell-lung-cancer. Ann Thorac Surg. 2000; 69: 254-8.

Blaes F, Strittmatter M, Merkelbach S, Jost V, Klotz M, Schimrigk K, Hamann GF. Intravenous immunoglobulins in the therapy of paraneoplastic neurological disorders. J Neurol 1999; 246: 299-303

Blaes F, Strittmatter M, Schwamborn J, Heide G, Hamann GF, Merkelbach S, Schimrigk K. Antineuronal antibody-associated paraneoplastic neuropathy in Hodgkin's disease. Eur J Neurol. 1998; 5: 109-112.

Boroujerdi A, Kim HK, Lyu YS, Kim DS, Figueroa KW, Chung JM, Luo ZD. Injury discharges regulate calcium channel alpha-2-delta-1 subunit upregulation in the dorsal horn that contributes to initiation of neuropathic pain. Pain. 2008; 139: 358-66.

Boukhris S, Magy L, Khalil M, Sindou P, Vallat JM. Pain as the presenting symptom of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP). J Neurol Sci. 2007; 254: 33-8.

Breman JG, Hayner NS. Guillain-Barré syndrome and its relationship to swineinfluenza vaccination in Michigan, 1976-1977. Am J Epidemiol 1984; 119: 880–9.

Buchwald B, Ahangari R, Toyka KV. Differential blocking effects of the monoclonal anti-GQ1b IgM antibody and alpha-latrotoxin in the absence of complement at the mouse neuromuscular junction. Neurosci Lett. 2002B; 334: 25-8.

Buchwald B, Ahangari R, Weishaupt A, Toyka KV. Intravenous immunoglobulins neutralize blocking antibodies in Guillain-Barré syndrome. Ann Neurol 2002a; 51: 673-80.

Buchwald B, Ahangari R, Weishaupt A, Toyka KV. Presynaptic effects of immunoglobulin G from patients with Lambert-Eaton myasthenic syndrome: their neutralization by intravenous immunoglobulins. Muscle Nerve. 2005; 31: 487-94.

Buchwald B, Toyka KV, Zielasek J, Weishaupt A, Schweiger S, Dudel J. Neuromuscular blockade by IgG antibodies from patients with Guillain-Barré syndrome: a macro-patch-clamp study. Ann Neurol 1998a; 44: 913-22.

Buchwald B, Weishaupt A, Toyka KV, Dudel J. Pre- and postsynaptic blockade of neuromuscular transmission by Miller-Fisher syndrome IgG at mouse motor nerve terminals. Eur J Neurosci. 1998B; 10: 281-90.

Buchwald B, Zhang G, Vogt-Eisele AK, Zhang W, Ahangari R, Griffin JW, Hatt H, Toyka KV, Sheikh KA. Anti-ganglioside antibodies alter presynaptic release and calcium influx. Neurobiol Dis. 2007; 28: 113-21.

Buckley C, Oger J, Clover L, Tüzün E, Carpenter K, Jackson M, Vincent A. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. Ann Neurol. 2001; 50: 73-8.

Bunn PA, Ridgway EC. Paraneoplastic syndromes. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Cancer: principles and practice of oncology, 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1989: 1910-6

Camdessanché JP, Antoine JC, Honnorat J, Vial C, Petiot P, Convers P, Michel D. Paraneoplastic peripheral neuropathy associated with anti-Hu antibodies. A clinical and electrophysiological study of 20 patients. Brain. 2002; 125: 166-75.

Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Kanazawa I. Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller-Fisher syndrome and Guillain-Barré syndrome: clinical

and immunohistochemicalstudies. Neurology. 1993; 43: 1911-7.

Chiba A, Kusunoki S, Shimizu T, Kanazawa I. Serum IgG antibody to ganglioside GQ1b is a possible marker of Miller Fisher syndrome. Ann Neurol 1992; 12: 677-679.

Clark SL. Nissl Granules of primary afferent neurones. J Comp Neurol 1926; 41: 423-451.

Cole KS, Curtis HJ. Electric impedance of the squid giant axon during activity. J Gen Physiol. 1939; 22: 649-70.

Corsellis JA, Goldberg GJ, Norton AR. "Limbic encephalitis" and its association with carcinoma. Brain. 1968; 91: 481-96.

Cowan AI, Martin RL. Simultaneous measurement of pH and membrane potential in rat dorsal vagal motoneurons during normoxia and hypoxia: a comparison in bicarbonate and HEPES buffers. Neurophysiol. 1995; 74: 2713-21.

Cull-Candy SG, Miledi R, Trautmann A, Uchitel OD. On the release of transmitter at normal, myasthenia gravis and myasthenic syndrome affected human end-plates. J Physiol 1980, 299: 621-38.

Cummins TR, Black JA, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. J Neurosci. 2000 1; 20: 8754-61.

Dalakas MC, Engel WK. Immunoglobulin and complement deposits in nerves of patients with chronic relapsing polyneuropathy. Arch Neurol. 1980; 37: 637-40.

Dalmau J, Clouston PD. Paraneoplastic syndromes. Neurology. 1992; 42:1429.

Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. Am J Pathol. 1992; 141: 881-6.

Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer - a quantitative western blot analysis. Ann Neurol. 1990; 27: 544-52.

Dalmau J, Furneaux HM, Rosenblum MK, Graus F, Posner JB. Detection of the anti-Hu antibody in specific regions of the nervous system and tumor from patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. Neurology. 1991; 41: 1757-64.

Dalmau J, Gultekin HS, Posner JB. Paraneoplastic neurologic syndromes: pathogenesis and physiopathology. Brain Pathol. 1999; 9: 275-84.

Dalmau J, Posner JB. Neurological paraneoplastic syndromes. Springer Semin Immunopathol. 1996; 18: 85-95.

Dalmau JO, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. Semin Oncol. 1997; 24: 318-28.

Dalmau JO, Posner JB. Paraneoplastic syndromes. Arch Neurol. 1999; 56: 405-8.

Darnell RB, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. Semin Oncol. 2006; 33: 270-98.

De Giorgio R, Bovara M, Barbara G, Canossa M, Sarnelli G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Cappello S, Pagnotta E, Nobile-Orazio E, Corinaldesi R. Anti-HuD-induced neuronal apoptosis underlying paraneoplastic gut dysmotility. Gastroenterology. 2003; 125: 70-9.

Devaux J, Beeton C, Béraud E, Crest M. Ion channels and demyelination: basis of a treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by potassium channel blockers. Rev Neurol (Paris). 2004; 160: S16-27.

Devaux JJ, Kleopa KA, Cooper EC, Scherer SS. KCNQ2 is a nodal K+ channel. J Neurosci 2004; 24: 1236-44.

Dhib-Jalbut S, Liwnicz BH. Immunocytochemical binding of serum IgG from a patient with oat cell tumor and paraneoplastic motoneuron disease to normal human cerebral cortex and molecular layer of the cerebellum. Acta Neuropathol. 1986; 69: 96-102.

Drewe JA, Verma S, Frech G, Joho RH. Distinct spatial and temporal expression patterns of K+ channel mRNAs from different subfamilies. J Neurosci. 1992; 12: 538-48.

Drlicek M, Bodenteich A, Setinek U, Tucek G, Urbanits S, Grisold W. T-cell-mediated paraneoplastic ganglionitis - An autopsy case. Acta Neuropathol. 2000; 99: 599-602.

Dyck PJ, Daube J, O Brian P, Pineda A, Low PA, Windebank AJ, Swanson C. Plasma exchange in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. N Engl J Med 1986; 314: 461-5.

Dyck PJ, Low PA, Windebank AJ, Jaradeh SS, Gosselin S, Bourque P, Smith BE, Kratz KM, Karnes JL, Evans BA et al.. Plasma exchange in polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med. 1991; 325: 1482-6.

Dyck PJ, Thomas PK, Griffin JW, Low PA, Poduslo JF. Peripheral neuropathy. Philadelphia: WB Saunders, 1993: 1498-1517

Dyck PJ. Current concepts in neurology. The causes, classification, and treatment of peripheral neuropathy. N Engl J Med, 1982; 30: 283-6.

Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T. A thin slice preparation for patch-clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. Pflugers Arch. 1989; 414: 600-12.

Eftimov F, Winer JB, Vermeulen M, de Haan R, van Schaik IN. Intravenous immunoglobulin for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Cochrane Database Syst Rev. 2009; 21; CD001797.

Ellie E, Vital A, Steck A, Boiron JM, Vital C, Julien J. Neuropathy associated with "benign" antimyelin-associated glycoprotein IgM gammopathy: clinical, immunological, neurophysiological pathological findings and response to treatment in 33 cases. J Neurol. 1996; 243: 34-43.

Elmqvist D, Lambert EH. Detailed analysis of neuromuscular transmission in a patient with the myasthenic syndrome sometimes associated with bronchogenic carcinoma. Mayo Clin Proc 1968, 43, 689-713.

Elrington G, Newsom-Davis J. Handbook of Myasthenia Gravis and Myasthenic Syndromes (Lisak RP, ed.) Marcel Dekker, New York, pp.81-102, 1994

Engel AG, Lambert EH, Gomez MR. End-plate acetylcholinesterase deficiency associated with small nerve terminals and reduced acetylcholine release. A new syndrome. Int J Neurol. 1980; 14: 73-86.

Engisch KL, Rich MM, Cook N, Nowycky MC. Lambert-Eaton antibodies inhibit Ca2+ currents but paradoxically increase exocytosis during stimulus trains in bovine adrenal chromaffin cells. J Neurosci. 1999; 19: 3384-95.

England S., Bevan, S, Docherty R.J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. J.Physiol. 1996; 495: 429-440

Eurelings M, Ang CW, Notermans NC, Van Doorn PA, Jacobs BC, Van den Berg LH. Antiganglioside antibodies in polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy. Neurology. 2001; 57: 1909-12.

Everill B, Kocsis JD. Reduction in potassium currents in identified cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons after axotomy. J Neurophysiol. 1999; 82: 700-8.

Feasby TE, Gilbert JJ, Brown WF et al.. An acute axonal form of Guillain-Barré polyneuropathy. Brain 1986; 109: 1115-26.

Feasby TE, Hughes RAC. Campylobacter jejuni, anti-ganglioside antibodies, and Guillain-Barré syndrome. Neurology 1998; 51: 340-2.

Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and Calcium Channels in Bovine chromaffine cells. J Physiol. 1982; 331: 599-635.

GBS Study Group. GBS: an italian multi-centre case-control study. GBS study group, Neurol. Sci, 2000; 21: 229-234.

Glazebrook PA, Ramirez AN, Schild JH, Shieh CC, Doan T, Wible BA, Kunze DL. Potassium channels Kv1.1, Kv1.2 and Kv1.6 influence excitability of rat visceral sensory neurons. J Physiol. 2002; 541: 467-82.

Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxinresistant Na+ current in nociceptors., Proc Natl Acad. Sci.1996; 93: 1108-12.

Gong Y, Tagawa Y, Lunn MP, Laroy W, Heffer-Lauc M, Li CY, Griffin JW, Schnaar RL, Sheikh KA. Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. Brain. 2002; 125: 2491-506.

Gorson KC, Allam G, Ropper AH. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: clinical features and response to treatment in 67 consecutive patients with and without a monoclonal gammopathy. Neurology 1997; 48: 321-8.

Gosselin S, Kyle RA, Dyck PJ. Neuropathy associated with monoclonal gammopathies of undetermined significance. Ann Neurol. 1991; 30: 54-61.

Gould HJ 3rd, England JD, Liu ZP, Levinson SR. Rapid sodium channel augmentation in response to inflammation induced by complete Freund's adjuvant. Brain Res. 1998; 802: 69-74.

Gratacós E, Ghelardini C, Gherardini LM, Galeotti N, Murphy KJ, Bartolini A, Regan CM. Kv1.1 channel antisense attenuates learning and modulation of dentate polysialylated NCAM. Neuroreport. 1998; 9: 2727-31.

Graus F, Dalmau J, Reñé R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Viñolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, Mason WP, Rosell R, Posner JB, Real FX. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. J Clin Oncol. 1997B; 15: 2866-72.

Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, Ferrer I, Reñe R, Marin C, Vecht CJ, Arbizu T, Targa C, Moll JW. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. J Neuroimmunol. 1997a; 74: 55-61.

Graus F, Elkon KB, Cordon-Cardo C, Posner JB. Sensory neuronopathy and small cell lung cancer. Antineuronal antibody that also reacts with the tumor. Am J Med. 1986; 80: 45-52.

Graus F, Pou A, Kanterewicz E, Anderson NE. Sensory neuronopathy and Sjögren's syndrome: clinical and immunologic study of two patients. Neurology 1988; 38: 1637-9.

Graus F, Ribalta T, Campo E, Monforte R, Urbano A, Rozman C. Immunohistochemical analysis of the immune reaction in the nervous system in paraneoplastic encephalomyelitis. Neurology 1990; 40: 219-22.

Graus F, Saiz A, Lai M, Bruna J, López F, Sabater L, Blanco Y, Rey MJ, Ribalta T, Dalmau J. Neuronal surface antigen antibodies in limbic encephalitis: clinical-immunologic associations. Neurology 2008 16; 71: 930-6.

Greenlee JE, Parks TN, Jaeckle KA. Type IIa ('anti-Hu') antineuronal antibodies produce destruction of rat cerebellar granule neurons in vitro. Neurology 1993; 43: 2049-54.

Griffin JW, Li CY, Ho TW, et al.. Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. Ann Neurol 1996a; 39: 17-28.

Griffin JW, Li CY, HoTW, et al.. Guillain-Barré syndrome in northern China: the spectrum of neuropathological changes in clinically defined cases. Brain 1995; 118: 577-95.

Griffin JW, Li CY, Macko C, et al.. Early nodal changes in the acute motor axonal neuropathy pattern of Guillain-Barré syndrome. J Neurolcytol 1996b; 25: 33-51.

Gross ML, Craggs RI, King RH, Thomas PK. The treatment of experimental allergic neuritis by plasma exchange. J Neurol Sci. 1983; 61: 149-60.

Gruss M, Ettorre G, Stehr AJ, Henrich M, Hempelmann G, Scholz A. Moderate hypoxia influences excitability and blocks dendrotoxin sensitive K+ currents in rat primary sensory neurones. Mol Pain. 2006; 2: 12.

Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. Brain. 2000; 123: 1481-94.

Hadden RD, Cornblath DR, Hughes RA, et al.. Electrophysiological classification of Guillain-Barré syndrome: clinical associations and outcome: Plasmaexchange/Sandglobulin Guillain-Barré Syndrome Trial Group. Ann Neurol 1998; 44: 780-8

Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, et al. Immune attack on the Schwann cellsurface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. Ann Neurol 1996; 39:625–35.

Hahn AF, Bolton CF, Pillay N, Chalk C, Benstead T, Bril V, Shumak K, Vandervoort MK, Feasby TE. Plasma-exchange therapy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A doubleblind, sham-controlled, cross-over study. Brain 1996; 119: 1055-66.

Hahn AF. Guillain-Barré syndrome. Lancet 1998; 352: 635-41.

Halstead SK, O'Hanlon GM, Humphreys PD, Morrison DB, Morgan BP, Todd AJ, Plomp JJ, Willison HJ. Anti-disialoside antibodies kill perisynaptic Schwann cells and damage motor nerve terminals via membrane attack complex in a murine model of neuropathy. Brain 2004; 127: 2109-23.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch. 1981;

391: 85-100.

Han HC, Lee DH, Chung JM. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. Pain 2000; 84: 253-61.

Hao Q, Saida T, Kuroki S, Nishimura M, Nukina M, Obayashi H, Saida K. Antibodies to gangliosides and galactocerebroside in patients with Guillain-Barré syndrome with preceding Campylobacter jejuni and other identified infections. J Neuroimmunol. 1998; 81: 116-26.

Hao Q, Saida T, Yoshino H, Kuroki S, Nukina M, Saida K. Anti-GalNAc-GD1a antibodyassociated Guillain-Barré syndrome with a predominantly distal weakness without cranial nerve impairment and sensory disturbance. Ann Neurol 1999; 45: 758–68.

Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. J Physiol. 1985a; 359: 31-46.

Harper, AA und Lawson SN. Electrical properties of rat DRG neurones with different peripheral nerve conduction velocities. J Physiol 1985b; 359: 47-63.

Hart IK, Waters C, Vincent A, Newland C, Beeson D, Pongs O, Morris C, Newsom-Davis J. Autoantibodies detected to expressed K+ channels are implicated in neuromyotonia. Ann Neurol. 1997;41: 238-46.

Hartung HP, Pollard JD, Harvey GK, Toyka KV. Immunopathogenesis and treatment of the Guillain-Barré syndrome Part I. Muscle Nerve 1995; 18: 137–53.

Hays AP, Latov N, Takatsu M, Sherman WH. Experimental demyelination of nerve induced by serum of patients with neuropathy and an anti-MAG IgM M-protein. Neurology. 1987; 37: 242-56.

Hays AP, Lee SS, Latov N. Immune reactive C3d on the surface of myelin sheaths in neuropathy. J Neuroimmunol. 1988; 18: 231-44.

Henriksson KG, Nilsson O, Rosen I, Schiller HH. Clinical, neurophysiological and morphological findings in Eaton Lambert syndrome. Acta Neurol Scand 1977; 56: 117-40.

Henson RA, Hoffman HL, Urich H. Encephalomyelitis with carcinoma. Brain 1965; 88: 449- 64.

Hestrin S, Korenbrot JI. Voltage-activated potassium channels in the plasma membrane of rod outer segments: a possible effect of enzymatic cell dissociation. J Neurosci. 1987; 7: 3072-80.

Hewett SJ, Atchison WD. Disruption of synaptosomal calcium channel function by Lambert-Eaton myasthenic immunoglobulin is serum-dependent. Brain Res. 1992a; 599: 317-23.

Hewett SJ, Atchison WD. Serum and plasma from patients with Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome reduce depolarization-dependent uptake of 45 Ca2+ into rat cortical synaptosomes. Brain Res. 1991; 566: 320-4.

Hewett SJ, Atchison WD. Specificity of Lambert-Eaton myasthenic syndrome immunoglobulin for nerve terminal calcium channels. Brain Res. 1992b; 599: 324-32.

Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes, 3rd ed., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. ISBN 0-8789-3321-2

Hirota N, Kaji R, Bostock H, Shindo K, Kawasaki T, Mizutani K, Oka N, Kohara N, Saida T, Kimura J. The physiological effect of anti-GM1 antibodies on saltatory conduction and transmembrane currents in single motor axons. Brain 1997; 120: 2159-69.

Hirt. Über den Aufbau des Spinalganglions und seine Beziehung zum Sympathicus. Z. Anat. 1928; 87: 275-318.

Ho TW, Hsieh ST, Nachamkin I, Willison HJ, Sheikh K, Kiehlbauch J, Flanigan K, McArthur JC, Cornblath DR, McKhann GM, Griffin JW. Motor nerve terminal degeneration provides a potential mechanism for rapid recovery in acute motor axonal neuropathy after Campylobacter infection. Neurology 1997; 48: 717-24.

Ho TW, Mishu B, Li CY, et al.. Guillian-Barré syndrome in northern China: relationships to Campylobacter jejuniinfection and anti-glycolipid antibodies. Brain 1995; 118: 597-605.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. Arch Sci. Physiol. 1949; 3: 129-150.

Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axone of Loligo. J.Physiol. 1952; 116: 424-448.

Hodgkin AL, Huxley AF. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J Physiol. 1952b Apr; 116: 449-72.

Hodgkin AL, Huxley AF. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo, J Physiol. 1952a; 116: 424-48.

Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J Physiol. 1952c; 116: 473-96.

Hodgkin AL, Huxley AF. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo. J Physiol. 1952d; 116: 497-506.

Hormigo A, Lieberman F. Nuclear localization of anti-Hu antibody is not associated with in vitro cytotoxicity. J Neuroimmunol. 1994 ;55: 205-12.

Hughes RA, Cornblath DR. Guillain-Barré syndrome. Lancet 2005; 366: 1653-66.

Hughes RA, Rees JH. Clinical and epidemic features of Guillain-Barré syndrome. J Infect Dis 1997; 176: 92-8

Ilyas AA, Willison HJ, Quarles RH, Jungalwala FB, Cornblath DR, Trapp BD et al.. Serum antibodies to gangliosides in Guillain-Barre syndrome. Ann Neurol 1988; 23: 440–7.

Irie S, Saito T, Kanazawa N, Nukazawa T, Ito H, Ogino M, Kowa H. Relationships between antiganglioside antibodies and clinical characteristics of Guillain-Barré syndrome. Intern Med. 1997; 36: 607-12.

Jaeckle KA, Graus F, Houghton A, Cardon-Cardo C, Nielsen SL, Posner JB. Autoimmune response of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration to a Purkinje cell cytoplasmic protein antigen. Ann Neurol. 1985; 18: 592-600.

Jean WC, Dalmau J, Ho A, Posner JB. Analysis of the IgG subclass distribution and inflammatory infiltrates in patients with anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis. Neurology 1994; 44: 140-7.

Johnston I, Lang B, Leys K, Newsom-Davis. Heterogeneity of calcium channel autoantibodies detected using a small-cell lung cancer line derived from a Lambert-Eaton myasthenic syndrome patient. J.Neurology 1994; 44:334-8.

Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. GalNAc-GD1a in human peripheral nerve: target sites of anti-ganglioside antibody. Neurology 2003; 61: 465-70.

Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Guillain-Barré syndrome with antibody to a ganglioside, N-acetylgalactosaminylGD1a. Brain 2000; 123: 116–24.

Kaida K, Kusunoki S, Kamakura K, Motoyoshi K, Kanazawa I. Guillain-Barré syndrome with IgM antibody to the ganglioside GalNAc-GD1a. J Neuroimmunol 2001; 113: 260–7.

Katz B, Miledi R. Further study of the role of calcium in synaptic transmission. J Physiol. 1970; 207: 789-801.

Khan NL, Jeffree MA, Good C, Macleod W, Al-Sarraj S. Histopathology of VGKC antibodyassociated limbic encephalitis. Neurology 2009; 72: 1703-5.

Khurana RK, Koski CL, Mayer RF. Autonomic dysfunction in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. J Neurol Sci. 1988; 85: 77-86.

Kleopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K+ channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. Brain 2006; 129: 1570-84.

Kocsis JD, Bowe CM, Waxman SG. Different effects of 4-aminopyridine on sensory and motor fibers: pathogenesis of paresthesias. Neurology 1986; 36: 117-20.

Kokubun N, Hirata K. Neurophysiological evaluation of trigeminal and facial nerves in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Muscle Nerve 2007 ; 35: 203-7.

Kornberg AJ, Pestronk A, Bieser K, Ho TW, McKhann GM, Wu HS, et al.. The clinical correlates of high-titer IgG anti-GM1 antibodies. Ann Neurol 1994; 35: 234–7.

Kostyuk PG, Krishtal OA, Pidoplichko VI. Calcium inward current and related charge movements in the membrane of snail neurones. J Physiol. 1981d; 310: 403-21.

Kostyuk PG, Veselovsky NS, Fedulova SA, Tsyndrenko AY. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-III. Potassium currents. Neuroscience. 1981c; 6: 2439-44.

Kostyuk PG, Veselovsky NS, Fedulova SA. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-II. Calcium currents. Neuroscience. 1981b; 6: 2431-7.

Kostyuk PG, Veselovsky NS, Tsyndrenko AY. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons-I. Sodium currents. Neuroscience. 1981a; 6:2423-30.

Kusunoki S, Chiba A, Kon K, Ando S, Arisawa K, Tate A, et al. N-Acetylgalactosaminyl GD1a is a target molecule for serum antibody in Guillain-Barré-Syndrome. Ann Neurol 1994; 35: 570–6.

Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Koga M, Mori M, Hiraga A, Kanesaka T, Hattori T, Yuki N. Does Campylobacter jejuni infection elicit "demyelinating" Guillain-Barre syndrome? Neurology 2004; 63: 529-33.

Kuwabara S, Yuki N, Koga M, et al.. IgG anti-GM1 antibody is associated with reversible conduction failure and axonal degeneration in Guillain-Barré syndrome. Ann Neurol 1998; 44: 202-8

Kyle RA, Finkelstein S, Elveback LR, Kurland LT. Incidence of monoclonal proteins in a Minnesota community with a cluster of multiple myeloma. Blood. 1972; 40: 719-24.

Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. Lancet Neurol. 2010; 9: 776-85.

Lambert EH, Rooke ED, Eaton LM. In Myasthenia Gravis, The 2nd International Synposium Proceedings (Viets HR, ed.) 1961, Charles C. Thomas, Springfield IL.

Lambert EH, Rooke ED. In The Remote Effect of Cancer on the Nervous System (Brian L, and Norris FH, eds.) 1965, Grune and Statton, New York.

Lang B, Molenaar PC, Newsom-Davis J, Vincent A. Passive transfer of Lambert-Eaton myasthenic syndrome in mice: decreased rates of resting and evoked release of acetylcholine from skeletal muscle. J Neurochem 1984, 42: 658-62.

Lang B, Newsom-Davis J, Peers C, Prior C, Wray DW. The effect of myasthenic syndrome antibody on presynaptic calcium channels in the mouse. J Physiol 1987, 390: 257-70.

Lang B, Newsom-Davis J, Wray D, Vincent A, Murray N. Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. Lancet 1981, 2: 224-6.

Lang B, Pinto A, Giovannini F, Newsom-Davis J, Vincent A. Pathogenic autoantibodies in the Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome. Ann N Y Acad Sci. 2003a; 998: 187-95.

Lang B, Vincent A. Autoantibodies to ion channels at the neuromuscular junction. Autoimmun Rev. 2003b; 2: 94-100.

Langmuir AD, Bregman DJ, Kurland LT, et al. An epidemiologic and clinicalevaluation of Guillain-Barré Syndrome reported in association with the administration of swine influenza vaccines. Am J Epidemiol 1984; 119: 841–79.

Lasky T, Terracciano GJ, Magder L, et al.. The Guillain-Barré syndrome and the 1992–1993 and 1993–1994 influenza vaccines. N Engl J Med 1998; 339: 1797–802.

Latov N, Hays AP, Sherman WH. Peripheral neuropathy and anti-MAG antibodies. Crit Rev Neurobiol. 1988; 3: 301-32.

Lennon VA, Lambert EH, Whittingham S, Fairbanks V. Autoimmunity in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Muscle Nerve 1982, 5: 21-25

Lennon VA, Sas DF, Busk MF, Scheithauer B, Malagelada JR, Camilleri M, Miller LJ. Enteric neuronal autoantibodies in pseudoobstruction with small-cell lung carcinoma. Gastroenterology. 1991; 100: 137-42.

Liu CN, Michaelis M, Amir R, Devor M., Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. Neurophysiol. 2000; 84: 205-15.

Lindquist S, Stangel M. Update on treatment options for Lambert-Eaton myasthenic syndrome: focus on use of amifampridine. Neuropsychiatr Dis Treat. 2011; 7: 341-9.

Llinás R, Steinberg IZ, Walton K. Presynaptic calcium currents and their relation to synaptic transmission: voltage clamp study in squid giant synapse and theoretical model for the calcium gate. Proc Natl Acad Sci USA. 1976; 73: 2918-22.

Lugaresi A, Ragno M, Torrieri F, Guglielmo G, Fermani P, Uncini A. Acute motor axonal neuropathy with high titer IgG and IgA anti-GD1a antibodies following Campylobacter enteritis. J Neurol Sci 1997; 147: 193-200

Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, Rosenblum MK, Wray SH, Schold SC Jr, Glantz MJ, Jaeckle KA, Biran H, Lesser M, et al.. Anti-Ri- antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. Ann Neurol. 1991; 29: 241-51.

Marks JS, Halpin TJ. Guillain-Barré Syndrome in recipients of a new Jersey influenza vaccine. JAMA 1980; 243: 2490–4.

Mata E, Galli A, Amantini F, Pinto S, Sorbi F. Anti-ganglioside antibodies and elevated CSF IgG syndrome. European Journal of Neurology 2006; 13: 153–160.

McCombe PA, Pollard JD, McLeod JG. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases. Brain 1987; 110: 1617-30.

McKhann GM, Cornblath DR, Griffin JW, Ho TW, Li CY, Jiang Z, Wu HS, Zhaori G, Liu Y, Jou LP et al. Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. Ann Neurol. 1993; 33: 333-42.

McKhann GM, Cornblath DR, Ho T, Li CY, Bai AY, Wu HS, Yei QF, Zhang WC, Zhaori Z, Jiang Z et al. Clinical and electrophysiological aspects of acute paralytic disease of children and young adults in northern China. Lancet 1991; 338: 593-7.

Merkies IS, Bril V, Dalakas MC, Deng C, Donofrio P, Hanna K, Hartung HP, Hughes RA, Latov N, van Doorn PA. Health-related quality-of-life improvements in CIDP with immune globulin IV 10% ICE Study Group. Neurology 2009; 72: 1337-44.

Molenaar PC, Newsom-Davis J, Polak RL, Vincent A. Eaton-Lambert syndrome: acetylcholine and choline acetyltransferase in skeletal muscle. Neurology 1982; 32: 1061-5.

Molinuevo JL, Graus F, Serrano C, Rene R, Guerrero A, Illa I. Utility of Anti-Hu antibodies in the diagnosis of paraneoplastic sensory neuropathy. Ann Neurol 1998; 44: 976-80.

Moll JW, Henzen-Logmans SC, Splinter TA, van der Burg ME, Vecht CJ. Diagnostic value of antineuronal antibodies for paraneoplastic disorders of the nervous system. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1990; 53: 940-3.

Monaghan MM, Trimmer JS, Rhodes KJ. Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K+ channel alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. J Neurosci. 2001; 21: 5973-83.

Motin L, Yasuda T, Schroeder CI, Lewis RJ, Adams DJ. Omega-conotoxin CVIB differentially inhibits native and recombinant N- and P/Q-type calcium channels. Eur J Neurosci. 2007; 25: 435-44.

Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Newsom-Davis J. Incidence of serum anti-P/Q-type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. J Neurol Sci. 1997; 147: 35-42.

Moulin DE, Hagen N, Feasby TE, Amireh R, Hahn A. Pain in Guillain-Barré syndrome. Neurology. 1997; 48: 328-31.

Nakatani Y, Hotta S, Utsunomiya I, Tanaka K, Hoshi K, Ariga T, Yu RK, Miyatake T, Taguchi K. Cav2.1 voltage-dependent Ca2+ channel current is inhibited by serum from select patients with Guillain-Barré syndrome. Neurochem Res. 2009; 34: 149-57.

Nakatani Y, Kawakami K, Nagaoka T, Utsunomiya I, Tanaka K, Yoshino H, Miyatake T, Hoshi K, Taguchi K. Ca channel currents inhibited by serum from select patients with Guillain-Barré syndrome. Eur Neurol. 2007; 57: 11-8.

Neher E, Sakmann B. Noise analysis of drug induced voltage clamp currents in denervated frog muscle fibres. J Physiol. 1976; 258:705-29.

Newsom-Davis J, Murray NM. Plasma exchange and immunosuppressive drug treatment in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Neurology 1984, 34: 480-5.

Newsom-Davis J. Lambert-Eaton myasthenic syndrome. Rev Neurol (Paris). 2004; 160: 177-80.

Newsom-Davis J. Paraneoplastic neurological disorders. J R Coll Physic Lond. 1999; 33: 225-7.

Newson-Davis J. Autoimmunity in neuromuscular disease. Ann NY Acad Sci. 1988; 540: 25-38

Nobile-Orazio E, Manfredini E, Carpo M, Meucci N, Monaco S, Ferrari S, Bonetti B, Cavaletti G, Gemignani F, Durelli L, et al.. Frequency and clinical correlates of anti-neural IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. Ann Neurol. 1994; 36: 416-24.

Notermans NC, Lokhorst HM, Franssen H, Van der Graaf Y, Teunissen LL, Jennekens FG, Van den Berg LH, Wokke JH., Intermittent cyclophosphamide and prednisone treatment of polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. Neurology 1996; 47: 1227-33.

O'Leary CP, Willison HJ. Autoimmune ataxic neuropathies (sensory ganglionopathies). Curr Opin Neurol. 1997; 10: 366-70.

O'Neill JH, Murray NM, Newsom-Davis J. The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. Brain 1988; 111: 577-96.

Ogawara K, Kuwabara S, Mori M, et al.. Axonal Guillain-Barré syndrome: relation to antiganglioside antibodies and Campylobacter jejuni infection in Japan. Ann Neurol 2000; 48: 624-31.

Oki Y, Koike H, Iijima M, Mori K, Hattori N, Katsuno M, Nakamura T, Hirayama M, Tanaka F, Shiraishi M, Yazaki S, Nokura K, Yamamoto H, Sobue G. Ataxic vs painful form of paraneoplastic neuropathy. Neurology 2007; 69: 564-72.

Oksenhendler E, Chevret S, Léger JM, Louboutin JP, Bussel A, Brouet JC. Plasma exchange and chlorambucil in polyneuropathy associated with monoclonal IgM gammopathy. IgM-associated Polyneuropathy Study Group. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1995; 59: 243-7.

Pan CL, Yuki N, Koga M, Chiang MC, Hsieh ST. Acute sensory ataxic neuropathy associated with monospecific anti-GD1b IgG antibody. Neurology 2001; 57:1316-8.

Panegyres PK, Reading MC, Esiri MM. The inflammatory reaction of paraneoplastic ganglionitis and encephalitis: an immunohistochemical study. J Neurol. 1993; 240: 93-7.

Pannese E. Observations on the morphology, submicroscopic structure and biological properties of satellite cells (s.c.) in sensory ganglia of mammals. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1960; 52: 567-97.

Paparounas K, O'Hanlon GM, O'Leary CP, Rowan EG, Willison HJ. Peripheral nerve nodes of Ranvier activate the complement cascade without inducing acute conduction block in vitro. Brain. 1999; 122: 807-16.

Peers C, Johnston I, Lang B, Wray D. Cross-linking of presynaptic calcium channels: a mechanism of action for Lambert-Eaton myasthenic syndrome antibodies at the mouse neuromuscular junction. Neurosci Lett. 1993; 153: 45-8.

Pinto A, Iwasa K, Newland C, Newsom-Davis J, Lang B. The action of Lambert-Eaton myasthenic syndrome immunoglobulin G on cloned human voltage-gated calcium channels. Muscle Nerve 2002; 25: 715-24.

Posner JB, Furneaux HM. Paraneoplastic syndromes. In: Waksman BH, ed. Immunologic mechanisms in neurologic and psychiatric disease. New York: Raven, 1990: 187-220.

Prineas JW. Acute idiopathic polyneuritis. An electron microscope study. Lab Invest. 1972; 26: 133-47

Prineas JW. Pathology of the Guillain-Barré syndrome. Ann Neurol. 1981; 9: 6-19.

Pritchard J, Makowska A, Gregson NA, et al.. Reduced circulating CD4+, CD25+cell populations in Guillain-Barré syndrome. J Neuroimmunol 2007; 183: 232–8.

Quattrini A, Corbo M, Dhaliwal SK, Sadiq SA, Lugaresi A, Oliveira A, Uncini A, Abouzahr K, Miller JR, Lewis L, et al.. Anti-sulfatide antibodies in neurological disease: binding to rat DRG neurons. J Neurol Sci. 1992; 112: 152-9.

Radl J, Sepers JM, Skvaril F, Morell A, Hijmans W. Immunoglobulin patterns in humans over 95 years of age. Clin Exp Immunol. 1975; 22: 84-90.

Radl J, Valentijn RM, Haaijman JJ, Paul LC. Monoclonal gammapathies in patients undergoing immunosuppressive treatment after renal transplantation. Clin Immunol Immunopathol. 1985; 37: 98-102.

Ramchandren S, Lewis RA. Monoclonal gammopathy and neuropathy. Curr Opin Neurol. 2009; 22: 480-5.

Reeh PW, Bayer J, Kocher L, Handwerker, HO. Sensitization of nociceptive cutaneous nerve fibres from the rat's tail by noxious mechanical stimulation. Exp Brain Res. 1987; 65: 505-512.

Rhodes KJ, Monaghan MM, Barrezueta NX, Nawoschik S, Bekele-Arcuri Z, Matos MF, Nakahira K, Schechter LE, Trimmer JS. Voltage-gated K+ channel beta subunits: expression and distribution of Kv beta 1 and Kv beta 2 in adult rat brain. J Neurosci. 1996; 16: 4846-60.

Rojas I, Graus F, Keime Guilbert F, Rene R, Delattre JY, Ramon JM, Dalmau J, Posner JB. Longterm clinical outcome of paraneoplastic cerebellar degeneration and anti-Yo antibodies. Neurology 2000, 55: 713-5.

Ropper AH, Shahani BT. Pain in Guillain-Barré syndrome. Arch Neurol. 1984; 41: 511-4.

Rubenstein AE, Horowitz SH, Bender AN. Cholinergic dysautonomia and Eaton-Lambert syndrome. Neurology 1979, 29: 720-3.

Ruts L, van Koningsveld R, Jacobs BC, van Doorn PA. Determination of pain and response to methylprednisolone in Guillain-Barré syndrome. J Neurol. 2007; 254: 1318-22.

Safranek TJ, Lawrence DN, Kurkland LT et al.. Reassessment of the association between Guillain-Barré syndrome and receipt of swine influenza vaccine in 1976-1977: results of a two-state study. Expert Neurology Group. Am J Epidemiol 1991 133: 952-5.

Safronov BV, Bischoff U, Vogel W. Single voltage-gated K+ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurones of rat. J Physiol. 1996; 493: 393-408.

Said G. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Neuromuscul Disord. 2006;16: 293-303.

Saito Y, Yokota T. Rapid improvement of nerve conduction in a patient with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP). Rinsho Shinkeigaku. 1993; 33: 1066-9.

Santoro M, Uncini A, Corbo M, Staugaitis SM, Thomas FP, Hays AP, Latov N. Experimental conduction block induced by serum from a patient with anti-GM1 antibodies. Ann Neurol. 1992; 31: 385-90.

Schäfer KH, Klotz M, Mergner D, Mestres P, Schimrigk K, Blaes F. IgG-mediated Cytotoxicity to Myenteric Plexus Cultures in Patients with Paraneoplastic Neurological Syndromes. J Autoimmunol 2000; 15, 479-484

Schmidt R, Thews G. Physiologie des Menschen, 1997, Springer

Scholz A, Appel N, Vogel W. Two types of TTX-resistant and one TTX-sensitive Na+ channel in rat DRG neurons and their blockade by halothane. Eur J Neurosci. 1998a; 10: 2547-56.

Scholz A, Gruss M, Vogel W. Properties and functions of calcium-activated K+ channels in small neurones of rat DRG studied in a thin slice preparation. J Physiol. 1998b; 513: 55-69.

Scholz A, Krause U, Reid G, Vogel W. Somata of nociceptive neurons in an enzyme-free preparation of rat DRG show small responses to Capsaicin and protons. Journal of Neuroscience 1999; 25: 1043.

Scholz A, Vogel W. Tetrodotoxin-resistant action potentials in DRG neurons are blocked by local anesthetics. Pain. 2000; 89: 47-52.

Schonberger LB, Bregman DJ, Sullivan-Bolyai JZ, et al.. Guillain-Barré syndrome following vaccination in the National Influenza Immunization Program, United States, 1976–1977. Am J Epidemiol 1979; 110: 105–23.

Senties-Madrid H, Vega-Boada F. Paraneoplastic syndromes associated with anti-Hu antibodies. Isr Med Assoc J. 2001; 3: 94-103.

Sheikh KA, Nachamkin I, Ho TW, et al.. Campylobacter jejuni lipopolysaccharids in Guillain-Barré syndrome: molecular mimicry and host susceptibility. Neurology 1998; 51: 371-8.

Sheng M, Tsaur ML, Jan YN, Jan LY. Subcellular segregation of two A-type K+ channel proteins in rat central neurons. Neuron. 1992; 9: 271-84.

Sillevis-Smitt P, Manley G, Dalmau J, Posner J. The HuD paraneoplastic protein shares immunogenic regions between PEM/PSN patients and several strains and species of experimental animals. J Neuroimmunol. 1996; 71: 199-206.

Sillevis-Smitt PA, Manley GT, Posner JB. Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. Neurology 1995; 45: 1873-8.

Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, Schwartzkroin PA, Messing A, Tempel BL. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. Neuron. 1998; 20: 809-19.

Smitt PS, Posner JB. Paraneoplastic peripheral neuropathy. Baillier Clin Neurol. 1995; 4: 443-68.

Sodhi N, Camilleri M, Camoriano JK, Low PA, Fealey RD, Perry MC. Autonomic function and motility in intestinal pseudoobstruction caused by paraneoplastic syndrome. Dig Dis Sci. 1989; 34: 1937-42.

Sonoda Y, Arimura K, Kurono A, Suehara M, Kameyama M, Minato S, Hayashi A, Osame M. Serum of Isaacs' syndrome suppresses potassium channels in PC-12 cell lines. Muscle Nerve. 1996; 19: 1439-46.

Souayah N, Nasar A, Suri MF, et al.. Guillain-Barré syndrome after vaccinationin United States a report from the CDC/FDA Vaccine Adverse Event ReportingSystem. Vaccine 2007; 25: 5253–5.

Stefansson K, Arnason BGW. Paraneoplastic syndromes of the brain, spinal chord, nerves and striated muscle. In Comprehensive textbook of oncology, vol 2, 2nd edn. Lippincott: Williams & Wilkins, 2000: 1663-70

Suarez GA, Kelly JJ Jr. Polyneuropathy associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance: further evidence that IgM-MGUS neuropathies are different than IgG-MGUS.

Neurology. 1993; 43: 1304-8.

Susuki K, Yuki N, Hirata K. Features of sensory ataxic neuropathy associated with anti-GD1b IgM antibody. J Neuroimmunol. 2001; 112: 181-7.

Sutton I, Winer JB. The immunopathogenesis of paraneoplastic neurological syndromes. Clin Sci (Lond). 2002; 102: 475-86.

Szabo A, Dalmau J, Manley G, Rosenfeld M, Wong E, Henson J, Posner JB, Furneaux HM. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. Cell. 1991; 67: 325-33.

Taguchi K, Ren J, Utsunomiya I, Aoyagi H, Fujita N, Ariga T, Miyatake T, Yoshino H. Neurophysiological and immunohistochemical studies on Guillain-Barre syndrome with IgG anti-GalNAc-GD1a antibodies-effects on neuromuscular transmission. J Neurol Sci. 2004; 225: 91-8.

Takahashi T. Membrane currents in visually identified motoneurones of neonatal rat spinal cord. J Physiol. 1990; 423: 27-46.

Takigawa T, Yasuda H, Kikkawa R, Shigeta Y, Saida T, Kitasato H. Antibodies against GM1 ganglioside affect K+ and Na+ currents in isolated rat myelinated nerve fibers. Ann Neurol. 1995; 37: 436-42.

Takigawa T, Yasuda H, Terada M, Haneda M, Kashiwagi A, Saito T, Saida T, Kitasato H, Kikkawa R. 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 fibres. Intern Med. 2000; 39: 123-7

Tanaka M, Cummins TR, Ishikawa K, Dib-Hajj SD, Black JA, Waxman SG. SNS Na+ channel expression increases in dorsal root ganglion neurons in the carrageenan inflammatory pain model. Neuroreport. 1998; 9: 967-72.

Tanaka M, Tanaka K, Onodera O, Tsuji S. Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. 1. Mouse strains bearing different MHC molecules produce antibodies on immunization with recombinant Yo protein, but do not cause Purkinje cell loss. Clin Neurol Neurosurg. 1995; 97: 95-100.

Tatum AH. Experimental paraprotein neuropathy, demyelination by passive transfer of human IgM anti-myelin-associated glycoprotein. Ann Neurol. 1993; 33: 502-6.

Tishler M, Schoenfeld Y. Paraneoplastic Syndromes. In Cancer and Autoimmunity (Schoenfeld Y, Gershwin ME.) 2000:121-131. Amsterdam, The Netherlands

Tomimitsu H, Arimura K, Nagado T, Watanabe O, Otsuka R, Kurono A, et al.. Mechanism of action of voltage-gated K+ channel antibodies in acquired neuromyotonia. Ann Neurol. 2004; 56: 440-4.

Torà M, Graus F, de Bolòs C, Real FX. Cell surface expression of paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy-associated Hu antigens in small-cell lung cancers and neuroblastomas. Neurology. 1997; 48: 735-41.

Toyka KV, Hartung HP. Chronic inflammatory polyneuritis and neuropathies. Curr Opin Neurol. 1996; 9: 240-50.

Trojaborg W. Acute and chronic neuropathies: new aspects of Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. Electroencephalogr Clin neurophysiol. 1998; 107: 303-16.

Tüzün E, Dalmau J. Limbic encephalitis and variants: classification, diagnosis and treatment. Neurologist. 2007; 13: 261-71.

Van Doorn PA, Brand A, Strengers PF, Meulstee J, Vermeulen M. High-dose intravenous immunoglobulin treatment in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. Neurology 1990; 40: 209-12.

Van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. Lancet Neurol. 2008 ; 7: 939-50.

Vedeler CA, Storstein A. Autoimmune limbic encephalitis. Acta Neurol Scand Suppl. 2009; 189: 63-7.

Veh RW, Lichtinghagen R, Sewing S, Wunder F, Grumbach IM, Pongs O. Immunohistochemical localization of five members of the Kv1 channel subunits: contrasting subcellular locations and neuron-specific co-localizations in rat brain. Eur J Neurosci. 1995; 7: 2189-205.

Vernino S. Autoimmune and paraneoplastic channelopathies. Neurotherapeutics. 2007; 4: 305-14

Verschuuren JJ, Dalmau J, Hoard R, Posner JB. Paraneoplastic anti-Hu serum: studies on human tumor cell lines. J Neuroimmunol. 1997; 79: 202-10.

Villiere V, Mc Lachlan EM. Electrophysiological properties of of neurones in intact rat DRGs classified by conduction velocity and AP duration. J Neurophysiol 1996; 76: 1924-1941.

Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, Clover L, Parkinson A, Bien CG, Omer S, Lang B, Rossor MN, Palace J. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. Brain 2004; 127: 701-12.

Vincent A, Honnorat J, Antoine JC, Giometto B, Dalmau J, Lang B. Autoimmunity in paraneoplastic neurological disorders. J Neuroimmunol. 1998; 84: 105-9.

Voltz R, Dalmau J, Posner JB et al. T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. Neurology 1998, 51: 1146-50

Voltz R. Intravenous immunoglobulin therapy in paraneoplastic neurological syndromes. J Neurol. 2006; 253: 33-8.

Voltz R. Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis, and therapy. Lancet Neurol. 2002; 1: 294-305.

Wang H, Kunkel DD, Martin TM, Schwartzkroin PA, Tempel BL. Heteromultimeric K+ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. Nature. 1993; 365: 75-9.

Wang Z, Low PA, Jordan J, Freeman R, Gibbons CH, Schroeder C, Sandroni P, Vernino S. Autoimmune autonomic ganglionopathy: IgG effects on ganglionic acetylcholine receptor current. Neurology. 2007; 68: 1917-21.

Wanschitz J, Hainfellner JA, Kristoferitsch W, Drlicek M, Budka H. Ganglionitis in paraneoplastic subacute sensory neuronopathy: a morphologic study. Neurology. 1997; 49: 1156-9.

Waxman SG, Dib-Hajj S, Cummins TR, Black JA. Sodium channels and pain. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 7635-9.

Waxman SG. Sodium channel blockade by antibodies: a new mechanism of neurological disease? Ann Neurol. 1995; 37: 421-3

Weber F, Rudel R, Aulkemeyer P, Brinkmeier H. Anti-GM1 antibodies can block neuronal voltagegated sodium channels. Muscle Nerve 2000; 23: 1414-20. Weiss MD, Luciano CA, Semino-Mora C, Dalakas MC, Quarles RH. Molecular mimicry in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and melanoma. Neurology. 1998; 51: 1738-41.

Willison HJ.Antiglycolipid antibodies in peripheral neuropathy: fact or fiction? J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1994; 57: 1303-7.

Wirtz PW, Lang B, Graus F, van den Maagdenberg AM, Saiz A, de Koning Gans PA, Twijnstra A, Verschuuren JJ. P/Q-type calcium channel antibodies, Lambert-Eaton myasthenic syndrome and survival in small cell lung cancer. J Neuroimmunol. 2005; 164: 161-5.

Wise RP, MacDermot V. A myasthenic syndrome associated with bronchial carcinoma. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1962, 25: 31-9.

Yamada M, Inaba A, Yamawaki M, Ishida K, Yokota T, Uchihara T, Eishi Y, Okeda R. Paraneoplastic encephalo-myelo-ganglionitis: cellular binding sites of the antineuronal antibody. Acta Neuropathol. 1994; 88: 85-92.

Yan WX, Archelos JJ, Hartung HP, Pollard JD. P0 protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Ann Neurol. 2001; 50: 286-92.

Yan WX, Taylor J, Andrias-Kauba S, Pollard JD. Passive transfer of demyelination by serum or IgG from chronic inflammatorydemyelinating polyneuropathy patients. Ann Neurol 2000; 47: 765–775.

Yeung KB, Thomas PK, King RH, Waddy H, Will RG, Hughes RA, Gregson NA, Leibowitz S. The clinical spectrum of peripheral neuropathies associated with benign monoclonal IgM, IgG and IgA paraproteinaemia. Comparative clinical, immunological and nerve biopsy findings. J Neurol. 1991; 238: 383-91.

Yuki N, Sato S, Tsuji S, Ohsawa T, Miyatake T. Frequent presence of anti-GQ1b antibody in Fisher's syndrome. Neurology 1993; 43: 414-7.

Yuki N, Taki T, Handa S. Antibody to GalNAc-GD1a and GalNAc-GM1b in Guillain-Barre syndrome subsequent to Campylobacterjejuni enteritis. J Neuroimmunol 1996; 71: 155-61.

Yuki N, Yoshino H, Sato S, Miyatake T. Acute axonal polyneuropathyassociated with anti-GM1 antibodies following Campylobacter enteritis. Neurology 1990; 40: 1900-2.

Yusaf SP, Goodman J, Pinnock RD, Dixon AK, Lee K. Expression of voltage-gated calcium channel subunits in rat dorsal root ganglion neurons. Neurosci Lett. 2001; 311: 137-41.

Zuberi SM, Eunson LH, Spauschus A, De Silva R, Tolmie J, Wood NW, McWilliam RC, Stephenson JB, Kullmann DM, Hanna MG. A novel mutation in the human voltage-gated potassium channel gene (Kv1.1) associates with episodic ataxia type 1 and sometimes with partial epilepsy. Brain 1999; 122: 817-25.

Danksagung

Ich bedanke mich ganz besonders bei meinen Betreuern PD Dr. med. Andreas Scholz und Prof. Dr. med. Franz Blaes für die Überlassung des Dissertationsthemas und die stetige produktive Unterstützung und Motivation.

Brigitte Agari und Otto Becker danke ich für die technische Hilfe, wenn mal wieder etwas zu Bruch gegangen ist.

Meinen Eltern und meiner Schwester Sonja danke ich für die vorbehaltlose Unterstützung während meines Studiums und darüber hinaus.

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Diskussion erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Mannheim, den 11. März 2011

Svenja Aglaia Fabian