

IgG-Subklassenverteilung antineuronaler und antinukleärer Autoantikörper bei neuroimmunologischen Erkrankungen

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von
Susanne Stephan
aus Löbau

Gießen, 2012

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

Gutachter: Prof. Dr. med. F. Blaes

Gutachter: Prof. Dr. med. G. Bein

Tag der Disputation: 04.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Zusammenfassung

Summary

1.	Einleitung	1
1.1	Immunsystem.....	1
1.2	Immunglobuline.....	2
1.2.1	Ig-Klassen.....	3
1.3	Autoimmunität.....	5
1.4	Autoantikörper und ihre pathogenetische und diagnostische Relevanz.....	7
1.5	Neurologische Autoimmunerkrankungen.....	10
1.6	Paraneoplastische neurologische Syndrome	11
1.6.1	Autoantikörper bei paraneoplastischen neurologischen Syndromen	15
1.7	Fragestellung	20
2.	Patienten und Methoden	21
2.1	Patienten.....	21
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Verwendete Antikörper und Puffer	25
2.2.3	Indirekter Immunfluoreszenztest	28
2.2.4	Immunoblot mit rekombinanten onkoneuralen Antigenen.....	29
2.2.5	Western Blot	30
2.2.6	Durchflusszytometrie.....	32
2.3	Statistik	34
3.	Resultate	35
3.1	Häufigkeit der Autoantikörper in den verschiedenen Patientengruppen	35
3.1.1	Antineuronale Antikörper.....	35
3.1.2	Antinukleäre Antikörper.....	36

3.1.3 Weitere Antikörper	37
3.2 Subklassenverteilung der Antikörper in den verschiedenen Gruppen.....	38
3.2.1 Subklassenverteilung antineuronaler Antikörper	39
3.2.2 Subklassenverteilung antinukleärer Antikörper.....	41
3.2.3 Subklassenverteilung weiterer Antikörper	45
3.3 Nachweis extrazellulärer Bindungen von Autoantikörpern.....	46
3.3.1 Subklassenverteilung von oberflächenbindenden Autoantikörpern.....	47
4. Diskussion	50
4.1 Paraneoplastische neurologische Syndrome und antineuronale Autoantikörper	50
4.2 Antinukleäre Antikörper.....	53
4.3 IgG-Subklassen	55
4.4 Subklassenverteilung antineuronaler Antikörper	56
4.5 Subklassenverteilung antinukleärer Antikörper.....	57
4.6 Subklassenverteilung von oberflächenbindenden Antikörpern	58
4.7 Zusammenfassung	60
5. Literatur	62
6. Anhang	

Abkürzungen

AchR	Acetylcholinrezeptor
ACR	American College of Rheumatology
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADC	Analog-to-digital Converter
ANA	Antinukleärer Antikörper
ANNA	Antineuronal nukleärer Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
aqua dest.	Aqua destillata
BCIP- NBT	5Brom-4Chlor-3Indolyl-Phosphat/Nitro Tetrazolium Blue Chloride
CREST	Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, Esophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie und Teleangiektasia
CRMP5	Collapsin-response mediated Protein-5
CT	Computertomografie
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dsDNA	Double-stranded Desoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
Fab	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetales Kälberserum
FDG-PET	Positronen-Emissions-Tomografie mit Fluor-Deoxyglukose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid
GAD	Glutamatdecarboxylase
GBS	Guillain-Barré-Syndrom

HC	Health Controls
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenfibroblasten
Hep2-Zellen	Humane Epithelzellen
HLA	Human leucocyte Antigen
i. v.	intravenös
IFT	Indirekter Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IRD	Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen)
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
LEMS	Lambert-Eaton-myasthenisches Syndrom
MCTD	Mixed Connective Tissue Disease
MG	Myasthenia Gravis
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MuSK	Muscle spezific Kinase
NMDAR	N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSCLC	Non small Cell Lung Cancer
OMS	Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom
OND	Other Neuroimmunological Diseases
Para	Paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern
Para-ANA	Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern
PBS	Phosphate buffered Saline
PCA	Purkinje Cell Antibody
PNP	Polyneuropathie
PNS	Paraneoplastische neurologische Syndrome
PP	Paraneoplastischer Pemphigus

PV	Pemphigus vulgaris
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonucleic Acid
S. aureus	Staphylococcus aureus
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPS	Stiff-Person-Syndrom
SSC	Side Scatter
TCR	T-Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VGCC	Voltage-gated Calcium Channel
VGKC	Voltage-gated Potassium Channel

Zusammenfassung

Einleitung: Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS) sind Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einem Tumor auftreten, jedoch nicht auf einen lokalen Effekt des Tumors oder seiner Metastasen zurückgeführt werden können. Die neurologische Symptomatik zeigt sich häufig vor Diagnosestellung des Tumors. Bei einem Teil der PNS-Patienten lassen sich hochspezifische antineuronale Autoantikörper nachweisen, die als frühe diagnostische Marker für ein PNS gelten. Kürzlich konnte eine Untergruppe der PNS mit hochtitrigen antinukleären Antikörpern (ANA) mit und ohne begleitende antineuronale Antikörper beschrieben werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die IgG-Subklassenverteilung antineuronaler und antinukleärer Autoantikörper bei Patienten mit PNS und Patienten mit nicht-paraneoplastischen Autoimmunerkrankungen unterscheidet und dies möglicherweise einen diagnostischen Vorteil bietet.

Methoden: Es wurde Serum von 70 Patienten sowie 20 Gesunden in folgende Gruppen eingeteilt: Kollagenosen (IRD), definitives PNS (Para), mögliches PNS mit antinukleären Antikörpern (Para-ANA), andere neuroimmunologische Erkrankungen (OND) und Gesundkontrollen (HC). Die Analyse der antineuronalen und antinukleären Autoantikörper und deren IgG-Subklassen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz, Immunoblot mit rekombinanten Antikörpern und Western Blot durchgeführt. Zum Nachweis von oberflächenbindenden Antikörpern und deren IgG-Subklassen diente die Durchflusszytometrie.

Resultate: In dieser Arbeit fand sich am häufigsten unter den antineuronalen Antikörpern der Para-Gruppe der Anti-Hu Antikörper, der vorherrschend in der Subklasse IgG1, aber auch in den Subklassen IgG2 und IgG3 nachgewiesen werden konnte ($p < 0.0001$). Der Anti-CV2/CRMP5 Antikörper, den wir am zweithäufigsten fanden, beschränkte sich vor allem auf die IgG2-Subklasse ($p < 0.05$).

ANA der IRD- und der Para-ANA-Patienten waren in der vorliegenden Studie in den Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3 vorhanden. Die Tumorpatienten mit PNS und ANA (Para-ANA-Gruppe) waren zu 100% IgG3-positiv und zu je 62.5% IgG2- bzw. IgG1-positiv. Hingegen waren die IRD-Patienten zu 55.5% IgG3-positiv, zu 38.8% IgG2-positiv und zu 66.6% IgG1-positiv. Diese Subklassenverteilung der ANA der IRD-Gruppe unterschied sich signifikant von der Para-ANA-Gruppe ($p < 0.0001$).

Bei der Untersuchung von oberflächenbindenden Autoantikörpern fand sich ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit extrazellulärer Bindungen der IRD- und der Para-ANA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0.0001$). Die oberflächenbindenden Autoantikörper der IRD- und der Para-ANA-Gruppe waren mehrheitlich IgG1-positiv.

Diskussion: Der Unterschied in der ANA-Subklassenverteilung von IRD- und Para-ANA-Patienten lässt eine diagnostische Relevanz für die Unterscheidung zwischen einer rheumatischen nicht-paraneoplastischen und einer paraneoplastischen Erkrankung vermuten. Allerdings findet sich hier keine ausreichend hohe Trennschärfe, so dass die diagnostische Relevanz derzeit fraglich ist. Die Diagnose eines zugrundeliegenden Tumors lässt sich besser durch die Bestimmung begleitender antineuronaler Antikörper oder die Bestimmung der Subklassenverteilung des Gesamt-IgG abschätzen, als durch die reine ANA-Subklassenanalyse.

Summary

Background: Paraneoplastic neurological syndromes (PNS) are diseases which occur in association with a tumor, but are not caused by a local effect or the metastases or the tumor itself. The neurological symptoms are often present before the tumor is diagnosed. In a part of the PNS-patients specific onconeural antibodies are detectable, which are early markers for PNS. Recently a subgroup of PNS with high elevated antinuclear antibodies (ANA) with or without additional onconeural antibodies was described. We analyzed differences in the IgG subclass distribution of onconeural and antinuclear antibodies in patients with PNS and patients with non-paraneoplastic immune mediated diseases and the possible diagnostic benefit of it.

Methods: Sera from 70 patients and 20 health controls were divided in following groups: collagenosis (IRD), definite PNS (Para), possible PNS with antinuclear antibodies (Para-ANA), other neuroimmunological diseases (OND) and health controls (HC). The analyses of the onconeural and antinuclear antibodies and their subclasses were made by indirect immunofluorescence assay, immunoblotting and western blotting. To detect extracellular binding antibodies and their subclasses we used fluorescence activated cell sorting (FACS).

Results: In this study, anti-Hu antibody was the most frequent onconeural antibody in the Para-group, belonging predominantly to IgG1 and, less frequent, IgG2 und IgG3 ($p < 0.0001$). The anti-CV2/CRMP5, the second most common antineuronal antibody, was restricted to the IgG2 subclass ($p < 0.05$). ANA of the IRD- and the Para-ANA patients were detectable in the subclasses IgG1, IgG2 and IgG3. Patients with PNS and ANA (Para-ANA group) were 100% IgG3-positive and 62.5% IgG2- or IgG1-positive. The IRD-patients were 55.5% IgG3-positive, 38.8% IgG2-positive and 66.6% IgG1-positive. This ANA-subclass distribution of the IRD-group differed significantly from that of the Para-ANA-group in contrast to the controls ($p < 0.0001$). The extracellular binding antibodies of the IRD- and the Para-ANA-group were in the majority IgG1-positiv.

Conclusions: There was a significant difference in the ANA-subclass distribution of IRD- and the Para-ANA patients in this study. However, the ability to differentiate both groups from each other was not high enough to have a diagnostic impact. The diagnosis of an underlying tumor is mainly possible by the detection of onconeural antibodies or the determination of the subclass distribution of total IgG.

1. Einleitung

1.1 Immunsystem

Das biologische Abwehrsystem höherer Lebewesen wird als Immunsystem bezeichnet. Es dient dem Schutz vor krankheitserregenden, körperfremden Einflüssen. Es wird zwischen der angeborenen unspezifischen und der adaptiven spezifischen Immunabwehr unterschieden. Die unspezifische Immunantwort erfolgt ohne Immungedächtnis (Wiedererkennung bei Zweitkontakt) mittels physiologischer Barrieren, humoral durch Komplementaktivierung, Akut-Phase-Proteinen und Zytokinen, aber auch zellulär durch phagozytierende Zellen und Natürliche Killerzellen. Zur Identifizierung der Fremdorganismen verfügen Phagozyten über eine Vielzahl von Rezeptoren, wie die Toll-like Rezeptoren und der Mannoserezeptor (Barton & Medzhitov 2002; East & Isacke 2002). Die spezifische Immunantwort hingegen ermöglicht die Detektion spezieller Oberflächenstrukturen von Fremdkörpern und besitzt ein im Laufe des Lebens erworbenes Immungedächtnis (Meyer et al. 2007). Die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC), wichtiger Bestandteil des HLA- (Human Leucocyte Antigen) Systems, spielen dabei eine entscheidende Rolle: MHC Klasse I Moleküle (auf allen kernhaltigen Zellen) präsentieren den T-Supressor- und zytotoxischen (CD8-) Zellen endogene Proteine, so dass diese direkt viral infizierte Zellen abtöten. Nach Präsentation von exogenen Peptide durch MHC Klasse II Moleküle (auf nahezu allen antigenpräsentierenden Zellen) differenzieren T-Helfer (CD4-) Zellen zu TH1- oder TH2-Zellen. TH1-Zellen vernichten intrazelluläre Mikroben durch Makrophagenaktivierung, TH2-Zellen eliminieren extrazelluläre Erreger mit Hilfe von B-Lymphozyten (Janeway & Bottomly 1996). Diese aktivierten B-Zellen (Plasmazellen) bilden spezifische Antikörper, sogenannte Immunglobuline (Ig). Produzieren sie aufgrund unspezifischer Stimulation (durch Viren oder Neoplasien induziert) übermäßig viele, strukturell veränderte Klone, kann das der Grund für pathologische Autoantikörper sein. Nach erfolgter Immunabwehr verbleiben wenige Lymphozyten als „Gedächtniszellen“, um bei erneutem Antigenkontakt schneller und spezifischer auf schädigende Einflüsse reagieren zu können. Die Vorgänge des angeborenen und des erworbenen Immunsystem sind nicht strikt voneinander getrennt zu betrachten, sondern sie ergänzen sich in ihren Funktionen. Die Toleranz gegen körpereigene Strukturen in der Summe aufrechtzuerhalten ist die Aufgabe der T-Supressorzellen, die durch Freisetzung von Botenstoffen die Aktivierung der T- und B-Zellen stoppen und so die Immunantwort unterdrücken können.

1.2 Immunglobuline

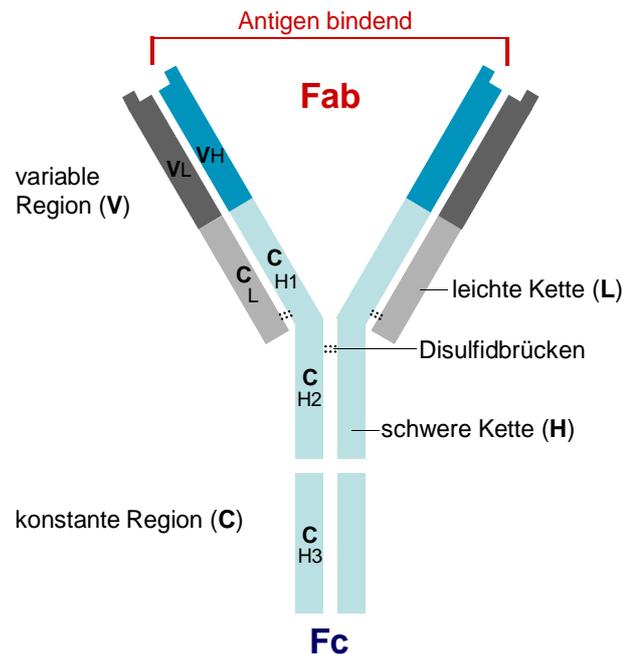


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Immunglobulin G (IgG) mit typischer Grundstruktur aus leichten L- und schweren H-Ketten - verbunden über Disulfidbrücken, der variablen Region (V) mit dem Antigen-bindenden Fab-Fragment und der konstanten Region (C) mit dem Abwehzellen aktivierenden, kristallisierbaren Fc-Fragment.

Die von den Plasmazellen sezernierten Ig besitzen durch ihren Aufbau sowohl eine Antikörper- und auch eine Effektorfunktion (Thomas 1998). Jeder Antikörper hat die typische Grundstruktur aus zwei identischen leichten (L-) und zwei schweren (H-) Ketten, die über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen zu einem Y-förmigen Molekül miteinander verbunden sind (Edelman 1973; Abbildung 1). Es gibt zwei Arten von L-Ketten (λ - und κ - Kette) und fünf Isotypen (γ , α , μ , δ und ϵ) der H-Ketten, die die Antikörperaktivität und auch die Zugehörigkeit zu einer der Antikörperklassen bestimmt. Die Proteinketten weisen verschiedene Domänen auf. Die N-terminale Region mit einer variablen Aminosäuresequenz (V-Region) aus ca. 110 Aminosäuren mit dem Antigen-bindenden Fab-Fragment ist für die Antigen-spezifität und -bindung nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip verantwortlich. Das c-terminale Ende des Moleküls als konstante Schwereketten-domäne (Fc-Fragment) lässt das Ig an Membranrezeptoren binden und aktiviert damit Abwehzellen (Effektorfunktion). Im menschlichen Organismus können bis zu 10^{30} verschiedene Antikörper produziert

werden (Winter & Milstein 1991). Die enorme Antikörpervielfalt beruht auf somatischer Rekombination unterschiedlicher Genabschnitte, zufälliger Kombination der L- und H-Ketten, Variabilität der Verbindungsregion sowie somatischer Mutation (Manser 1989; Jura et al. 2006).

1.2.1 Ig-Klassen

Es gibt fünf verschiedene Klassen von Ig: M, G, D, E und A. Im Serum eines Gesunden sind IgG, IgA, IgM, IgD und IgE in abnehmender Konzentration vorhanden. Sie weisen nicht nur verschiedene molekulare Strukturen auf, sondern zeigen auch hinsichtlich ihrer Funktion und Bedeutung Unterschiede. IgM, Ig der primären Immunantwort, detektiert frische Infektionen und dient der Komplementaktivierung und Erregeropsonierung. IgG folgt bei einer Erstinfektion dem IgM und stellt bei sekundärer Immunantwort den entscheidenden Erstantikörper dar. Es leistet einen wichtigen Beitrag zur Komplementaktivierung, Opsonierung und Neutralisierung von Antigenen. Als einziges Ig überwindet es die Plazentaschranke und sorgt für den „Nestschutz“ des Feten. IgD ist ein Hauptrezeptor für Antigene auf den B-Zellen. Die genaue Funktion ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. IgE vermittelt die Typ I-Hypersensitivitätsreaktion vom Soforttyp und spielt somit eine wesentliche Rolle bei Allergien und in der Abwehr von Parasiten. Das vorwiegende Ig der Körpersekrete, IgA, bindet Mikroorganismen auf den Schleimhäuten, aktiviert Entzündungsreaktionen und das Komplementsystem. Innerhalb der Ig-Klassen können bestimmte Subklassen differenziert werden: In der IgG-Klasse die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4, in der Klasse IgA die Subklassen IgA1 und IgA2, in der Klasse IgM die Subklassen IgM1 und IgM2. Die normale Verteilung der IgG-Subklassen im Serum beträgt für IgG1 80%, IgG2 10%, IgG3 6% und IgG4 4% (Morell et al. 1975). Die Synthese der spezifischen Subklasse ist abhängig von der Antigenbeschaffenheit, deren Eintrittspforte und der Dauer der Antigenexposition. Die Subklassen unterscheiden sich biochemisch und physikalisch, als auch durch unterschiedliche Funktionen in der Immunabwehr (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über die Eigenschaften der Immunglobulinisotypen (modifiziert nach Thomas 1998 und Murphy 2012).

Eigenschaft	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgM	IgA	IgD	IgE
Molekulargewicht (kD)	150	150	170	150	970	160	175	190
Schwere Kette	γ 1	γ 2	γ 3	γ 4	μ	α	δ	ϵ
Konzentration im Serum (mg/ml)	9	3	1	0,5	1,5	2,5	0,03	$5 \cdot 10^{-5}$
Halbwertszeit im Serum (d)	21	20	7	21	10	6	3	2
Komplementaktivierung	++	+	+++	-	++++	-	-	-
Plazantatransfer	+++	+	++	+/-	-	-	-	-
Bindung an Makrophagen	+	-	+	+/-	-	+	-	+/-
Bindung an Mastzellen und basophile Granulozyten	-	-	-	+/-	-	-	-	+++
Reaktion mit Protein A aus S.aureus	+	+	+/-	+	-	-	-	-

Eine T-zellvermittelte Immunantwort in den Klassen IgG1 und IgG3 wird durch Proteinantigene wie z. B. Viren und Bakterien induziert. IgG1- und IgG3-Antikörper lösen vorwiegend Effektorfunktionen aus und sind immunregulatorisch aktiv (Brüggemann et al. 1987). Die Komplementaktivierung wird vor allem durch IgG3, weniger durch IgG1 gesteuert. Native DNA bindet an IgG1- und IgG3-Autoantikörper. T-zellunabhängige Polysaccharidantigene wie bekapselte Pneumokokken oder Haemophilus influenzae bedingen eine überwiegende IgG2-Bildung (Schauer et al. 2003). Polyvalente Antigene (Insekten, Parasiten, Schlangengift, Nahrungsmittel)

hingegen führen zu einer IgG4-restriktiven Immunantwort. Nach erfolgreicher Hyposensibilisierung sind dann IgG4-Antikörper nachweisbar.

Verschiebungen oder Mangel an IgG-Subklassen stehen mit Infekten im Zusammenhang und können isoliert vorkommen oder mit anderen Immundefekten assoziiert sein. Bei einer verminderten IgG3-Konzentration kann es z. B. zu rezidivierenden Bronchitiden, Diarrhoe oder Asthma bronchiale kommen. Im Fall einer HIV-Infektion finden sich erhöhte IgG1- und IgG3-Konzentrationen. Bei Patienten mit allergischer Alveolitis kommt es z. B. zum Anstieg von IgG2 und bei Patienten mit Mukoviszidose steigt IgG4. Die Veränderung der IgG-Subklassenkonzentration gilt als Indikator für ein gestörtes Immunsystem, ist aber kein eindeutiger Beweis.

1.3 Autoimmunität

Kommt es zu einer Störung der Immuntoleranz, werden körpereigene Strukturen vom Immunsystem angegriffen (Nossal 2001). Diese spezifische, adaptive Immunantwort gegen Selbst-Antigene wird als Autoimmunität bezeichnet. Nicht in jedem Fall ist diese Reaktion pathologisch. Die Elimination von geschädigtem Gewebe bzw. von körpereigenen Zellen, die maligne entartet sind oder intrazelluläre Erreger tragen, kann als Autoimmunreaktion betrachtet werden. Sie dient jedoch einer positiven Abwehr. Pathologisch relevant wird die Immunantwort erst dann, wenn sie gegen körpereigene Antigene fehlgeleitet wird. Diese Schädigung oder Zerstörung körpereigenen Gewebes, hervorgerufen durch Autoantikörper oder autoimmune T-Lymphozyten, wird als Autoimmunerkrankung bezeichnet und führt im Verlauf zu chronischen Schäden des betroffenen Organs oder des gesamten Körpers. Eine Autoimmunerkrankung verläuft meist chronisch, in Schüben und tritt oft familiär gehäuft auf. Es werden zum einen lokale, organspezifische (z. B. Hashimoto Thyreoiditis, Autoimmunhämolytische Anämie, Morbus Addison und Diabetes mellitus Typ 1) und zum anderen systemische, organunspezifische Erkrankungen (z. B. systemischer Lupus erythematodes (SLE), Sklerodermie, Panarteriitis nodosa und Sarkoidose) unterschieden (Classen et al. 2009).

Bereits 1957 formulierte Witebsky Kriterien zur Klassifikation einer Erkrankung als Autoimmunerkrankung, die 1993 von Rose und Bona modifiziert wurden (Witebsky et al. 1957; Rose & Bona 1993). Nach dieser Definition gilt eine Erkrankung als autoimmun, wenn im Patientenserum Autoantikörper oder autoreaktive T-Zellen nachweisbar sind und durch die Übertragung dieser auf ein Versuchstier dieselbe Erkrankung ausgelöst werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass passive

Transferversuche mit IgG Fraktionen von Patienten mit Myasthenia gravis (MG) auf Mäuse zu einer muskulären Schwäche bei den Versuchstieren führen. Ursächlich sind Autoantikörper gegen postsynaptische Acetylcholinrezeptoren (AChR) (Toyka et al. 1975).

Es gibt verschiedene Hypothesen zur Entstehung von Autoimmunität: Werden B-Lymphozyten mit einem bestimmten Antigen stimuliert, resultiert eine Antikörperproliferation gegen verschiedene Epitope (polyklonale Expansion). Es konnte gezeigt werden, dass eine Immunisierung von Mäusen mit Anti-DNA-Idiotypen nicht ausschließlich zur Bildung von Anti-DNA-Autoantikörpern, sondern zusätzlich auch zur Proliferation von Anti-Einzelstrang-DNA-, Anti-SS-A-, und Anti-Sm Antikörpern führt (Blank et al. 1990; Rombach et al. 1992). Auch die Dysregulation des Ig Idiotypen-Netzwerkes kann zu Autoimmunität führen. Dabei wirkt die variable Region des Ig (Idiotyp) selbst als Antigen und führt zur Bildung eines sogenannten Antiidiotypen-Antikörpers, der nun wiederum immunogen wirkt (Jerne 1984). Eine Dysbalance in diesem Netzwerk kann eine Autoimmunreaktion bedingen. Bei Erkrankungen wie dem SLE scheinen während apoptotischer Vorgänge Histone, DNA-Fragmente und andere Proteine dem Immunsystem präsentiert zu werden. Infolgedessen werden Autoantikörper gegen diese Strukturen gebildet (Brickman & Schoenfeld 2001). Dies lässt einen Zusammenhang zwischen Apoptose und Autoimmunität vermuten. Molekulares Mimikry als Ursache von Autoimmunerkrankungen wird bei der Multiple Sklerose (MS), der Rheumathoiden Arthritis (RA) oder dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) diskutiert (Prendergast & Moran 2000). Grundlage dieser Theorie ist, dass Epitope von Erregern den körpereigenen Molekülen ähneln. Kommt es zur Erkennung des Antigens, werden kreuzreagierende Antikörper gebildet, die sowohl körpereigene als auch -fremde Strukturen angreifen (Moran & Pendergast 2001; Roep 2002). Das klassische Modell des Molekularen Mimikry wurde anhand des rheumatischen Fiebers entwickelt: Die nach einem Infekt mit β -hämolyisierenden Streptokokken gebildeten Antikörper kreuzreagieren mit Oberflächenantigenen des Endokards oder der Nierenglomerula (Cunningham 2000). Aber auch ein Übergewicht proinflammatorischer Zytokine spielt bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle. Dies konnte mit einer hohen Konzentration des Tumor-Nekrosefaktors- α (TNF- α) bei der RA und mit Interferon- α bei dem SLE gezeigt werden (Banchereau et al. 2004). Romieu-Mourez bestätigt bei Vorliegen erhöhter Konzentration an Interferon- γ eine vermehrte MHC-Expriemierung betroffener Zellen, wodurch diese von Immunzellen leichter erkannt und angegriffen werden (Romieu-Mourez et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Autoimmunität ein Zusammenspiel aus genetischen, hormonellen und exogenen Aspekten (Bezrodnyhk & Karelin 1994) ist. Eine Assoziation mit bestimmten HLA-Typen als genetische Komponente ist für den Diabetes mellitus Typ 1 bekannt (Bain et al. 1994). Daneben werden verschiedene Viren (Coxsackie-, Herpes-, Influenza-B-Viren (Sano et al. 2008)), gewisse Nahrungsbestandteile (z.B. Kuhmilchproteine) oder Umwelttoxine als auslösende Faktoren diskutiert. Bei der Sklerodermie haben Umwelteinflüsse wahrscheinlich einen hohen Stellenwert. Ein signifikant erhöhtes Auftreten dieser Erkrankung wurde bei Arbeitern, die Silikatstäuben ausgesetzt waren, beobachtet (Otsuki et al. 2007). Für manche Krankheiten wird auch eine geschlechtsspezifische Häufung beschrieben, beispielsweise tritt der SLE bei Frauen häufiger als bei Männern auf (Soto et al. 2004).

1.4 Autoantikörper und ihre pathogenetische und diagnostische Relevanz

Bei dem Nachweis von Autoantikörpern bei Autoimmunerkrankungen ist die Abschätzung der funktionellen Bedeutung notwendig. Funktionell wirksame Antikörper binden meist an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche, bewirken dort eine Blockade oder Aktivierung und folglich eine Funktionsstörung. Die MG weist pathogene Autoantikörper gegen nikotinerge AchR auf und ist durch im Tagesverlauf zunehmende Muskelschwäche gekennzeichnet. Die Rezeptoren werden durch die Antikörperbindung blockiert und die neuromuskuläre Übertragung ist dadurch gestört (Lang & Vincent 2003). Der Nachweis dieser Antikörper ist auch die Grundlage für eine symptomatische Therapie mit Cholinesterasehemmern sowie eine immunsuppressive bzw. -modulatorische Behandlung mit Steroiden, Immunsuppressiva, Plasmapherese, i.v.-Immunglobulinen und Thymektomie.

Autoantikörper können sowohl gegen intrazelluläre Strukturen (Proteine oder Nukleinsäuren) als auch gegen extrazelluläre Antigene gerichtet sein (Calvanico 1993). Verschiedene Autoren diskutieren, dass für Autoantikörper gegen intrazellulär liegende Strukturen eine pathogenetische Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann (Adamus et al. 1997; Koscec et al. 1997; Yanase et al. 1997). Dies wird jedoch kontrovers diskutiert. Pathophysiologisch relevant sind Autoantikörpern gegen extrazelluläre Moleküle z. B. bei der autoimmunhämolytischen Anämie (Classen et al. 2009). Ebenso ist die pathogene Bedeutung der Autoantikörper gegen Bestandteile auf der Zelloberfläche bei dem Lambert-Eaton-myasthenen Syndrom (LEMS) gesichert (Vincent et al. 2011). Die α -Untereinheit des präsynaptischen, spannungsabhängigen

P/Q-Typ Calciumkanals wurde dabei als Zielantigen beschrieben (Lang et al. 1981; Pinto et al. 1998). Bei dem SLE richten sich die Autoantikörper sowohl gegen intra- als auch gegen extrazelluläre Strukturen. Der bei dem SLE im Vordergrund stehende dsDNA-Antikörper zeigt dabei eine enge Assoziation mit dem Krankheitsverlauf und einer Nierenbeteiligung (Casals et al. 1964; Putterman 2004).

Ein weiterer Aspekt hinsichtlich der pathogenetischen Relevanz ist die Fähigkeit von Autoantikörpern gegen intrazelluläre Epitope mit oberflächlichen Proteinen kreuzzureagieren. So zeigen Lupus-Autoantikörper gegen dsDNA eine Kreuzreaktion mit der NR2-Untereinheit des Glutamaterezeptors (DeGiorgio et al. 2001).

Bei den Zielstrukturen der Autoantikörper handelt es sich häufig um hochkonservierte Strukturen, die an wichtigen Zellfunktionen (DNA-Replikation, Transkription, Translation, m-RNA-Splicing und Zellzyklus) beteiligt sind. Die Antigene zu identifizieren kann also von diagnostischer und pathogenetischer Bedeutung sein. Zielstrukturen der Autoantikörper sind sehr oft spezifisch für die zugrunde liegende Erkrankung (Tan 1989; Van Venrooij & Sillekens 1989; Tabelle 2). Als diagnostische Marker spielen Autoantikörper eine große Rolle, da ihr Auftreten mit bestimmten Autoimmunerkrankungen, deren Krankheitsverläufen und -aktivität korreliert. Z. B. sind antinukleäre Antikörper (ANA) bei Kollagenosen und Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis ein Diagnostikum (Übersicht in Fritzler 1996; Tabelle 2). Manchmal können Antikörper auch zur Frühdiagnose entscheidend beitragen, indem sie vor der klinischen Symptomatik nachweisbar sind (Arbuckle et al. 2003). Auch im gesunden Individuum sind autoreaktive Antikörper anzutreffen. Sie stellen aber keinen pathologischen Befund dar, wie z. B. im Rahmen der immunologischen Homöostase Antikörper Regulations- und Überwachungsaufgaben übernehmen (UytdeHaag et al. 1991, Livneh et al. 1993, Singh 1993).

Tabelle 2: Auswahl einiger diagnostisch relevanter antinukleärer Antikörper bei systemischen Autoimmunerkrankungen des Menschen und ihre entsprechende Antigenfunktion (nach Yang et al. 1981; Padgett et al. 1983; Maul et al. 1986; Shero et al. 1986; Tan 1989; Bini et al. 1990; Chou et al. 1992; Lee et al. 1993; Messier et al. 1993). SLE Systemischer Lupus erythematoses. MCTD mixed connective tissue disease.

Autoimmun- erkrankung	Autoantikörper	Antigenfunktion
SLE	Anti-dsDNA	Genetischer Code
	Anti-Histon (H1, H2A, H2B, H3, H4)	Kondensation der DNA
	Anti-Sm1	Splicing der Vorläufer-mRNA
	Anti-Ku	Regulation des T-Zell-Rezeptorgens
Sjögren Syndrom, SLE	Anti-SS-B/La	Enzymregulation der RNA-Polymerase I
	Anti-SS-A/Ro2	Komplex mit Y1-Y5 RNAs, Funktion unbekannt
Sklerodermie	Anti-Topoisomerase I (Scl-70)	Lockerung der DNA-Superhelix
	Anti-Zentromer	Zellteilung und Spindelausbildung
Mischkollagenosen (MCTD)	Anti-RNP	Splicing der Vorläufer mRNA

1.5 Neurologische Autoimmunerkrankungen

Neurologische Erkrankungen mit einer autoimmunen Ätiologie können die Muskulatur bzw. die neuromuskuläre Synapse, das zentrale oder periphere Nervensystem betreffen und treten auch als Multisystemerkrankung in Erscheinung. Bereits vor über 50 Jahren wurde die MG als autoimmun beschrieben und gehört somit zu den ersten Erkrankungen in diesem Bereich (Strauss 1963). Autoantikörper gegen den postsynaptischen AchR der quergestreiften Muskulatur lassen sich bei 85% der Patienten im Serum nachweisen (DeBaets & Stassen 2002). Bei den restlichen 15% ist dieser Nachweis nicht möglich (sogenannte „seronegative“ Myasthenie). Dafür liegt ein IgG Antikörper im Serum vor, der an ein anderes muskuläres Oberflächenprotein bindet (Blaes et al. 2000a). So finden sich Autoantikörper gegen eine muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) in etwa 40 - 50% der Fälle. In der Literatur werden Wechselwirkungen der MuSK-Antikörper mit der Agrin-induzierten Clusterbildung von AChR an der Endplatte beschrieben (Hoch et al. 2001). Die Pathogenese ist dabei noch nicht abschließend geklärt. Die klinische Symptomatik ist in beiden Myasthenieformen vergleichbar.

Beim LEMS, einer weiteren Autoimmunerkrankung der neuromuskulären Synapse finden sich in über 90% der Fälle Antikörper gegen präsynaptische, spannungsabhängige Kalziumkanäle (VGCC). Dadurch kommt es zur verminderten Acetylcholinfreisetzung in den synaptischen Spalt (Takamori et al. 2000). Die Klinik ähnelt der MG: Schwäche vorwiegend der hüft- und schultergelenksnahen Extremitätenmuskulatur, kurzfristige Zunahme der Muskelkraft nach Belastung, Hyporeflexie und autonome Störungen. Selten tritt jedoch die Myasthenie kombiniert mit einem LEMS auf, d. h. mit AChR- und VGCC-Antikörpern (Toyka & Schneider-Gold 2003).

Das Stiff-Person-Syndrom (SPS) betrifft das zentrale Nervensystem und endokrine Drüsen und ist gekennzeichnet durch Glutamatdecarboxylase-Antikörper (GAD) (Solimena et al. 1990; Lockman & Burns 2007). Der Nachweis von Antikörpern gelingt in 70% der Fälle bei SPS-Patienten. Bei ca. 50% der Betroffenen sind weitere Autoimmunerkrankungen (Diabetes mellitus Typ1 und Autoimmunhyperthyreose) assoziiert (Chia et al. 2007; Kraemer & Berlit 2008). Dinkel et al. beschrieben eine inhibierende Wirkung der Anti-GAD-Antikörper auf GABAerge-Neurone, die die Symptome der Betroffenen (Steifigkeit axialer Rumpf- und Beinmuskulatur, autonome Dysregulation, Angststörungen) erklären lässt (Dinkel et al. 1998).

MG, LEMS und SPS lassen sich im Tiermodell mittels Passivtransfer übertragen (Toyka et al. 1975; Lang et al. 1981; Lang et al. 2003; Vincent et al. 2011).

Das GBS geht mit multifokaler Demyelinisierung im peripheren Nervensystem einher. Häufig tritt es nach einer Infektion mit *Camphylobacter jejuni* auf und wird klinisch manifest durch aufsteigende Paresen, Areflexie und sensible Defizite. Autoantikörper (IgG oder IgM) gegen Ganglioside oder Myelin bzw. gegen Zellmembranen der Axone des peripheren Nervensystems spielen eine entscheidende Rolle. Das spezifische Antigen ist noch nicht identifiziert. Es wird eine molekulare Ähnlichkeit (Mimikry) von viralen oder bakteriellen Antigenen mit Gangliosiden bzw. Myelin diskutiert. Erreger wie *Camphylobacter jejuni* kommen dabei als Auslöser autoimmuner Vorgänge in Frage (Sivadon et al. 2005).

1.6 Paraneoplastische neurologische Syndrome

Der Begriff paraneoplastische Syndrome geht zurück auf Boudin (Boudin 1961) und beschreibt seltene tumorassoziierte Erkrankungen, die unabhängig von dem lokalen Effekt des Tumors selbst, seiner Metastasen, therapeutischen Maßnahmen oder Pharmaka in Erscheinung treten (Blaes 2012). Mittlerweile sind eine Vielzahl paraneoplastischer Syndrome bekannt, die fast alle Organe v. a. aber Haut, Endokrinum, Blut und Nervensystem betreffen können und eine Reihe verschiedener Funktionsstörungen nach sich ziehen. Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (small cell lung cancer, SCLC) kann als paraneoplastische endokrinologische Störung ein Cushing-Syndrom durch die ACTH-Bildung der Tumorzellen auftreten (Domański 1989). Weitere Beispiele paraneoplastischer Krankheitsbilder sind die aplastische Anämie, die Dermatomyositis, die Tumor-assoziierte Retinopathie, Endokarditis, und Glomerulonephritis.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf paraneoplastische Erkrankungen des Nervensystems. Die sogenannten paraneoplastischen neurologischen Syndrome (PNS) können Strukturen des zentralen Nervensystems, periphere Nerven, die neuromuskuläre Übertragung und auch die Muskulatur betreffen (Dalmau & Posner 1997) und gehen nicht selten mit dem Nachweis von antineuronalen Antikörpern einher (Tabelle 3). Die Inzidenz der PNS liegt bei 0,5 - 3% der Tumorpatienten (Sculier et al. 1987; Elrington et al. 1991; Van Oosterhout et al. 1996).

Die am häufigsten mit PNS assoziierten Tumore sind das SCLC, das Mammakarzinom, das Ovarialkarzinom, das Hodgkin-Lymphom und das Thymom (Blaes 2012). Im Kindesalter tritt das PNS überwiegend im Rahmen eines Neuroblastoms auf (Dropcho 2005). Häufige Syndrome sind LEMS, SPS, Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (OMS), subakute cerebelläre Ataxie, limbische Enzephalitis, sensorische Neuronopathie, gastrointestinale Pseudoobstruktion, Enzephalomyelitis und Dermatomyositis (Antoine & Camdessanché 2007; Storstein & Vedeler 2007). All diese neurologischen Syndrome können aber sowohl paraneoplastisch als auch nicht-paraneoplastisch vorkommen. Beispielsweise ist das LEMS zu 50 - 60% mit dem SCLC assoziiert. Im Gegensatz dazu kommt es aber nur bei 1,5 - 3% der Patienten mit einem SCLC auch zu der zusätzlichen Diagnose eines LEMS (Alexander et al. 1993). Für ein paraneoplastisches Geschehen sprechen ein subakutes oder akutes Einsetzen und eine rapide Verschlechterung des Zustandes des Patienten (Dalmau & Posner 1996). Die neurologische Manifestation ist variabel, in 50 - 60% geht sie jedoch der Diagnosestellung des Tumors um Monate voraus (Blaes 2002). Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten eines PNS ein entscheidender Hinweis für das Vorliegen eines Tumors darstellt und eine sofortige Karzinomsuche eingeleitet werden sollte (Dropcho 1995; Dalmau & Posner 1996; Blaes 2002). Bleibt der Tumornachweis bei der Routinediagnostik aus, wird die Positronen-Emissions-Tomografie mit Fluor-Desoxyglukose (FDG-PET) als sensitive Suchmethode eingesetzt (Antoine et al. 2000; Stich & Rauer 2013). Wenn bei einem Antikörper-positiven Patient ein Tumor gefunden wird, der nicht zu dem bekannten Tumorspektrum des Antikörpers passt, muss die Möglichkeit eines Zweitumors in Betracht gezogen werden (Lucchinetti et al. 1998). Prognoseentscheidend ist die frühzeitige Diagnosestellung und Behandlung (Blaes 2013). Die Therapie eine PNS besteht in erster Linie in der Tumorthherapie (Stich & Rauer 2013).

Tabelle 3: Übersicht über die antineuronalen Antikörper bei PNS. Der Antikörper weist üblicherweise auf den assoziierten Tumor hin und kann mit unterschiedlichen Syndromen einhergehen. Bezeichnung der Antikörper Hu, Yo, CV2, Ma, Ri, Tr nach den Initialen der Indexpatienten. ANNA Antineuronal nukleärer Antikörper. PCA Purkinjezell-Antikörper. CRMP5 collapsin-response mediated protein-5. OMS Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom. SPS Stiff-person-Syndrom. SCLC kleinzelliges Bronchialkarzinom (small cell lung cancer) Ca Karzinom. (modifiziert nach Giometto et al. 2010; DGN-Leitlinie „Paraneoplastische neurologische Syndrome“ 2012; Stich & Rauer 2013).

Antikörper	Neurologische Syndrome	Tumor/e
Anti-Hu (ANNA1)	Sensorische Neuronopathie, gastrointestinale Pseudoobstruktion, paraneoplastische Kleinhirndegeneration, limbische-/ Hirnstamm-Enzephalitis, OMS	SCLC
Anti-Yo (PCA1)	Paraneoplastische Kleinhirndegeneration	Ovarial-Ca, Mamma-Ca Uterus-Ca
Anti-PCA2	limbische -/ Hirnstamm-Enzephalitis	SCLC
Anti-CV2/CRMP5	Chorea, sensorische Neuronopathie, gastrointestinale Pseudoobstruktion, paraneoplastische Kleinhirndegeneration, limbische Enzephalitis	SCLC, Thymom
Anti-Ma2 (Ma/Ta)	limbische -/ Hirnstamm-Enzephalitis, paraneoplastische Kleinhirndegeneration	Seminom, Lungen-Ca Hoden-Ca
Anti-Ri (ANNA2)	Hirnstamm-Enzephalitis, OMS	Mamma-Ca, SCLC
Anti-Tr	paraneoplastische Kleinhirndegeneration	Hodgkin- Lymphom
Anti-ANNA 3	paraneoplastische Neuropathie	SCLC
Anti-Amphiphysin	SPS, verschiedene PNS	Mamma-Ca, SCLC

Bisher wurde ein PNS anhand Ausschlussdiagnostik festgestellt, was nun durch festgelegte Diagnosekriterien abgelöst wurde. Von einer europäischen Konsensusgruppe (PNS Euronetwork) wurden Kriterien erarbeitet, die unter Berücksichtigung von dem Nachweis bzw. dem Fehlen des neurologischen Syndroms, des Tumors und der onkoneuronalen Antikörper ein definitives von einem möglichen PNS unterscheiden (Abbildung 2).

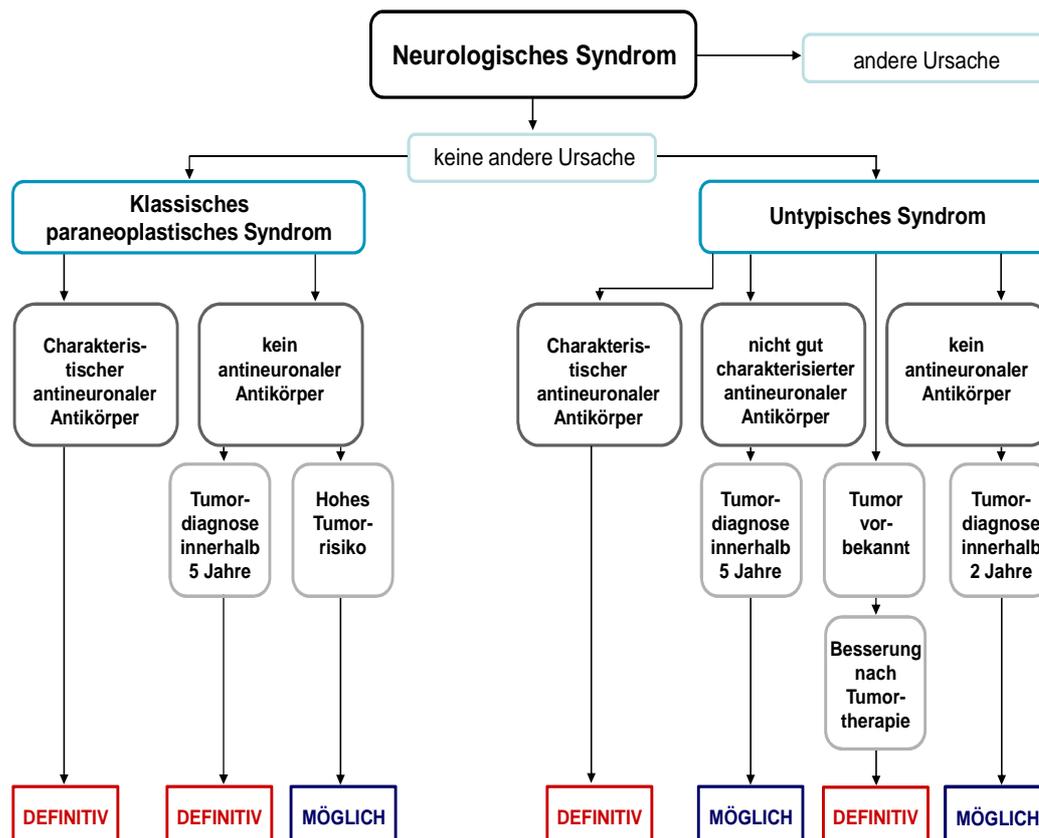


Abbildung 2: Flussdiagramm zur Diagnostik von PNS. Darstellung der Kriterien eines definitiven und eines möglichen PNS (nach Graus et al. 2004). PNS paraneoplastisches neurologisches Syndrom.

Die neurologischen Syndrome werden in klassische und nicht-klassische Syndrome unterteilt (Graus et al. 2004). Die klassischen PNS umfassen im Bereich des zentralen Nervensystems die limbische Enzephalitis, die Kleinhirndegeneration und das OMS, im Bereich des peripheren Nervensystems die sensible Neuropathie, das LEMS und die Dermatomyositis. Nicht-klassische (seltene) PNS sind Hirnstammenzephalitis, nekrotisierende Myelopathie/Myelitis und SPS (betrifft zentrales Nervensystem); sensorische Neuronopathie und GBS (peripheres Nervensystem); MG und

Neuromyotonie (neuromuskulärer Übergang) sowie nekrotisierende Myopathie. Die Pathogenese der meisten PNS ist nicht sicher geklärt. Kreuzreagierende Antikörper im Serum oder Liquor betroffener Patienten lassen im zunehmenden Maße eine Autoimmunpathogenese vermuten (Dalmau et al. 1992; Darnell 1996; Voltz 2002; Blaes 2012). Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Tumorzellen Antigene ekto exprimieren, die den Proteinen neuronaler Zellen ähnlich sind. Die sogenannten „onkoneuronalen Antigene“ werden von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen den Helfer- und zytotoxischen T-Zellen präsentiert. Es folgt eine Immunantwort, die gegen den Tumor und auch das körpereigene Nervengewebe gerichtet ist und somit die PNS-Symptomatik auslöst (Dropcho 1998). Die Art der ausgelösten Autoimmunreaktion wird kontrovers diskutiert. Es ist sowohl ein zellulärer (zytotoxische T-Zellen) als auch ein humoraler (Autoantikörper) Auslösemechanismus wahrscheinlich. Neuromuskuläre PNS sind scheinbar Antikörper-vermittelt, während PNS des zentralen Nervensystems T-Zell-vermittelt sind, mit fraglichem zusätzlichem Effekt der Antikörper (Blaes 2002).

1.6.1 Autoantikörper bei paraneoplastischen neurologischen Syndromen

Die klinische Bedeutung antineuronaler Antikörper liegt in ihrem prädiktiven Wert für eine assoziierte Neoplasie (Kaiser 1999). Sie werden demnach als frühe diagnostische Marker angesehen (Verschuuren et al. 1996; Posner 2004). In 50 - 60% der Fälle der PNS kann der Nachweis von Antikörpern im Blut oder Liquor erbracht werden (Moll et al. 1995; Antoine et al. 1999). Gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie sollen zwei unabhängige Verfahren zur Autoantikörperdiagnostik verwendet werden: Eine immunhistochemische Screeningmethode und als Bestätigungsmethode Western Blot oder ELISA. Die Sensitivität von antineuronalen Autoantikörpern in der Diagnose eines PNS beträgt 50 - 60%, im Gegensatz dazu ist die Spezifität mit 95 - 98% sehr hoch (Moll et al. 1990; Blaes et al. 2002). Demnach ist der Autoantikörpernachweis bei PNS-Patienten nahezu beweisend für das Vorliegen einer malignen Grunderkrankung. Wird ein solcher Antikörper im Serum eines Patienten ohne bisher bekannten Tumor gefunden, sollte eine intensive Tumorsuche begonnen werden (Voltz 2002).

Eine Reihe onkoneuronaler Antigene konnte bereits identifiziert werden, wobei viele RNA-bindende Eigenschaften aufweisen (Posner & Dalmau 2000). Der erste Autoantikörper, Anti-Hu wurde 1985 erstmals beschrieben (Graus et al. 1985). Seitdem konnten zahlreiche weitere Antikörper charakterisiert werden (Tabelle 3). Die

Autoantikörper sind meist nach den Initialen der Indexpatienten benannt (z. B. Hu für Hull, Yo für Young, Ma für Margret). Sie können auch entsprechend der immunhistochemischen Färbung bezeichnet werden (z. B. ANNA für antineuronaler nukleärer Antikörper). In dieser Arbeit wurden ausschließlich die gut charakterisierten onkoneuronalen Antikörper berücksichtigt unter Verwendung der Nomenklatur nach den Indexpatienten.

Anti-Hu richtet sich gegen die Proteine HuC, HuD und Hel-N1 im Nerven- und im Tumorgewebe des SCLC, Neuroblastoms, Prostatakarzinoms oder der neuroendokrinen Tumore. Anti-Hu Antikörper reagieren mit den RNA-bindenden Proteinen in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems (Dalmau et al. 1992). Im Western Blot markiert der Anti-Hu Antikörper Proteine mit einem Molekulargewicht von 35 - 42 kDa (Greenlee et al. 2001).

Anti-Yo erkennt zytoplasmatische Antigene von cerebellären Purkinjezellen. Er ist v. a. mit gynäkologischen Tumoren wie den Mamma-, Ovarial oder Zervixkarzinomen assoziiert (Greenlee et al. 2001). Im Western Blot zeigen sich Doppelbanden bei einem Molekulargewicht von 34 kDa und 62 kDa (Jaeckle et al. 1985).

Anti-Ri markiert Proteine von 55 kDa und 70 - 80 kDa Molekulargewicht von Neuronen des zentralen Nervensystems, jedoch nicht des peripheren Nervensystems (Greenlee et al. 2001). Als Zielantigene wurden die nukleär RNA-bindenden NOVA1- und NOVA2-Proteine identifiziert, die wahrscheinlich einen Beitrag bei der Modifikation der Glycinrezeptor-mRNA leisten. Klinisch zeigt sich oft ein Mammakarzinom mit OMS oder paraneoplastischer Ataxie (Anderson et al. 1988; Luque et al. 1991; Yang et al. 1998).

Anti-Ma ist gegen intraneuronal lokalisierte Ma-Proteine des Gehirn-, Hoden- und Tumorgewebes gerichtet. Die Funktion des 39,8 kDa PNMA1- und des 41,5 kDa PNMA2-Protein ist bisher nicht geklärt. Anti-Ma, durch Dalmau beschrieben (Dalmau et al. 1999) ist vergleichsweise häufig nachweisbar.

Anti-Tr bindet an das Zytoplasma von Purkinjezellen. Das klinische Erscheinungsbild der Patienten ist durch die Kleinhirndegeneration bei einem zugrunde liegenden Hodgkin-Lymphoms geprägt (Graus et al. 1997b).

Anti-CV2/CRMP5 (collapsin-response mediated protein 5) erkennt Proteine im Zytoplasma der Oligodendrozyten. Im Western Blot zeigen die Antikörper eine Reaktivität bei einem Molekulargewicht von 66 kDa. Bei Anti-CV2-positiven Patienten

konnten in Assoziation mit SCLC oder undifferenzierten neuroendokrinen Tumoren klinisch eine Polyneuropathie (PNP) oder eine Neuritis nervi optici festgestellt werden. (Honnorat et al. 1996; Rudnicki & Dalmau 2005).

Neben sogenannten „gut charakterisierten“ (d.h. häufig mit einem bestimmten Tumor vergesellschafteten) Antikörpern wie Anti-Hu, Anti-Yo, Anti-CV2/CRMP5, sind „teilweise/nicht gut charakterisierte“ (d.h. seltener mit einem bestimmten PNS assoziierte) Antikörper beschrieben, wie z. B. Anti-SOX1 und Anti-Zic4 (Stich & Rauer 2013). Der SOX1-Antikörper wird gehäuft bei Patienten mit paraneoplastischen LEMS in Assoziation zum SCLC, nicht aber bei Patienten mit ideopatischem LEMS gefunden (Tschernatsch et al. 2010).

Prognostisch haben Tumorpatienten mit antineuronalen Autoantikörpern eine längere Überlebenszeit bzw. ein besseres Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen im Vergleich zu Patienten ohne Antikörper (Darnell & DeAngelis 1993; Graus et al. 1997a; Blaes et al. 2000b).

Die pathogenetische Rolle der Antikörper bei PNS ist dabei bis auf wenige Ausnahmen umstritten. Bei paraneoplastischen Erkrankungen, die die neuromuskuläre Synapse betreffen sind die jeweiligen Autoantikörper gegen extrazelluläre Proteine als pathogen definiert worden. Dies ließ sich im Tiermodell beweisen. Bei der Neuromyotomie konnten die assoziierten Antikörper, die sich gegen die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (VGKC) richten in einen ursächlichen Zusammenhang mit dem PNS gebracht werden (Hart et al. 2002).

Ähnliches gilt für den Pathomechanismus bei MG oder LEMS (Lang et al. 1981; Pinto et al. 1998; Lang & Vincent 2003). Beachtlicherweise sind diese Autoantikörper sowohl bei der paraneoplastischen Form als auch bei der idiopathischen zu finden (siehe Punkt 1.5). Somit sind diese Antikörper, die sich gegen neuronale Oberflächen-Antigene von Kanälen, Rezeptoren, assoziierten Proteinen richten keine wirklichen spezifischen Marker für eine Neoplasie bzw. paraneoplastische Erkrankung (Vincent et al. 2011).

Ob hingegen die Antikörper der PNS des zentralen und peripheren Nervensystems, die gegen intrazelluläre onkoneuronale Antigene gerichtet sind, eine pathogenetische Relevanz besitzen oder nur ein Begleitphänom darstellen, ist noch weitestgehend unklar. Für eine größtenteils Antigen-spezifische T-Zellreaktion spricht eine Reihe von Ergebnissen (Albert et al. 1998; Tanaka et al. 1998; Voltz et al. 1998; Benyahia et al. 1999; Pellkofer et al. 2004). In anderen Studien erbrachte die Immunisierung verschiedener Tierstämme mit den humanen Proteinen Yo und Hu einem signifikant

erhöhten Antikörper-Titer im Serum, während eine nachweisbare Erkrankung nicht auslösbar war (Tanaka et al. 1994; Sillevius Smitt et al. 1995; Tanaka et al. 1995; Auf et al. 2002). Eine Aufnahme von Anti-Hu IgG in Neurone und Tumorzellen konnte in vitro (Greenlee et al. 1993; Hormigo & Lieberman 1994) und auch in vivo (Dalmau et al. 1991) gezeigt werden. Die Angaben zur Zytotoxizität der IgG-Fractionen betroffener Patienten sind jedoch widersprüchlich (Greenlee et al. 1993; Hormigo & Lieberman 1994; Verschuuren et al. 1996; Schäfer et al. 2000).

Um weitere Informationen über die zugrunde liegenden Antigene und den pathogenetischen Mechanismus bei PNS zu erlangen, wird auch die Analyse der IgG-Subklassen der Autoantikörper herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass es eine Beziehung zwischen der IgG-Subklasse, der Zytokinbildung der TH1- und TH2-Zellen und der Regulation der zytotoxischen und Antikörper-vermittelten Immunantwort gibt (Kawano et al. 1995; Greenlee et al. 2001). Für einige Autoimmunerkrankungen sind die IgG-Subklassen identifiziert. Beispielsweise sind die Inselzellantikörper bei insulinpflichtigen Diabetes mellitus IgG1-Antikörper (Schatz et al. 1988) und Antikörper des bullösen Pemphigoid gehören der Subklasse IgG4 an (Soh et al. 1991).

Für die verschiedenen ANA im Formkreis der Kollagenosen und rheumatischen Erkrankungen konnten die Subklassen IgG1 und IgG3 zugeordnet werden.

In der Literatur findet sich auch eine Reihe von Angaben zur Subklassenverteilung bei Patienten mit PNS. Jean et al. beschrieben, dass die vorherrschenden Subklassen von Anti-Hu Antikörpern bei PNS-Patienten IgG1 und IgG3 sind (Jean et al. 1994). Des Weiteren bleiben Anti-Yo Antikörper auf die IgG1-Subklasse beschränkt (Amyes et al. 2001). Die mit Hodgkin-Lymphom assoziierte zerebelläre Degeneration geht mit Anti-Tr Antikörpern der Subklasse IgG1 und IgG3 einher (Bernal et al. 2003). Unlängst wurde durch die Arbeitsgruppe um Jarius eine neue Reaktivität gegen Purkinjezellen assoziiert mit der subakuten Kleinhirndegeneration entdeckt, die der Subklasse IgG1 zugeordnet werden konnte (Jarius et al. 2010).

Bei den pathogenwirksamen, oberflächenbindenden Antikörpern gibt es nur wenige Literaturangaben. Beck et al. konnten für die oberflächenbindenden Antikörper beim kindlichen paraneoplastischen OMS vorrangig der Subklassen IgG3 und geringfügig IgG1 identifizieren (Beck et al. 2007). Bei den VGKC-Antikörpern bei Patienten mit Neuromyotonie konnten als prädominant IgG4 Antikörper beobachtet werden (Vincent et al. 2011). Bei der Anti-NMDAR (N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor)-Enzephalitis gehören die Antikörper der Subklasse IgG1 an (Irani et al. 2010; Vincent et al. 2011). Im SPS konnte eine persistierende systemische und intrathekale Produktion von GAD65-spezifischen IgG, was sich auf die Subklasse IgG1 beschränkt, nachgewiesen werden (Skorstad et al. 2008).

Andererseits können auch Tumorerkrankungen zu Veränderungen der IgG-Subklassenverteilung im Serum führen. Klotz et al. demonstrierten, dass die verschiedenen histologisch klassifizierten Typen des Bronchialkarzinoms unterschiedlichen Einfluss auf die Verteilung der IgG-Subklassen haben (Klotz et al. 1999). Blaes et al. zeigten, dass Anti-Hu-positive SCLC-Patienten mit PNS hauptsächlich die Subklasse IgG1 aufwiesen, SCLC-Patienten ohne PNS hingegen hohe IgG3- und IgG4-Titer hatten (Blaes et al. 2002). Demnach könnte neben der Problematik der Pathogenese doch auch die Relevanz der Autoantikörper-Subklassen in der Diagnostik von PNS und assoziierten Tumoren geprüft werden. Könnten anhand einer tumorassoziierten Umverteilung der IgG-Subklassen Rückschlüsse auf eine paraneoplastische Genese gezogen und damit eine frühzeitige Unterscheidung zwischen paraneoplastischer und nicht-paraneoplastischer Erkrankung mit entsprechend frühzeitiger Tumorsuche ermöglicht werden?

1.7 Fragestellung

Ausgehend von dem dargestellten Wissensstand wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Subklassenverteilung der Autoantikörper bei PNS vor allem diagnostisch genutzt werden könnte und damit eine Unterscheidung zwischen paraneoplastischer und nicht-paraneoplastischer Genese ermöglicht.

Es wurden anhand der Untersuchung von Patienten mit paraneoplastischen und nicht-paraneoplastischen Erkrankungen im Einzelnen folgende Fragen geprüft:

1. Wie ist die Subklassenverteilung von antineuronalen Antikörpern bei paraneoplastischen Syndromen?
2. Gibt es Unterschiede in der Subklassenverteilung der ANA bei den paraneoplastischen Syndromen und Kollagenosen?
3. Unterscheiden sich diese paraneoplastischen und nicht-paraneoplastischen neuroimmunologischen Erkrankungen in der Subklassenverteilung oberflächenbindender Antikörper?

2. Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Allen Patienten wurde nach entsprechender Aufklärung und deren Einverständnis Serum entnommen. Die Seren wurden bei -20°C bis zu ihrer Austestung gelagert. Ein positives Votum der Ethikkommission des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen liegt für dieses Projekt vor (Nr. 113/01 und Nr. 54/05). In der Datenbank der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Klinik für Neurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen sind die Patienten hinsichtlich klinischer Merkmale und nachgewiesener Autoantikörper katalogisiert. Für diese Studie wurden daraus Seren von insgesamt 52 Patienten mit neuroimmunologischen Erkrankungen, 18 Patienten mit Kollagenose und 20 Gesundkontrollen (HC) verwendet. Diese wurden hinsichtlich der IgG-Subklassenverteilung von Autoantikörpern untersucht. Als Kontrolle dienten 20 alters- und geschlechtsgematchte, anonymisierte Seren von Blutspendern. Dabei handelte es sich um gesunde Personen ohne Entzündungszeichen oder einer Tumorerkrankung.

Die 70 Patienten wurden für diese Arbeit in folgende Gruppen eingeteilt:

1. Kollagenosen (inflammatorische rheumatische Erkrankungen, IRD)
2. Andere neuroimmunologische Erkrankungen (other neuroimmunological diseases, OND)
3. Paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern (Para)
4. Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern (Para-ANA)

1. Kollagenosen

Zu den Kollagenosen zählen SLE, Polymyositis und Dermatomyositis, Sjögren-Syndrom, Sklerodermie, CREST-Syndrom (Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, Esophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie und Teleangiektasia) sowie das Sharp-Syndrom (Mischkollagenose). Die Diagnose der Patienten dieser Gruppe wurde nach den jeweils gültigen Diagnosekriterien gestellt. Für die Diagnosestellung SLE waren bei den betroffenen Patienten geforderte vier von 11 Diagnosekriterien des American College of Rheumatology (ACR-Kriterien 1999) mindestens erfüllt (Tan et al. 1982; Hochberg 1997). Die ACR-Kriterien konnten auch hier für die Diagnose einer Polymyositis und einer Dermatomyositis in dieser Arbeit herangezogen werden (Bohan

& Peter 1975; Bohan et al. 1977). Patienten dieser Studie mit Sjögren-Syndrom wurden nach den bestehenden Diagnosekriterien verschiedener Autoren beurteilt (Fox et al. 1986; Homma et al. 1986; Vitali et al. 1993; Vitali et al. 1994; Vitali et al. 2002). Zur Diagnostik der Sklerodermie und des CREST-Syndroms wurden auch spezifische ACR-Kriterien angewendet, die initial 1980 von dem Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association aufgestellt und 1988 durch LeRoy überarbeitet wurden (LeRoy et al. 1988).

Das Sharp-Syndrom, gekennzeichnet durch Überlappen verschiedener Bindegewebserkrankungen (Raynaud-Symptomatik, Hautveränderungen, Symptome des SLE, der RA, der Polymyositis sowie kardiale, nephrologische und/oder zentralnervöse Beteiligung) wurde über Ausschlussdiagnostik festgelegt.

Tabelle 4: Vorkommen verschiedener Kollagenoseformen in der IRD-Gruppe. Angegeben als Anzahl der Patienten n. IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). SLE Systemischer Lupus erythemathodes. CREST Calcinosis cutis, Raynaud-Syndrom, Esophageale Dysfunktion, Sklerodaktylie und Teleangiektasia. PNP Polyneuropathie.

Diagnose	Patientenanzahl n
SLE	10
Polymyositis	1
Dermatomyositis	3
Sjögren-Syndrom	0
Sklerodermie	1
CREST-Syndrom	0
Sharp-Syndrom	1
PNP bei undifferenzierter Kollagenose	1
Zerebrale Vaskulitis bei Kollagenose	1

Die in dieser Studie aufgestellte Gruppe der Kollagenosen umfasst insgesamt 18 Patienten mit verschiedenen zuvor beschriebenen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen (Tabelle 4). 15 Seren stammen von weiblichen, drei von männlichen Probanden. Das durchschnittliche Alter der Patienten bei Abnahme betrug 46.7 ± 20.3 Jahre.

2. OND

Diese Gruppe schloss folgende Diagnosen anderer neurologischer Erkrankungen nicht paraneoplastischer Genese ein: Kaudaradikulitis, Autoimmunmyelitis, Myeloradikulitis, Enzephalitis, PNP, und LEMS. Die jeweilige Diagnosestellung der OND-Patienten dieser Studie erfolgte mittels klinischer oder neurophysiologischer Untersuchung, Labordiagnostik oder bildgebenden Verfahren (Müller et al. 2007).

Der Gruppe OND gehörten in dieser Arbeit 10 Patienten (sechs weibliche, vier männliche) verschiedener Diagnosen an (Tabelle 5). Das Durchschnittsalter lag bei 49.7 ± 17.6 Jahren.

Tabelle 5: Vorkommen verschiedener Diagnosen in der OND-Gruppe. Angegeben als Anzahl der Patienten *n*. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen. PNP Polyneuropathie. LEMS Lambert-Eaton-myasthenisches Syndrom.

Diagnose	Patientenanzahl <i>n</i>
Kaudasyndrom	1
Myelitis	1
Myeloradikulitis	3
PNP	2
Enzephalitis	2
LEMS	1

3. Para

Das europäische Netzwerk paraneoplastischer neurologischer Erkrankungen (PNS Euronetwork) stellte Diagnosekriterien auf, die eingangs beschrieben wurden (Graus et al. 2004) und als Grundlagen der Gruppeneinteilung dieser Studie galten. Diese führen

zu zwei Ebenen der diagnostischen Sicherheit, einem definitiven oder einem möglichen paraneoplastischen Syndrom (Abbildung 2).

Für diese Arbeit wurden in die Gruppe Para 34 Patienten eingeschlossen, die die Kriterien für ein definitives PNS erfüllten (Graus et al. 2004). Tabelle 6 zeigt die vorkommenden Diagnosen und Tumorerkrankungen der Para-Patienten. Es wurden in diese Gruppe 16 weibliche und 18 männliche Patienten aufgenommen, deren mittleres Alter bei 63.2 ± 9.6 Jahren lag.

Tabelle 6: Vorkommen der verschiedenen paraneoplastischen Diagnosen mit den entsprechenden Tumorerkrankungen in der Para-Gruppe. Angegeben als Anzahl der Patienten n. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. GBS Guillian-Barré-Syndrom (Polyradikuloneuritis). PNP Polyneuropathie. LEMS Lambert-Eaton-myasthenisches Syndrom. Ca Karzinom. SCLC kleinzelliges Bronchialkarzinom (small cell lung cancer). Bronchial-Ca alle Typen bis auf SCLC.

Diagnose	Tumor (Häufigkeit)	Patientenanzahl n
Paraneoplastisches GBS	Lymphom (1) Pankreas-Ca (1)	2
PNP	Lymphom (2) Ovarial-Ca (2) Bronchial-Ca (1) SCLS (9) Karzinoid (1) Melanom (1) Nierenzell-Ca (2) Nieren-Ca (1)	19
Paraneoplastische cerebelläre Degeneration	Nieren-Ca (1) Ovarial-Ca (4) SCLC (2)	7
Limbische Enzephalitis	Zungen-Ca (1) SCLC (1) Seminom (1)	3
LEMS	Bronchial-Ca (1) SCLC (1)	2
Gastrointestinale Pseudoobstruktion	SCLC (1)	1

4. Para-ANA

Als vierte Gruppe wurden die Paraneoplasien mit ANA eingeteilt. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe klinisch kürzlich beschriebener Patienten (Tschernatsch et al. 2005), bei denen ein neurologisches Syndrom in zeitlicher Assoziation mit einem Tumor auftrat (mögliches PNS nach den Kriterien von Graus et al. 2004).

Zusätzlich konnte bei diesen Patienten hochtitrige ANA ohne begleitende antineuronale Antikörper nachgewiesen werden. Neurologisch zeigte sich bei den hier ausgewählten Patienten eine paraneoplastische PNP und folgende Tumorerkrankung: Mamma-Ca (4), Non-Hodgkin-Lymphom (1), Melanom (1), Sarkom (1) und SCLC (1). Die Gruppe setzte sich aus acht Patienten, davon vier weibliche und vier männliche, zusammen. Das durchschnittliche Alter betrug 65.2 ± 10.2 Jahre.

2.2 Methoden

Die Patienten- und Kontrollseren wurden auf das Vorkommen von Autoantikörper-Subklassen untersucht. Dabei kamen der Indirekte Immunfluoreszenztest (IFT), der Immunoblot mit rekombinanten onkoneuralen Antigenen, der Western Blot und die Durchflusszytometrie zum Einsatz. Zum Einen galt es entsprechend unserer Fragestellungen die Subklassenverteilung der antineuronalen Antikörper zu beschreiben. Dafür verwendeten wir den IFT, den Immunoblot mit rekombinanten onkoneuralen Antigenen und den Western Blot. Zum Anderen sollte die Subklassenverteilung der ANA in den verschiedenen Gruppen verglichen werden. Die entsprechenden Patientenseren wurden dafür mit einer Kombination aus IFT und Western Blot analysiert. Primär galt der Nachweis im IFT. Als Bestätigungstest wurde der Nachweis im Western Blot herangezogen. Außerdem wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob sich paraneoplastische und nicht-paraneoplastische neuroimmunologische Erkrankungen in der Subklassenverteilung oberflächenbindender Antikörper unterscheiden. Hierfür wurden die Patientenseren der Gruppen IRD, Para-ANA und HC durchflusszytometrisch auf extrazelluläre Bindungen der Antikörper in den IgG-Subklassen untersucht.

2.2.1 Verwendete Antikörper und Puffer

In der Durchführung der Versuche wurden in der vorliegenden Arbeit verschieden markierte Antikörper verwendet. Tabelle 7 stellt diese zusammenfassend mit ihren entsprechenden Verdünnungen dar. Alle verwendeten Puffer sind in Tabelle 8 unter Angabe ihrer entsprechenden Zusammensetzung bei der Herstellung aufgeführt.

Table 7: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper mit Angabe des Herstellers und verwendeter Verdünnung. FITC Fluoresceinisothiocyanat. AP Alkalische Phosphatase.

Antikörper	Hersteller/Bezugsquelle	Verdünnung
Monoklonaler Fluorescein (FITC)-markierter Maus Anti-Human-IgG1	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1 : 32
Monoklonaler FITC-markierter Maus Anti-Human-IgG2	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1 : 16
Monoklonaler FITC-markierter Maus Anti-Human-IgG3	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1 : 16
Monoklonaler FITC-markierter Maus Anti-Human-IgG4	Sigma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	1 : 16
Alkalische Phosphatase (AP)-konjugierter Anti-Human-Gesamt-IgG	Dako Cytomation, Denmark AIS, Glostrup, Denmark	1 : 1000
AP-konjugierter Maus Anti-Human-IgG1	Zymed, San Francisco, California, USA	1 : 250
AP-konjugierter Maus Anti-Human-IgG2	Zymed, San Francisco, California, USA	1 : 500
AP-konjugierter Maus Anti-Human-IgG3	Zymed, San Francisco, California, USA	1 : 500
AP-konjugierter Maus Anti-Human-IgG4	Zymed, San Francisco, California, USA	1 : 500

Tabelle 8: Zusammenstellung der verwendeten Puffer und ihre Zusammensetzung. PBS phosphate buffered saline. FACS Fluorescence Activated Cell Sorting. SDS sodium dodecyl sulfate.

Puffer	Herstellung
PBS-Puffer (10x)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 85 g NaCl ▪ 14,2 g Na₂HPO₄ ▪ 2,9 g NaH₂PO₄ ▪ auf 1 l aqua dest.
PBS/Tween	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 100 ml PBS (10x) ▪ 900 ml aqua dest. ▪ 2 ml Tween 20 (Merck, Germany).
Running Buffer	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 40 ml Buffer ((20x), (NuPage® MOPS SDS Running buffer (20x), inVitrogen, Carlsbad, CA) ▪ 760 ml aqua dest.
Transfer Buffer	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 40 ml Konzentrat (NuPage® Transfer buffer (20x), inVitrogen, Carlsbad, CA) ▪ 760 ml aqua dest. ▪ 200 ml Methanol ▪ 1 ml Antioxidans (NuPage® Antioxidant, Carlsbad)
Mischpuffer	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 50 ml PBS (10x) ▪ 450 ml aqua dest. ▪ 2,5 ml Tween 20 ▪ 5,5 g Milchpulver (2% fettfreie Trockenmilch, fat free dried skimmed milk, Sommerfield, Bistol, GB)
FACS-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 500 ml PBS (1x) ▪ 5 ml 10% NaN₃ ▪ 5 ml fetales Kälberserum (FCS, HyClone, PerbioScience, USA)

2.2.3 Indirekter Immunfluoreszenztest

Der IFT diente der Untersuchung von antineuronalen und antinukleären Antikörpern und ihren Subklassen in den verschiedenen Patientengruppen. Dabei wurden Objektträger mit unfixierten Gefrierschnitten aus Kleinhirn, Darm und humanen Epithelzellen (Hep-2 Zellen) verwendet (Neurologie-Mosaik 13, Euroimmun-AG, Lübeck). Die Patientenseren wurden 1:50 mit PBS/Tween 0,2% verdünnt und je 25 µl auf die vorgegebenen Kästchen pipettiert. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden danach passend auf diese verdünnten Seren aufgebracht und bei Raumtemperatur und Dunkelheit 30 Minuten inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen der Objektträger mit PBS/Tween 0,2% erfolgte der zweite Inkubationsschritt für 30 Minuten in Dunkelheit und bei Raumtemperatur. Als Sekundärantikörper wurden FITC-markierte Anti-Human IgG1 - IgG4 Antikörper (IgG1 in PBS/Tween 0,2% 1:32 verdünnt, IgG2 - IgG4 in PBS/Tween 0,2% 1:16 verdünnt; Sigma, Steinheim) verwendet. Danach erfolgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS/Tween 0,2%. Die Objektträger wurden nun mit dem Eindickmedium Glycerol (Phosphat gepuffert, pH 8,4, Euroimmun, Lübeck) beschichtet und mit Deckgläschen versehen und somit fixiert. Die Beurteilung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops der Firma Zeiss (Abbildung 3). Als Positivkontrolle dienten bereits bekannte Anti-Hu positiven Patientenseren. Seren von Gesundkontrollen wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Tabellarisch wurden die Ergebnisse dokumentiert.

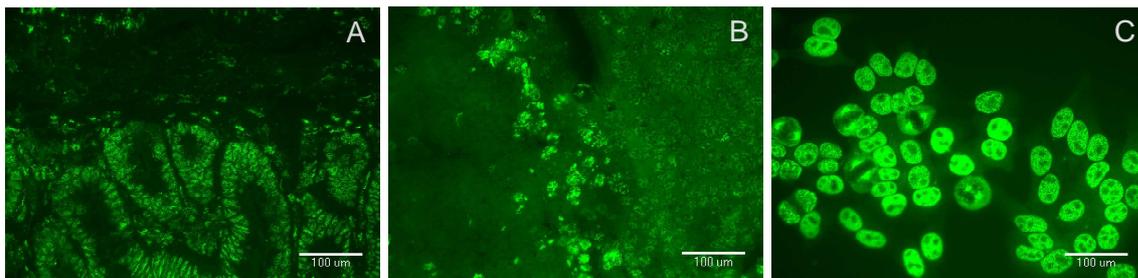


Abbildung 3: Repräsentative Abbildung eines IFT eines Para-Patienten mit einem FITC-markierten Anti-Human IgG2 Antikörper (Verdünnung 1:16) auf unfixierten Gefrierschnitten aus Darm (A), Kleinhirn (B) und humanen Epithelzellen (Hep-2 Zellen, C). Positiver Nachweis von Bergmann-Glia-Zellen (B) und ANA (C). Originalvergrößerung x 40. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. FITC Fluoresceinisothiocyanat.

2.2.4 Immunoblot mit rekombinanten onkoneuralen Antigenen

Als rekombinanter Immunoblot zum Nachweis der paraneoplastischen Autoantikörper Anti-Hu, Anti-Yo, Anti-Ri, Anti-CV2/CRMP5, Anti-Amphiphysin und Anti-MA2 findet der handelsübliche ravo PNS-Blot (ravo PNS-Blot, invitro test, ravo Diagnostika GmbH, Freiburg) in der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Klinik für Neurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen Anwendung. Dieser Immunoblot wurde in der vorliegenden Arbeit zur Beschreibung der Subklassenverteilung antineuronaler Antikörper herangezogen.

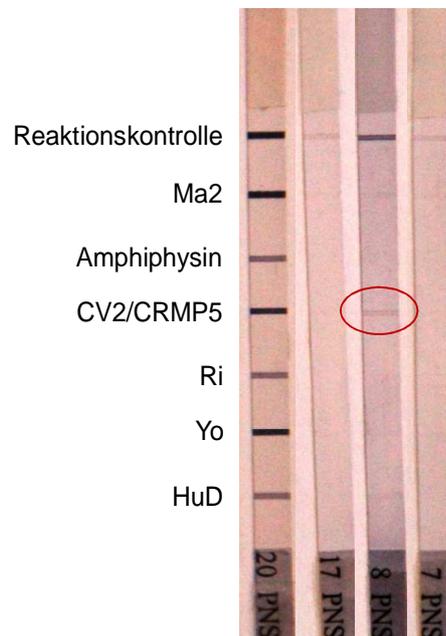


Abbildung 4: Repräsentative Abbildung eines ravo PNS-Blots eines Para-Patienten mit einem AP-konjugierten Anti-Human IgG1 (Streifen 7)- und einem AP-konjugierten Anti-Human IgG2 Antikörper (Streifen 8). Verdünnung je 1:500. Positiver Nachweis von CV2/CRMP5 (Streifen 8, rote Markierung). Positivkontrolle Streifen 20. Negativkontrolle Streifen 17. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. AP Alkalische Phosphatase.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls: Die Patientenseren wurden in dem gebrauchsfertigen Probenverdünnungspuffer 1:10 vorverdünnt. Die Teststreifen wurden ebenfalls mit diesem Probenverdünnungspuffer in dem dafür vorgesehenen Rillengefäß überschichtet und mit dem vorverdünnten Seren für eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert (Serumverdünnung 1:500 bzw. 1:250). Dem schloss sich ein fünfmaliger Waschvorgang mit Waschpuffer (Waschpufferkonzentrat 1:20 mit aqua destillata (aq. dest.)) an. Die

Sekundärinkubation mit dem AP-konjugierten Anti-Humanen IgG1 - IgG4 Antikörper (Verdünnung je 1:250 und 1:500; Zymed, San Francisco) erfolgte für 30 Minuten. Die Positivkontrolle, die gebrauchsfertig dem Testsystem beiliegt, wurde im zweiten Inkubationsschritt mit dem vorgegebenen Konjugat versehen. Nach wiederholtem Waschen (fünfmal mit Waschpuffer) erhielt jeder Teststreifen eine Inkubation mit BCIP-NBT-Substrat für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schwenker. Die Reaktion wurde mit aq. dest. gestoppt, die Streifen getrocknet und letztlich mit dem Kontrollstreifen des Herstellers verglichen (Abbildung 4).

2.2.5 Western Blot

Zur Bestätigung der im IFT positiv befundenen Patientenseren verwendeten wir einen Western Blot mit löslichen Proteinen aus Rattenzerebellum. Die Präparation und Gewinnung des Rattenzerebellums ist eine etablierte Methode im Labor der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Klinik für Neurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Zur weiteren Verwendung lagerte das zu 0,05 g portionierte Gewebe aus Rattenzerebellum bei -20°C.

Zur Probengewinnung wurde zunächst dem entsprechendem Gewebe zur Deaktivierung freier Enzyme 100 µl Proteinaseinhibitor (Proteinase-Inhibitor-Cocktail, Sigma, Deisenhofen) zugegeben, mit PBS-Puffer verdünnt, anschließend mit Hilfe eines Stößels gemischt und mechanisch zerkleinert. Nachfolgend wurden die Zellen der Gewebelösung im Ultraschallhomogenisator (Bandelin, UW 2070) für drei Zyklen à 15 Sekunden homogenisiert. Die Probe wurde drei Minuten zentrifugiert und die lösliche Proteinfraction als Überstand abpipettiert. Die Proteinkonzentration des Homogenisats wurde nephelometrisch ermittelt (ProSpec, Dade Behring, Marburg) und durch Verdünnung mit PBS auf 2 g/l eingestellt. Die Proteine wurden im Verhältnis 1:4 mit LDS sample Buffer (NuPage®, invitrogen, Carlsbad, CA) verdünnt und für fünf Minuten bei 80 - 90°C erhitzt. Das im sample Buffer enthaltene LDS diente der Neutralisierung der unterschiedlichen Ladungen der Proteine, so dass in der nachfolgenden Proteinauftrennung im Spannungsfeld die Laufstrecken der Proteine ausschließlich von deren Größe abhängig sind. Damit ist ein Vergleich der jeweiligen Proteine erst möglich. Die Proteinlösung wurde portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -24°C asserviert. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben vorerst für fünf Minuten bei ca. 70°C erwärmt. Die Proteinauftrennung erfolgte mittels Elektrophorese auf Gradientengelen (NuPage® 4 - 12% Bis-Tris-Gel, 1,0 mm x 2D well, invitrogen, Carlsbad, CA) in einer entsprechenden Western Blot-Kammer (XCell

Sure Lock™ Elektrophoresis Cell, Invitrogen, Carlsbad, CA) beginnend mit 20 mA für 10 Minuten und anschließend 90 Minuten mit 100 mA (Stromgeber Bio Rad, Power Pac 1000, USA). Dafür wurden die äußere Kammer der Einheit mit Running buffer und die innere Kammer mit Running buffer und Antioxidans (NuPage®, Antioxidant, Carlsbad) gefüllt. In die kleine Tasche des Gradientenpolyacrylamidgels wurden 12 µl Standard (See Blue Plus 2® Prestained Standard (1x), inVitrogen, Carlsbad, CA) pipettiert, welcher später als Proteingrößenstandard auf der Membran fungierte. In die große Geltasche wurden 100 µl der Probe und 11 µl Sample Reducing Agent (NuPage® Sample Reducing Agent (10x), inVitrogen, Carlsbad, CA) geladen. Die Proteine wurden dann in dem Blotmodul (X Cell II™, Blot Module, Invitrogen, Carlsbad, CA) in einer Semidry-Kammer mit Transfer Buffer bei 150 mA für zwei Stunden auf eine Nitrozellulosefolie transferiert. Das Modul wurde dafür zuvor in entsprechender Reihenfolge mit Schwämmen (Sponge Pad for XCell II™ Blotting 8 pk, inVitrogen, Carlsbad), Filtern (GB 002, Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schnell, Bio Science GmbH, Dassel), den vorbereiteten Gelen und speziellen Folien (PROTRAN® Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schnell, Bio Science GmbH, Dassel) bestückt (Abbildung 5).

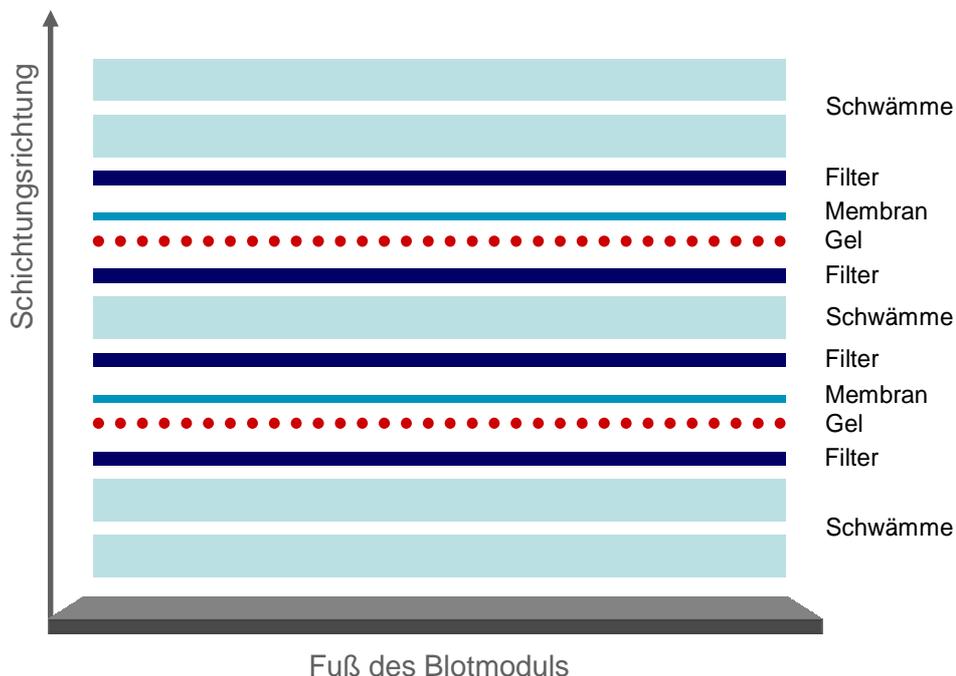


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Reihenfolge der Schichtung von Schwämmen, Filtern, Membranen und Gelen im Blotmodul eines Western Blot-Versuches.

Nachfolgend wurden die Membranen mit Tintenstain (aus 1% Tinte, 1% Essigsäure und 98% Wasser) zur Überprüfung des korrekten Transfers gefärbt. So konnten gleichzeitig auch Stellen eines erfolglosen Transfers markiert und ausgeschnitten werden. Die Folien wurden dann wieder mit 0,1 mol NaOH entfärbt, in aq. dest. geschwenkt und nach dem Trocknen in nummerierte Streifen geschnitten. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Streifen bei 4°C in Falcontubes. Zur Austestung wurden die Teststreifen (nach 15-minütigem Blocken unspezifischer Reaktionen mit Mischpuffer) mit den Patientenseren in einer Verdünnung mit Puffer von 1:100 für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schwenker (Heidolph Instruments, Rotamax 120, Schwabach) inkubiert. Die Negativkontrolle stellte ausschließlich Mischpuffer dar. Dem schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang je fünf Minuten auf dem Schwenker mit Mischpuffer an. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schwenker. Es wurden der AP-markierte Anti-Human-IgG Gesamt-Antikörper (1:1000 mit Mischpuffer verdünnt; Zymed, San Francisco) bzw. die AP-markierten Anti-Human-IgG1 - IgG4 Antikörper (IgG1 1:250, IgG2 1:500, IgG3 1:500 und IgG4 1:500 je mit Mischpuffer verdünnt; Zymed, San Francisco) verwendet. Nach erneutem Waschen (dreimal fünf Minuten) schloss sich die Visualisierung spezifischer Reaktionen mit dem BCIP-NBT-Substrat (5Brom-4Chlor-3Indolyl-Phosphat/Nitro Tetrazolium Blue Chloride, SIGMA, Steinheim) für 10 Minuten an. Die Reaktion wurde mit aq. dest. gestoppt. Die Blotstreifen mit den verschiedenen Bandenmustern wurden mit der Negativkontrolle und der vom Hersteller mitgelieferten Standardvorgabe verglichen. Entsprechend der Höhe der angefärbten Banden konnte das Molekulargewicht abgelesen werden.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie (FACS) lassen sich extra- und intrazelluläre Bindungen von Autoantikörpern nachweisen. In unseren Versuchen stand der Nachweis extrazellulärer Bindungen der Autoantikörper in den IgG-Subklassen in den Gruppen IRD, Para-ANA und HC im Vordergrund. Hierfür wurde humane embryonale Nierenfibroblasten (HEK) der Zelllinie 293 in der exponentiellen Wachstumsphase eingesetzt. Diese HEK 293-Zelllinie und ihre Kultivierung sind im Labor der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe der Klinik für Neurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen etabliert. Die HEK 293-Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank (Stericult 200 Incubator, Labotec GmbH, Göttingen) kultiviert. Als Kulturmedium wurde RPMI-1640 (Gibco, Karlsruhe) mit 10% fetalem Kälberserum

(FCS, HyClone, PerbioScience, USA), 1% L-Glutamin (Sigma, Steinheim), Streptomycin (20mg/l, Sigma, Steinheim) und Penicillin (20000 IE/l, Sigma, Steinheim) verwendet.

In Vorbereitung auf die durchflusszytometrische Messung wurde die kultivierte Zellsuspension nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer für vier Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet erneut mit FACS-Puffer verdünnt. Je 100 µl dieser Zellsuspension (10^6 Zellen/ml) wurde in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte (U-bottom, Cellstar®, Greiner Bio-one) gegeben und vier Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen und die Pellets auf dem Vortexschüttler (MS 2 Minishaker, IKA®, Wilmington) resuspendiert. Im ersten Inkubationsschritt wurden die Zellen mit je 50 µl des Patientenserums (1:100 mit FACS-Puffer verdünnt) beschichtet und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit je 50 µl FACS-Puffer gewaschen, vier Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und resuspendiert mittels Vortexer. Dieser Waschvorgang wiederholte sich mit 100 µl FACS-Puffer nach gleichem Muster. Im zweiten Inkubationsschritt wurden jeweils 50 µl des entsprechenden subklassenspezifischen monoklonalen FITC-markierten Anti-Humanen IgG Antikörpers (Sigma, Steinheim) in die 96-Loch-Platte pipettiert und 20 Minuten bei 4°C bei Dunkelheit inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden dabei in folgenden Verdünnungen (in FACS-Puffer) eingesetzt: Gesamt-IgG 1:75, IgG1 1:32 bzw. IgG2 - IgG4 1:16. Das Pipettieren erfolgte nach einem zuvor aufgestellten Schema unter Verwendung einer Isotypen- und einer Negativkontrolle. Als Isotyp wurde Negativ Control Mouse IgG (Dako, Denmark) verwendet. Dabei handelt es sich um Immunglobuline der nichtimmunisierten Maus, die mögliche unspezifische Bindungen an der Zelloberfläche verdeutlichen sollen. Als Negativkontrolle wurde FACS-Puffer sowohl im ersten als auch im zweiten Inkubationsschritt eingesetzt um eine eventuell bestehende Autofluoreszenz der Zellen abschätzen zu können. Im Anschluss an die zweite Inkubationsphase folgte der zweistufige Waschvorgang wie oben bereits beschrieben. Jede Vertiefung wurde mit 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und dies in die bereits 200 µl FACS-Puffer enthaltenen FACS-Röhrchen für die anschließende Messung im Durchflusszytometer überführt. Die Expression von entsprechenden Oberflächenmolekülen wurde mit Hilfe von Fluoreszenz im FACS-Calibur (BD Bio Science) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der CellQuest®-Software. Jede Probe wurde auf IgG-Gesamt und IgG1 - IgG4 getestet und im dot-plot und Histogramm-plot grafisch dargestellt. Der Schwellenwert für das jeweilige Experiment wurde aus dem Mittelwert addiert mit der 2,5-fachen Standardabweichung der mitgeführten Kontrollprobanden errechnet. Messwerte oberhalb dieses

Schwellenwertes (Cut-off) wurden als positiv gewertet. Die Abbildung 6 stellt beispielhaft je ein FACS-Experiment eines IRD- und eines Para-ANA-Patienten im Vergleich mit einer Gesundkontrolle dar.

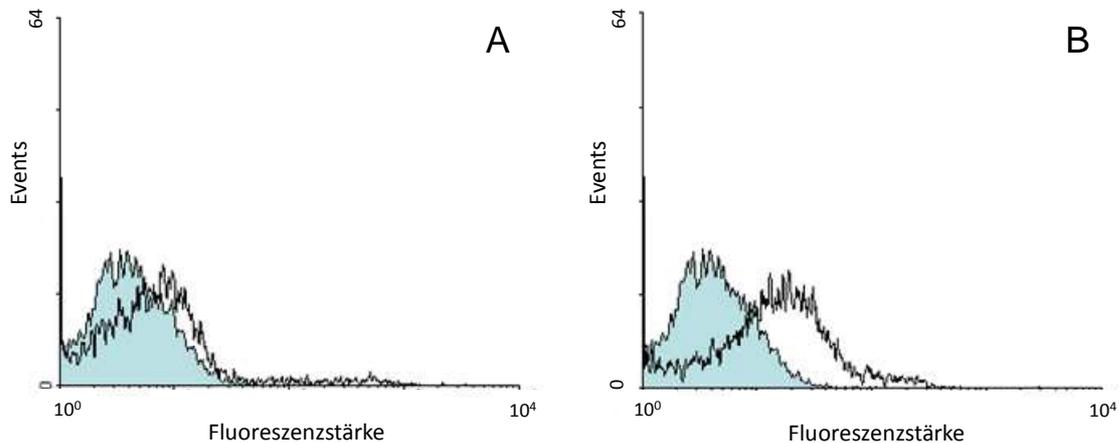


Abbildung 6: Oberflächenbindung in der Subklasse IgG1 eines IRD-Patienten (A, transparenter Graph) und eines Para-ANA-Patienten (B, transparenter Graph) im Vergleich mit einer Gesundkontrolle (A und B, blauer Graph) im FACS mit HEK 293-Zellen unter Verwendung eines FITC-markierten Anti-Human-IgG Antikörpers. x-Achse: Fluoreszenzstärke der einzelnen Zellen, y-Achse: Anzahl der gemessenen Zellen. IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). HEK humane embryonale Nierenfibroblasten der Zelllinie 293. FITC Fluoresceinisothiocyanat.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software Graph Pad Prism 4 Version 4.02 © (San Diego, USA). Die Werte der laborchemischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des t-Testes und bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen mit dem ANOVA-Test auf Signifikanz überprüft. Für Häufigkeitsvergleiche zwischen den Gruppen fand der Chi-Quadrat-Test Anwendung. Ein $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

3. Resultate

3.1 Häufigkeit der Autoantikörper in den verschiedenen Patientengruppen

Die Patienten der verschiedenen Gruppen dieser Studie unterschieden sich neben ihren klinischen Befunden (siehe 2.1) im Vorkommen unterschiedlicher Autoantikörper-Spezifitäten.

3.1.1 Antineuronale Antikörper

Antineuronale Antikörper hatten ausschließlich Patienten der Para-Gruppe, nicht aber Patienten der IRD-, Para-ANA-, OND- oder HC-Gruppe (IRD 0/18, Para-ANA 0/8, Para 29/34 (85.3%), OND 0/10, HC 0/20, $p < 0.0001$). Es fanden sich in der Gruppe der Paraneoplasiepatienten dabei antineuronale Antikörper gegen verschiedene definierte Autoantigene in unterschiedlicher Häufigkeit (Tabelle 9).

Tabelle 9: Häufigkeit der verschiedenen antineuronalen Antikörper-Spezifitäten in der Para-Gruppe. Angegeben als Anzahl n (Prozent). Bezeichnung der Antikörper Hu, Yo, CV2 nach den Initialen der Indexpatienten. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. CRMP5 Collapsin-response-mediated protein 5. VGCC Voltage-Gated Calcium Channel.

Antineuronaler Antikörper	Anzahl n (%)
Anti-Hu	14/29 (48.2%)
Anti-Yo	6/29 (20.6%)
Anti-CV2/CRMP5	8/29 (27.5%)
Anti-VGCC	1/29 (3.4%)

3.1.2 Antinukleäre Antikörper

Antinukleäre Antikörper in einer relevanten Titerhöhe ($>1/100$) konnten in allen vier untersuchten Patientengruppen (IRD, Para-ANA, Para und OND), nicht jedoch bei den gesunden Kontrollen vorgefunden werden. Dabei waren diese in der IRD- und in der Para-ANA Gruppe signifikant häufiger nachweisbar als in den Gruppen Para, OND und HC ($p < 0.0001$) (Tabelle 10).

Tabelle 10: Häufigkeit der antinukleären Antikörper (ANA) in den verschiedenen Gruppen. Angegeben als Anzahl *n* (Prozent). IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen. HC Gesundkontrollen.

Patientengruppe	Anzahl <i>n</i> (%)
IRD	18/18 (100%)
Para-ANA	8/8 (100%)
Para	6/34 (17.6%)
OND	2/10 (20%)
HC	0/20

Die medianen ANA-Titer in den verschiedenen Gruppen unterschieden sich signifikant voneinander. Der mediane ANA-Titer der IRD-Gruppe betrug $1/1000$ (25% und 75% Perzentile $1/800$ und $1/2000$) und der der Para-ANA-Gruppe $1/1000$ (25% und 75% Perzentile $1/400$ und $1/4000$). Bei den Gruppe Para, OND (25% und 75% Perzentile 0 und $1/200$) und HC war der ANA-Titer im Median 0 (Abbildung 7).

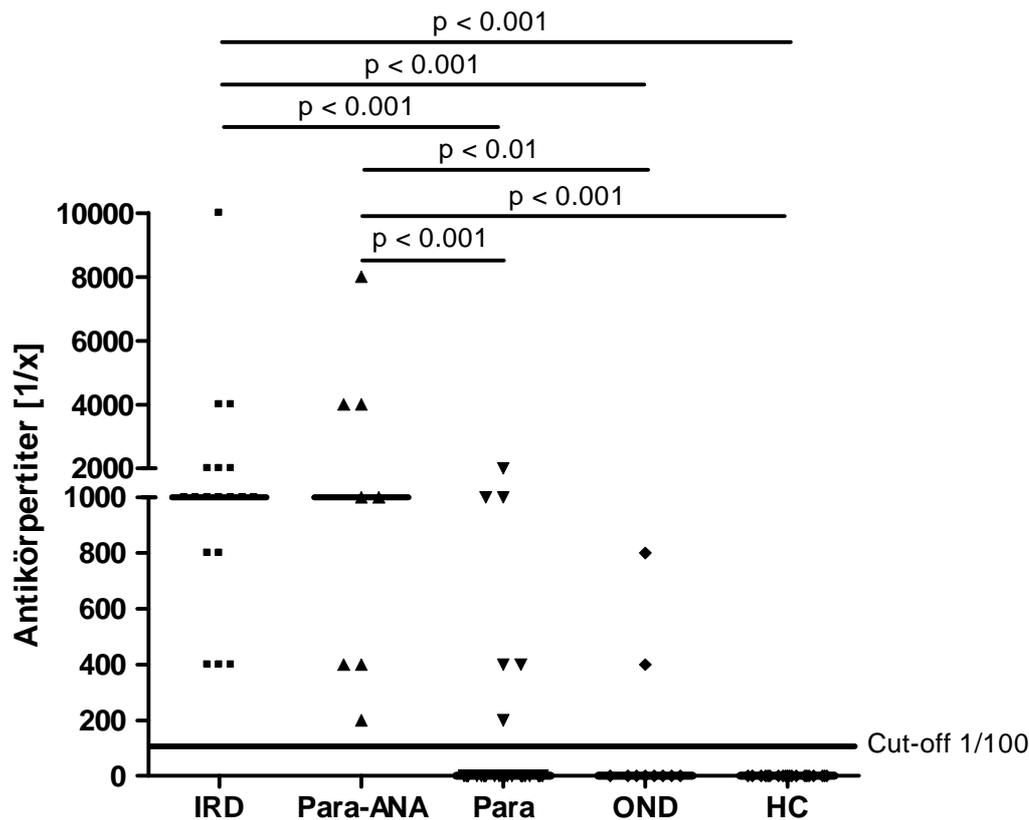


Abbildung 7: Verteilung der ANA-Titer in den verschiedenen Gruppen. Als positiv wurde ein Titer >1/100 bewertet (Cut-off als durchgezogene horizontale Linie). Darstellung als Einzelwerte und Median (Linie). Patienten der Gruppen IRD und Para-ANA hatten einen deutlich höheren medianen ANA-Titer als Patienten der Gruppen Para, OND und HC. IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen. HC Gesundkontrollen.

3.1.3 Weitere Antikörper

Sowohl in der Gruppe der OND als auch in der Para-Gruppe waren weitere Antikörper vorhanden (Tabelle 11). Antikörper gegen Astrozyten fanden sich in der OND-Gruppe bei 4/10 Patienten (40%) (IRD 0/18, Para-ANA 0/8, Para 0/34, HC 0/20, $p < 0.0001$). Bei jeweils einem OND-Patienten und einem Patienten der Para-Gruppe waren nicht weiter zu charakterisierende Antikörper gegen das Purkinjezellzytoplasma (also keine Anti-Yo oder Anti-Tr Antikörper) nachweisbar (IRD 0/18, Para-ANA 0/8). Ein OND-Patient zeigte Reaktivität gegen Aquaporin 4. Einen atypisch (bisher nicht

charakterisierten) antineuronalen Bindungscharakter hatten 2/10 OND- (20%) und 3/34 Para-Patienten (8.8%) (IRD 0/18, Para-ANA 0/8).

Tabelle 11: Häufigkeit weiterer Antikörper in den verschiedenen Gruppen. Angegeben als Anzahl n (Prozent). Nicht weiter zu charakterisierende Antikörper gegen das Purkinjezellzytoplasma (damit kein Anti-Yo oder Anti-Tr) vereinfacht benannt als Antikörperbindung Purkinjezellzytoplasma. IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen. HC Gesundkontrollen.

Antikörperbindung	IRD Anzahl n (%)	Para-ANA Anzahl n (%)	Para Anzahl n (%)	OND Anzahl n (%)	HC Anzahl n (%)
antiastrozytär	0/18	0/8	0/34	4/10 (40%)	0/20
Purkinjezellzytoplasma	0/18	0/8	1/34 (2.9%)	1/10 (10%)	0/20
atypisch antineuronal	0/18	0/8	3/34 (8.8%)	2/10 (20%)	0/20
Aquaporin 4	0/18	0/8	0/34	1/10 (10%)	0/20

3.2 Subklassenverteilung der Antikörper in den verschiedenen Gruppen

Die antineuronalen, antinukleären und andere Antikörper in den verschiedenen Patientengruppen zeigten eine unterschiedliche Verteilung der IgG-Subklassen.

3.2.1 Subklassenverteilung antineuronaler Antikörper

In dieser Arbeit wurden dabei die antineuronalen Antikörper (ausschließlich bei 29/34 Patienten der Para-Gruppe), die am häufigsten in dieser Studie (Anti-Hu und Anti-CV2/CRMP5) vertreten waren, nachfolgend näher betrachtet.

Die IgG-Subklassenverteilung der antineuronalen Autoantikörper wurde mittels IFT, Immunoblot mit rekombinanten onkoneuronalen Antigenen und Western Blot (Bestätigungstest) analysiert. Die Häufigkeit antineuronaler Antikörper in den Subklassen IgG1-IgG4 ist in Tabelle 12 gezeigt.

Tabelle 12: Häufigkeit antineuronaler Antikörper in den Subklassen IgG1 - IgG4 im IFT und im Immunoblot mit rekombinanten onkoneuronalen Antigenen in der Para-Gruppe. Angegeben als Anzahl n (Prozent). Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. CRMP5 Collapsin-response-mediated protein 5. VGCC Voltage-Gated Calcium Channel.

Antikörper	IgG1 Anzahl n (%)	IgG2 Anzahl n (%)	IgG3 Anzahl n (%)	IgG4 Anzahl n (%)
Anti-Hu	13/29 (44.8%)	3/29 (10.3%)	4/29 (13.7%)	0
Anti-Yo	3/29 (10.3%)	0	3/29 (10.3%)	0
Anti- CV2/CRMP5	3/29 (10.3%)	6/29 (20.6%)	0	0
Anti-VGCC	1/29 (3.4%)	0	1/29 (3.4%)	0

Die Subklassenverteilung unter den Anti-Yo- und den Anti-VGCC-positiven Patienten ist aufgrund der geringen Zahl positiver Patienten nicht aussagekräftig und an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt.

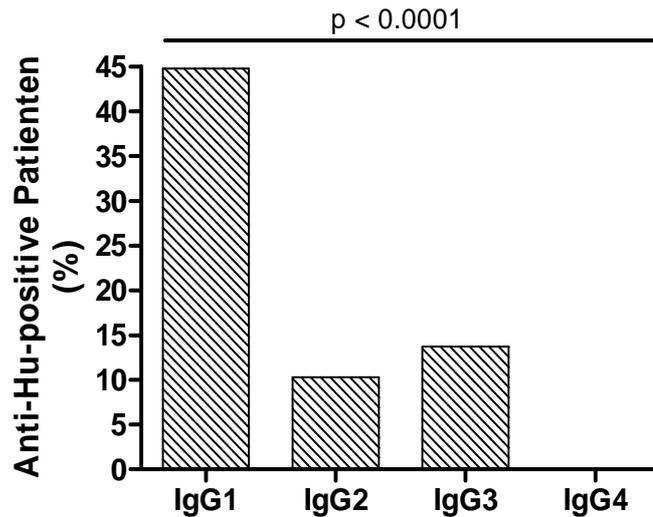


Abbildung 8: Subklassenverteilung der Anti-Hu positiven Para-Patienten (Prozent). Nachweis mittels Immunfluoreszenztest, Immunoblot mit rekombinanten onkoneuralen Antigenen und Western Blot. Der Autoantikörper Anti-Hu der Para-Patienten war am stärksten in der Subklasse IgG1, aber auch in den Subklassen IgG2 und IgG3 vertreten ($p < 0.0001$). Bezeichnung Hu nach den Initialen des Indexpatienten. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern.

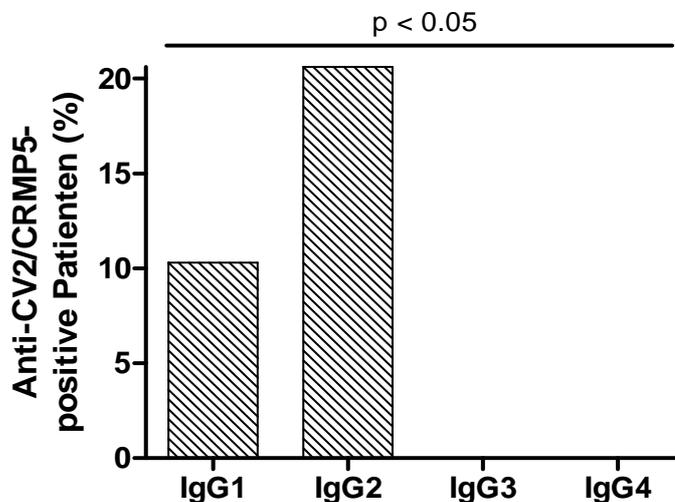


Abbildung 9: Subklassenverteilung der Anti-CV2/CRMP5 positiven Para-Patienten (Prozent). Nachweis mittels Immunfluoreszenztest, Immunoblot mit rekombinanten onkoneuralen Antigenen und Western Blot. Der Autoantikörper Anti-CV2/CRMP5 der Para-Patienten war vorherrschend in der Subklasse IgG2 vertreten ($p < 0.05$). Bezeichnung des Antikörpers CV2 nach den Initialen des Indexpatienten. CRMP5 Collapsin-response-mediated protein 5. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern.

Anti-Hu fand sich in 13/29 (44.8%) Fällen in der Subklasse IgG1, in 3/29 (10.3%) in der Subklasse IgG2 und bei 4/29 (13.7%) Fällen war eine Bindung in der IgG-Subklasse 3 zu verzeichnen; die Subklasse IgG4 war nicht vertreten ($p < 0.0001$; Abbildung 8). Unter den Patienten mit nachgewiesenem Anti-CV2/CRMP5 Antikörper waren 3/29 (10.3%) IgG1-positiv und 6/29 (20.6%) IgG2-positiv; ohne Bindung in den Subklassen IgG3 und IgG4 ($p < 0.05$; Abbildung 9).

3.2.2 Subklassenverteilung antinukleärer Antikörper

Die jeweils in den Gruppen IRD, Para-ANA, Para und OND, nicht aber bei den Gesundkontrollen vorkommenden ANA konnten mit Hilfe der Kombination aus IFT und Western Blot mindestens einer IgG-Subklasse zugeordnet werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Häufigkeit der Bindung von antinukleären Antikörpern (ANA) in den Subklassen IgG1 - IgG4 in den verschiedenen Gruppen. Angegeben als Anzahl *n* (Prozent). IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen. HC Gesundkontrollen.

Gruppe	IgG1 Anzahl <i>n</i> (%)	IgG2 Anzahl <i>n</i> (%)	IgG3 Anzahl <i>n</i> (%)	IgG4 Anzahl <i>n</i> (%)
IRD	12/18 (66.6%)	7/18 (38.8%)	10/18 (55.5%)	0
Para-ANA	5/8 (62.5%)	5/8 (62.5%)	8/8 (100%)	0
Para	2/34 (5.8%)	2/34 (5.8%)	2/34 (5.8%)	0
OND	2/10 (20%)	0	2/10 (20%)	0
HC	0	0	0	0

Als IgG1-positiv konnten 12/18 (66.6%) IRD-Patienten, 5/8 (62.5%) Para-ANA-Patienten, 2/34 (5.8%) Para-Patienten sowie 2/10 (20%) OND-Patienten identifiziert werden (HC 0/20), $p < 0.0001$. In der Subklasse IgG2 waren 7/18 (38.8%) Patienten der IRD-Gruppe, 5/8 (62.5%) Patienten der Para-ANA-Gruppe und 2/34 (5.8%) Patienten der Para-Gruppe positiv; keine IgG2-Autoantikörper fanden sich in den Gruppen OND und HC ($p < 0.0001$). Antikörper der Subklasse IgG3 fanden sich in den Gruppen IRD (10/18 (55.5%)), Para-ANA (8/8 (100%)), Para (2/34 (5.8%)) und OND (2/10 (20%)). Bei den gesunden Probanden fand sich keine Bindung in der IgG3-Subklasse ($p < 0.0001$). Kein Patient der verschiedenen Gruppen hatte Antikörper der Subklasse IgG4.

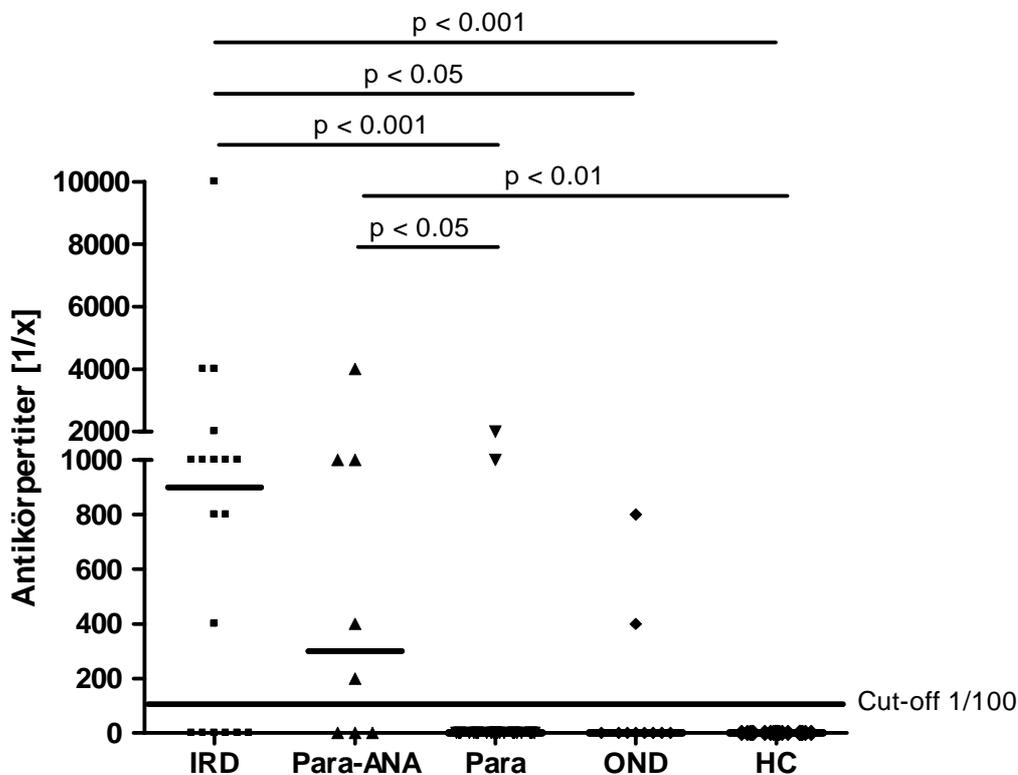


Abbildung 10: Verteilung der ANA-Titer in der Subklasse IgG1 in den verschiedenen Gruppen. Als positiv wurde ein Titer $>1/100$ bewertet (Cut-off als durchgezogene horizontale Linie). Darstellung als Einzelwerte und Mediane (Linie). IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen. HC Gesundkontrollen.

Der ANA-Titer im Median in der Subklasse IgG1 betrug in der IRD Gruppe 1/900 (25% und 75% Perzentile 0 und 1/1500), in der Para-ANA Gruppe 1/300 (25% und 75% Perzentile 0 und 1/1000) und in den Gruppe Para, OND (25% und 75% Perzentile 0 und 1/200) und HC jeweils 0. In der Abbildung 10 sind die signifikanten Unterschiede der medianen ANA-Titer der verschiedenen Gruppen dargestellt.

In der Subklasse IgG2 lagen die ANA-Titer im Median in den Gruppen IRD (25% und 75% Perzentile 0 und 1/1000), Para, OND und HC bei 0, nur in der Gruppe Para-ANA betrug dieser 1/700 (25% und 75% Perzentile 0 und 1/2500). Die signifikanten Unterschiede der medianen Titer der ANA mit Bindung in der IgG-Subklasse 2 der untersuchten Patientengruppen dieser Arbeit sind der Abbildung 11 zu entnehmen.

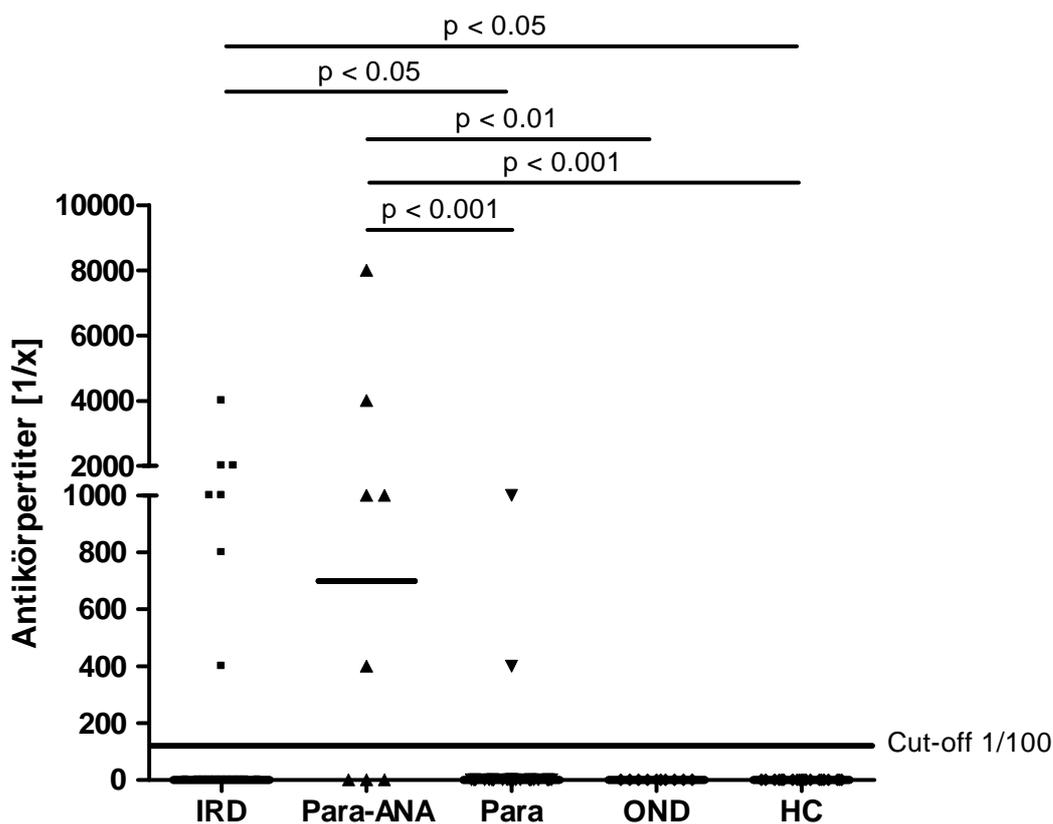


Abbildung 11: Verteilung der ANA-Titer in der Subklasse IgG2 in den verschiedenen Gruppen. Als positiv wurde ein Titer >1/100 bewertet (Cut-off als durchgezogene horizontale Linie). Darstellung als Einzelwerte und Median (Linie). IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen. HC Gesundheitskontrollen.

Die Verteilung der Titer der ANA in der Subklasse IgG3 und entsprechende signifikante Unterschiede der verschiedenen Patientengruppen zeigt die Abbildung 12. Der ANA-Titer im Median betrug 1/600 in der IRD-Gruppe (25% und 75% Perzentile 0 und 1/1500), 1/1000 in der Para-ANA-Gruppe (25% und 75% Perzentile 1/400 und 1/4000) und 0 in den Gruppen Para, OND (25% und 75% Perzentile 0 und 1/200) und HC.

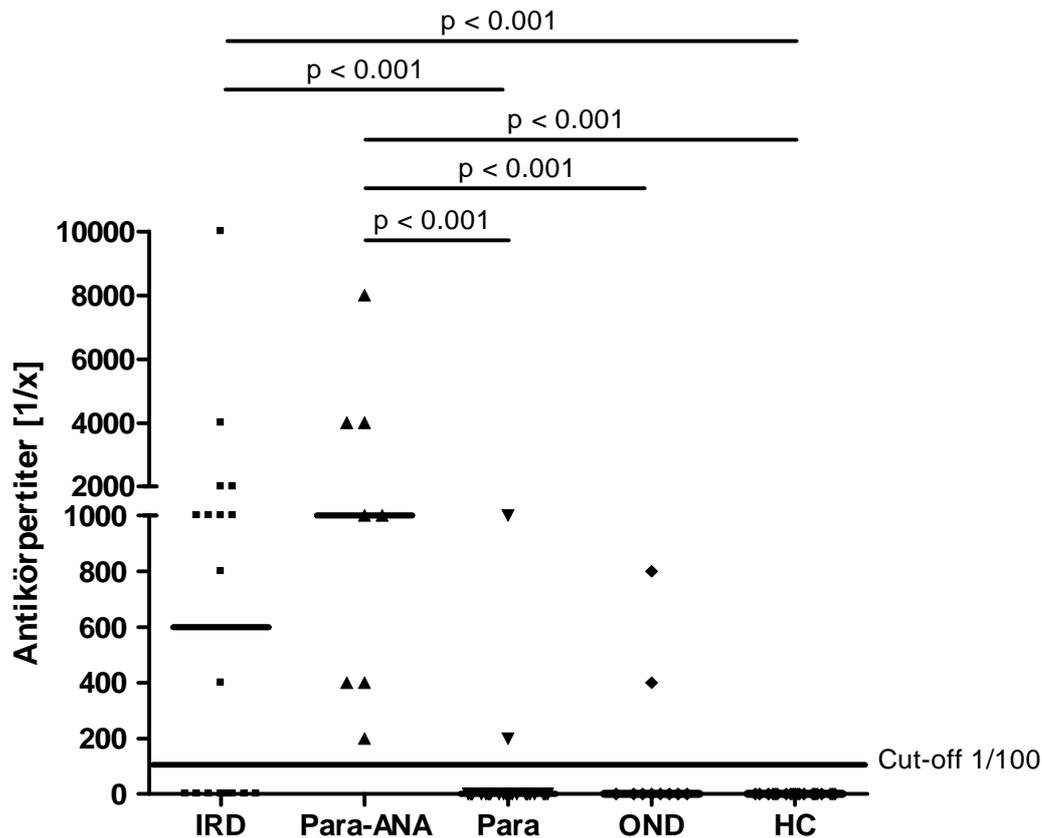


Abbildung 12: Verteilung der ANA-Titer in der Subklasse IgG3 in den verschiedenen Gruppen. Als positiv wurde ein Titer >1/100 bewertet (Cut-off als durchgezogene horizontale Linie). Darstellung als Einzelwerte und Median (Linie). IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen. HC Gesundkontrollen.

Zusammenfassend fanden sich sowohl bei den rheumatischen als auch bei den paraneoplastischen Erkrankungen mit ANA die ANA-Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3. Die Subklassenverteilung dieser zwei Patientengruppen, IRD und Para-ANA in der Gegenüberstellung ist jedoch signifikant unterschiedlich ($p < 0.0001$). Dabei haben

Patienten mit einem PNS häufiger antinukleäre Antikörper der Klasse IgG2 und IgG3 als Patienten mit IRD (Tabelle 14). Allerdings zeigt sich keine sichere Trennschärfe hinsichtlich der Einordnung in eine der beiden Gruppen durch Bestimmung der ANA-Subklassenverteilung der Patienten.

3.2.3 Subklassenverteilung weiterer Antikörper

Auch die in den Gruppen OND und Para nachgewiesenen Antikörper mit einem anderen Bindungsverhalten (beschrieben als antiastrozytär, atypisch antineuronal, gegen das Zytoplasma von Purkinjezellen bzw. gegen Aquaporin 4 gerichtet) unterlagen der weiteren Klassifizierung mittels der indirekten Immunfluoreszenz und dem Western Blot in der OND-Gruppe (Tabelle 14) und in der Para-Gruppe (Tabelle 15).

Tabelle 14: Häufigkeit der Bindung weiterer Antikörper in den Subklassen IgG1 - IgG4 in der Gruppe OND. Angegeben als Anzahl n (Prozent). Nicht weiter zu charakterisierende Antikörper gegen das Purkinjezellzytoplasma (damit kein Anti-Yo oder Anti-Tr) vereinfacht benannt als Antikörperbindung Purkinjezellzytoplasma. OND andere neuroimmunologische Erkrankungen.

Antikörper	IgG1 Anzahl n (%)	IgG2 Anzahl n (%)	IgG3 Anzahl n (%)	IgG4 Anzahl n (%)
antiastrozytär	3/10 (30%)	0	2/10 (20%)	0
Purkinjezell- zytoplasma	0	0	1/10 (10%)	0
atypisch antineuronal	1/10 (10%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	0
Aquaporin 4	1/10 (10%)	1/10 (10%)	0	0

Tabelle 15: Häufigkeit der Bindung weiterer Antikörper in den Subklassen IgG1 - IgG4 in der Gruppe Para. Angegeben als Anzahl n (Prozent). Nicht weiter zu charakterisierende Antikörper gegen das Purkinjezellzytoplasma (damit kein Anti-Yo oder Anti-Tr) vereinfacht benannt als Antikörperbindung Purkinjezellzytoplasma. Para paraneoplastische Syndrome mit antineuronalen Antikörpern.

Antikörper	IgG1 Anzahl n (%)	IgG2 Anzahl n (%)	IgG3 Anzahl n (%)	IgG4 Anzahl n (%)
Purkinjezell- zytoplasma	1/34 (2.9%)	0	1/34 (2.9%)	0
atypisch antineuronal	2/34 (5.8%)	0	2/34 (5.8%)	0

Diese weiteren Antikörper waren aber bei den Betroffenen nur in sehr geringer Anzahl nachweisbar. Demnach fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der IgG-Subklassenverteilung der hier genannten Antikörper.

3.3 Nachweis extrazellulärer Bindungen von Autoantikörpern

Durchflusszytometrisch wurden extrazelluläre Bindungen von Autoantikörpern gegen Oberflächenepitope der HEK 293-Zelllinie in den Gruppen IRD, Para-ANA und HC detektiert. Insgesamt ließen sich bei 14/18 (77.7%) IRD Patienten, bei 6/8 (75%) Para-ANA Patienten und bei einer Gesundheitskontrolle (1/20 (5%)) Bindungen an der Oberfläche der eingesetzten Zellen unter Verwendung eines FITC-markierten Anti-Human-IgG-Gesamt Antikörpers nachweisen ($p < 0.0001$; Abbildung 13).

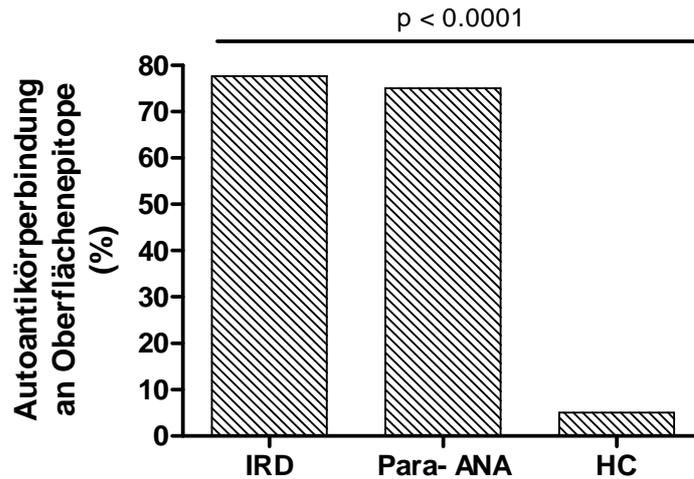


Abbildung 13: Nachweis von extrazellulärer Bindung von Autoantikörpern der untersuchten Gruppen im FACS unter Verwendung eines FITC-markierten Anti-Human-IgG-Gesamt Antikörpers (Prozent). Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit extrazellulärer Bindungen der IRD- und der Para-ANA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0.0001$). IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. HC Gesundkontrollen. FITC Fluoresceinisothiocyanat.

3.3.1 Subklassenverteilung von oberflächenbindenden Autoantikörpern

In der weiterführenden Klassifizierung mittels FACS zeigten in der Subklasse IgG1 14/18 (77.7%) Patienten der IRD-Gruppe, 5/8 (62.5%) Patienten der Para-ANA-Gruppe, aber keine Gesundkontrolle (HC 0/20) eine Bindung. In den Subklassen IgG2, IgG3 und IgG4 konnten in den verschiedenen Gruppen nur sehr wenige Bindungen an extrazelluläre Epitope identifiziert werden (Tabelle 16).

Tabelle 16: Häufigkeit der Bindung von Autoantikörpern in den Subklassen IgG1 - IgG4 in der Durchflusszytometrie in den verschiedenen Gruppen. Angegeben als Anzahl n (Prozent). Für das jeweilige Experiment in der einzelne Subklasse wurde ein Schwellenwert (Cut-off) aus der 2,5-fachen Standardabweichung vom Mittelwert der mitgeführten 20 Kontrollprobanden errechnet. Messwerte oberhalb dieses Schwellenwertes wurden als positiv betrachtet. IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. HC Gesundkontrollen.

Gruppe	IgG1 Anzahl n (%) (Cut-off 8,95)	IgG2 Anzahl n (%) (Cut-off 6,1)	IgG3 Anzahl n (%) (Cut-off 10,05)	IgG4 Anzahl n (%) (Cut-off 5,75)
IRD	14/18 (77.7%)	0	2/18 (11.1%)	1/18 (5.5%)
Para-ANA	5/8 (62.5%)	0	0	1/8 (12.5%)
HC	0	1/20 (5%)	0	0

Hinsichtlich der Bindungsstärke der Autoantikörper gegen Oberflächenepitope in der Subklasse IgG1 ließ sich zwischen den Patientengruppen und den gesunden Probanden ein signifikanter Unterschied feststellen (Abbildung 14A). Hingegen unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant in der extrazellulären Autoantikörperbindung in den Subklassen IgG2, IgG3 und IgG4 (Abbildung 14B-D).

Zusammenfassend zeigten also beide Gruppen, IRD und Para-ANA, in der Autoantikörperbindung an Oberflächenepitope vorherrschend eine IgG1-Antwort. Zwischen diesen rheumatischen, nicht-paraneoplastischen und den paraneoplastischen Erkrankungen fand sich jedoch in der Subklassenverteilung dieser Antikörper kein signifikanter Unterschied.

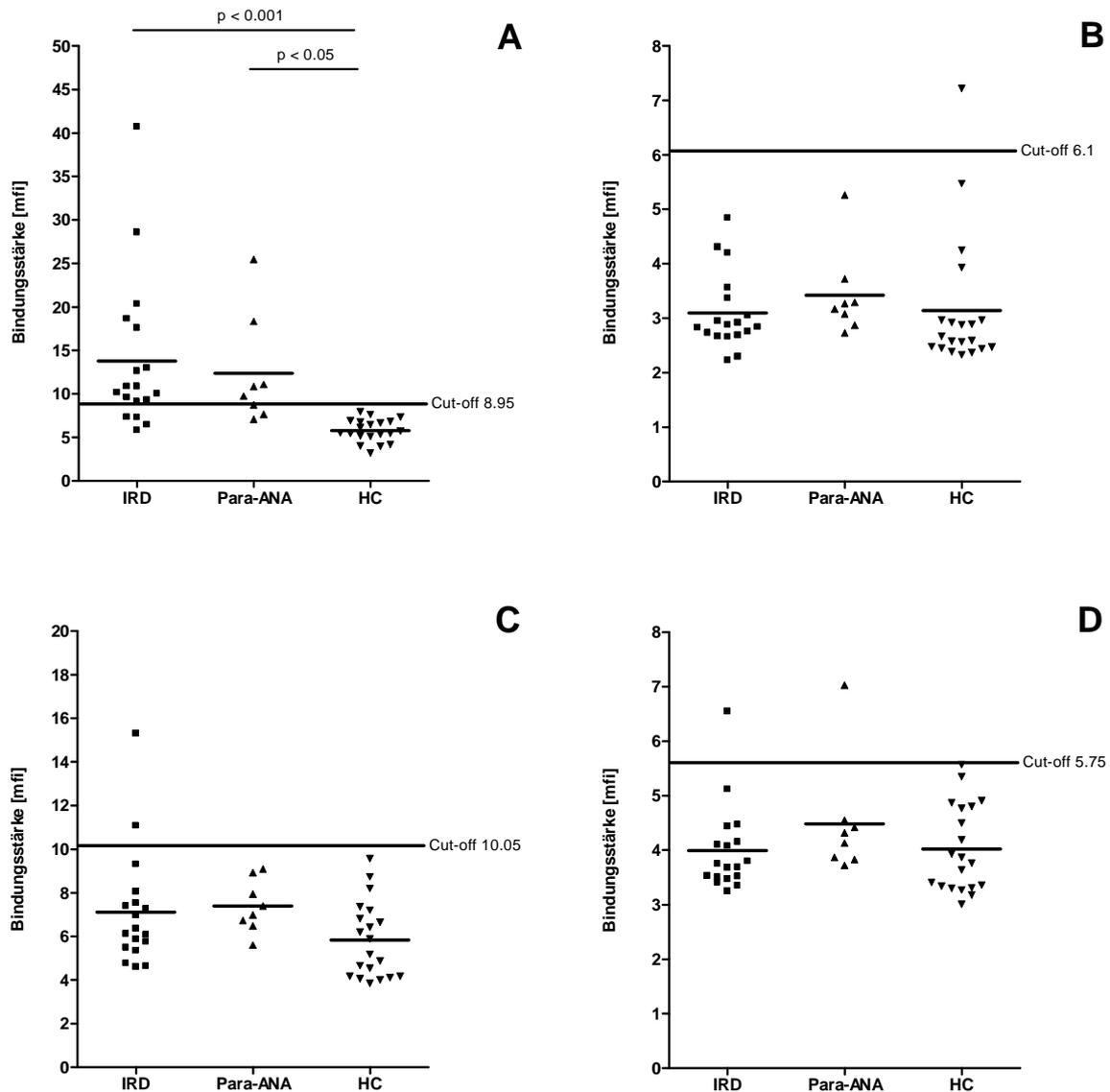


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Messung mit der HEK 293 Zelllinie zum Nachweis der Bindung von Autoantikörpern an Oberflächenepitope aus den Patientenseren verschiedener Gruppen in folgenden Subklasse: IgG1 (A), IgG2 (B), IgG3 (C) und IgG4 (D). Als positiv wurde jedes Ergebnis bewertet, das größer als die 2.5-fache Standardabweichung addiert zum Mittelwert der Kontrollgruppe war (Cut-off als durchgezogene horizontale Linie). Die Mittelwerte der einzelnen Gruppe wurden jeweils als kleine horizontale Linien markiert. Es fand sich ein signifikanter Unterschied in der extrazellulären Autoantikörperbindung in der Subklasse IgG1 zwischen den verschiedenen Gruppen. In den Subklassen IgG2, IgG3 und IgG4 unterschieden sich diese Gruppen nicht signifikant in der Bindung an Oberflächenepitope. IRD Inflammatorische rheumatische Erkrankungen (Kollagenosen). Para-ANA Paraneoplasien mit antinukleären Antikörpern. HC Gesundkontrollen.

4. Diskussion

4.1 Paraneoplastische neurologische Syndrome und antineuronale Autoantikörper

Als PNS werden Komplikationen von Tumorerkrankungen bezeichnet, die nicht durch den Tumor selbst, seine Metastasen, vaskuläre, infektiöse, metabolische oder therapiebedingte Ursachen ausgelöst sind. Syndrome des zentralen Nervensystems sind unter anderem das OMS, das SPS, die subakute zerebelläre Ataxie und die limbische Enzephalitis. Syndrome des peripheren Nervensystems hingegen sind die subakute, sensible Neuronopathie und die gastrointestinale Pseudoobstruktion. Bekannte Syndrome der neuromuskulären Synapse und des Muskels sind das LEMS und die Dermatomyositis (Antoine & Camdessanqué 2007; Storstein & Vedeler 2007). PNS kommen insgesamt selten vor (0,5 - 3% aller Tumorpatienten). Am häufigsten treten sie beim SCLC, Mammakarzinom, Ovarialkarzinom, Hodgkin-Lymphom und Thymom auf (Blaes 2002; Blaes 2012). Die klinische Manifestation eines PNS kann gleichzeitig mit dem Tumor auftreten oder nach der Tumordiagnose beobachtet werden. Zu 50 - 60% geht sie jedoch um Monate bis Jahre der Diagnosestellung des Tumors voraus (Blaes 2002). Damit stellt das Auftreten eines PNS ein Warnsignal für das Vorliegen einer Tumorerkrankung dar und sollte die umgehende Tumorsuche einleiten (Dropcho 1995; Dalmau & Posner 1996; Blaes 2002).

Zur Diagnostik eines PNS existieren von der Konsensusgruppe PNS Euronetwork spezielle Kriterien für ein definitives und ein mögliches PNS. Die neurologischen Syndrome sind dabei in klassische bzw. nicht-klassische unterteilt (Graus et al. 2004; Stich & Rauer 2013). Danach gilt ein PNS als definitiv, wenn beim Vorliegen eines klassischen PNS ein Tumor innerhalb von fünf Jahren nach Symptombeginn auftritt, mit oder ohne Nachweis antineuronaler Antikörper. Ebenso kann ein klassisches PNS ohne bekannten Tumor bei gleichzeitigem Vorliegen gut charakterisierter antineuronaler Antikörper nachgewiesen werden. Der Nachweis von Autoantikörpern ist sowohl für die PNS- als auch für die Tumordiagnose notwendig (Stich & Rauer 2013).

Als Pathomechanismus der PNS gilt eine autoimmunologische Kreuzreaktion: Manche Tumore exprimieren Antigene, die sonst im gesunden Individuum nur von Neuronen exprimiert werden (Darnell 1996). Reagiert der erkrankte Organismus mit einer effektiven Immunantwort auf den Tumor oder dessen Antigene, kommt es zur Suppression des Tumorwachstums (Rosenblum 1993). Andererseits richtet sich die Immunantwort auch gegen Strukturen des Nervensystems, die das identische Antigen

exprimieren und löst damit eine Funktionsstörung im Sinne einer PNS-Symptomatik aus. Voltz beschrieb folgendes Modell: Das intrazellulär lokalisierte, ektopt an den Tumorzellen exprimierte Antigen wird im Rahmen der Apoptose der Tumorzellen von dendritischen Zellen internalisiert und den CD4+ und CD8+ Zellen präsentiert. Die CD8+ Zellen erkennen das exprimierte Antigen als fremd. Die CD4+ Zellen überwinden die Blut-Hirn-Schranke, besiedeln den perivaskulären Raum und forcieren die intrathekale Antikörperbildung der B-Zellen. Außerdem kommt es zur Expression von MHC-Molekülen der Klasse I an der Neuronenoberfläche. Die Neuronen werden Zielstruktur der zytotoxischen T-Zellreaktion (Voltz 2002).

Die Rolle der gegen intrazelluläre Antigene gerichteten antineuronalen Antikörper in der Pathogenese der PNS ist nicht abschließend geklärt und wird kontrovers diskutiert. Anders stellt sich die Situation bei Autoantikörpern dar, die an extrazelluläre Epitope binden. So konnten bei der Neuromyotonie, der MG und dem LEMS die pathogene Bedeutung der Antikörper belegt werden (Lang et al. 1981; Pinto et al. 1998; Hart et al. 2002; Lang & Vincent 2003; Vincent et al. 2011). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass typische antineuronale Antikörper gegen intrazelluläre Antigene einen zytotoxischen Effekt erzeugen, z. B. die Zerstörung zerebellärer Körnerzellen oder die Schädigung von Darmplexusneuronen (Greenlee et al. 1993; Schäfer et al. 2000). Der Beweis einer pathogenen Wirkung der Autoantikörper *in vivo* konnte bislang nicht erbracht werden. Sowohl die Übertragung von Anti-Hu- oder Anti-Yo Antikörpern selbst als auch die Immunisierung mit den Antigenen lösten im Tiermodell kein klinisches PNS aus (Graus et al. 1991; Sillevius Smitt et al. 1995; Tanaka et al. 1995). Auch in der Arbeit von Verschuuren et al. gibt es keinen Hinweis, dass Anti-Hu-positive IgG-Fractionen auf verschiedenen Tumorzelllinien einen Effekt ausüben (Verschuuren et al. 1997). Hierbei wurden die IgG-Fractionen mit Protein A anstatt Protein G aufgereinigt. Protein A bindet aber nur die IgG-Subklassen 1, 2 und 4. Der ausbleibende Nachweis eines zytotoxischen Effektes in dieser Studie könnte durch den Verlust des IgG3 erklärt werden (Jean et al. 1994; Blaes et al. 2002). Es bleibt jedoch im Grundsatz umstritten, ob überhaupt antineuronale Antikörper *in vivo* in lebende Zellen eindringen können und dort eine pathologische Wirkung erzielen (Verschuuren et al. 1997; Vincent et al. 1998). Allein für den Autoantikörper gegen das intrazelluläre retinale Protein Recoverin, der bei der paraneoplastischen Retinadegeneration zu finden ist, konnte in Studien mit Ratten der Beweis der Pathogenität erbracht werden. Dieser Antikörper dringt in Photorezeptor- und Bipolarzellen ein und induziert Apoptose (Polans et al. 1991; Adamus et al. 1998).

Unter der Vielzahl der bislang beschriebenen antineuronalen Antikörper gibt es „gut charakterisierte“: Anti-Hu, Anti-Yo, Anti-Ri, Anti-Ma, Anti-Tr und Anti-CV2/CRMP5.

Deren sogenannten onkoneuralen, intrazellulären Zielantigene sind identifiziert. Diese Antikörper erlauben eher Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Tumor als auf ein bestimmtes PNS (Jaeckle et al. 1985; Dalmau & Posner 1996; Graus et al. 2001). Der zuerst beschriebene Anti-Hu Antikörper ist der häufigste von allen antineuronalen Antikörpern. Als Antigene wurden HuC, HuD, Hel-N1 identifiziert. Bei dem assoziierten Tumor handelt es sich in der Regel um ein SCLC (Dalmau et al. 1992). Klinisch weisen Anti-Hu-positive Patienten eine Kombination aus Neuropathie und Enzephalomyelitis auf (Dalmau et al. 1992, Graus et al. 2001). Aber auch die limbische Enzephalitis, die Kleinhirndegeneration und die Hirnstammenzephalitis werden mit Anti-Hu in Verbindung gebracht (Dalmau & Posner 1996).

Anti-CV2/CRMP5 als ebenso spezifischer Marker der PNS (Graus et al. 2004; Pittock et al. 2004) ist gegen das Zytoplasma der Oligodendrozyten gerichtet. Anti-CV2/CRMP5 Antikörper treten vorrangig in Assoziation mit SCLC und Thymomen auf (Camdessanché et al. 2006). Als klinische Manifestation werden sensomotorische axonale Neuropathien, Kleinhirndegeneration und Uveitis beschrieben (Antoine et al. 2001; Rudnicki & Dalmau 2005; Saloustros et al. 2010).

Vor allem in Assoziation mit Anti-HuD, Anti-Amphiphysin und Anti-CV2/CRMP5 entwickelt sich oft eine paraneoplastische periphere Neuropathie. Dagegen sind die Antikörper Anti-Ri, Anti-Yo und Anti-Ma2 hauptsächlich mit zentraler neurologischer Symptomatik assoziiert (Kaiser 1999; Rudnicki & Dalmau 2005). Die klinische Bedeutung der antineuronalen Antikörper liegt in dem Vorhersagewert für den zugrunde liegenden Tumor (Kaiser 1999), wobei zu beachten ist, dass nicht bei allen PNS-Patienten antineuronale Antikörper nachweisbar sind und antineuronale Antikörper bei Tumorpatienten auch ohne neurologische Symptome auftreten können (Dalmau et al. 1990; Graus et al. 2004). Neurologisch unauffällige Tumorpatienten weisen dabei aber niedrig-titrige Autoantikörper auf als PNS-Patienten (Posner & Dalmau 2000). Einen prognostischen Vorteil besitzen allerdings Patienten mit antineuronalen Antikörpern gegenüber Patienten ohne Antikörper (Blaes et al. 2000b). Mit Hilfe der oben genannten und unter Punkt 2.1 erwähnten weiteren Diagnosekriterien konnten in der vorliegenden Arbeit vier unterschiedliche Gruppen - IRD, Para-ANA, Para und OND neben einer Kontrollgruppe - unterteilt werden. Nur in der Gruppe der Patienten mit einem definitiven PNS fanden sich typischerweise antineuronale Antikörper. Am häufigsten konnte dabei Anti-Hu nachgewiesen werden, am zweithäufigsten Anti-CV2/CRMP5. Wie es der aktuellen DGN-Leitlinie für paraneoplastische neurologische Syndrome zu entnehmen ist, liegt die größte Anzahl berichteter Patienten für den Anti-Hu Antikörper vor. Am zweithäufigsten kommt der Anti-Yo Antikörper vor. Die Häufigkeit des antineuronalen Antikörpers Anti-

CV2/CRMP5 steht an dritter Stelle (gemäß DGN-Leitlinie „Paraneoplastische neurologische Syndrome“ 2012). Diese Angaben decken sich nur teilweise mit den hier gezeigten Ergebnissen, was vermutlich durch die geringere Anzahl untersuchter Patienten zu erklären ist.

In der Literatur finden sich auch Berichte über antineuronale Antikörper unklarer Spezifität (Iwahashi et al. 1997; Vianello et al. 2004, Karim et al. 2005). Atypisch, bisher nicht charakterisierte antineuronale Antikörper zeigen beispielsweise neuronale Bindungen in der Immunfluoreszenz und im Western Blot, die nicht mit den bekannten Mustern vergleichbar sind. Auch in dieser Arbeit konnten Antikörper mit abweichendem Bindungsverhalten nachgewiesen werden. So fanden sich in den Gruppen OND und Para Antikörper gegen das Purkinjenzellzytoplasma und Antikörper mit atypisch antineuronalen Bindungscharakter. Diese werden im Folgenden nicht weiter betrachtet, da sie nur in sehr geringer Anzahl gefunden wurden und sich demnach keine aussagekräftige Konsequenz in der Subklassenverteilung ableiten ließ.

4.2 Antinukleäre Antikörper

Neben antineuronalen Antikörpern wurden auch ANA in dieser Studie untersucht. Der Oberbegriff ANA fasst Antikörper gegen mehr als 40 unterschiedliche Antigene zusammen. Sie richten sich gegen nicht organspezifische, ubiquitär vorkommende Bestandteile des Zellkerns und sind vor allem in der Diagnostik von Kollagenosen und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wichtig (Lehmann et al. 2001). ANA lassen sich bei nahezu allen Patienten mit SLE, bei ca. 68% der Patienten mit Sjögren-Syndrom und zu 40 - 70% bei Sklerodermie-Patienten im Serum nachweisen. Bei der RA weisen 25 - 50% der Betroffenen ANA auf. Jedoch finden sich auch bei 2 - 6% aller gesunden Probanden über 65 Jahre und gelegentlich auch bei jüngeren Gesunden ANA, allerdings mit deutlich niedrigerem Titer im Serum als bei Kollagenosepatienten (Azizah et al. 1996). Einige Autoantikörper sind krankheitsspezifisch (Tabelle 2). So sind z. B. Antikörper gegen dsDNA charakteristisch für SLE und Topoisomerase-1 Antikörper typisch für Sklerodermie (Tan 1988; Steiner & Smolen 2002). Goldstandard zum Nachweis von ANA ist die indirekte Immunfluoreszenz (Kumar et al. 2009). Antikörper können anhand bestimmter Bindungsmuster grob eingeteilt werden. So zeigen SLE-Patienten mit dsDNA-Antikörpern ein homogenes Immunfluoreszenzmuster des Zellkerns mit angefärbten Mitosen. Zur weiterführenden Differenzierung dienen Western Blot, Dot Blot oder ELISA (DeKeyser et al. 1990; Kumar et al. 2009).

Welche Rolle ANA in der Pathogenese der Erkrankungen spielen, ist bislang nicht geklärt. Es wird angenommen, dass die systemisch-inflammatorische Reaktion durch die Bildung zirkulierender Immunkomplexe im Organismus ausgelöst wird (Deng et al. 2000). Die intrazellulären Autoantigene, gegen die ANA gerichtet sind, konnten charakterisiert werden und sind an entscheidenden zellulären Schlüsselfunktionen wie Gentranskription und -translation beteiligt (Whittingham & McNeilage 1988). Ob ANA tatsächlich die intakten Zellmembranen lebender Zellen überwinden und mit intrazellulären Zellkernbestandteilen reagieren können, ist immer noch Gegenstand der Diskussion. Von einigen Autoren wird dieser Prozess sowohl über die Bindung an Fc-Rezeptoren als auch rezeptorunabhängig beschrieben, wobei nicht klar ist, ob es sich hier um einen methodischen Artefakt handelt (Alarcon-Segovia et al. 1978; Golan et al. 1997; Deng et al. 2000). Eine vollständige Erklärung des pathogenetischen Effektes der ANA fehlt weiterhin.

Einerseits dienen ANA zur Diagnose rheumatischer Autoimmunerkrankungen (Tan et al. 1982). Andererseits werden sie zum Therapiemonitoring genutzt (von Mühlen & Tan 1995). Neben den Kollagenosen und rheumatischen Krankheitsbildern wird in der Literatur der Nachweis von ANA auch bei Angehörigen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Folwaczny et al. 1997) und bei nicht autoimmunen Erkrankungen beschrieben (Morita et al. 1995; Berlin et al. 2007). Auch Tumorerkrankungen sind nicht selten ANA-assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass ca. 40% der Patienten mit Bronchialkarzinom (Yamamoto et al. 1996) und 32% der Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (Blaes et al. 2000b) ANA aufweisen. Moll et al. beschrieben erstmals einen möglichen Zusammenhang zwischen PNS und ANA und verwiesen auf Patienten mit antineuronalen Antikörpern und zusätzlich nachgewiesenen ANA (Moll et al. 1996). Bei den paraneoplastischen Neuropathien konnte dabei ein klinisch-pathologischer Unterschied mit ANA festgestellt werden. ANA-positive Patienten wiesen v. a. gynäkologische Tumore, aber kein Bronchialkarzinom auf. Hingegen litten Patienten mit antineuronalen Antikörpern am häufigsten an einem Bronchialkarzinom (Tschernatsch et al. 2005). ANA-positive Patienten mit NSCLC zeigen darüber hinaus eine bessere Prognose (Blaes et al. 2000).

Nach der Definition dieser kürzlich beschriebenen Untergruppe der PNS mit zusätzlichen hochtitrigen ANA (Tschernatsch et al. 2005) wurde auch in der vorliegenden Arbeit ein solches Patientenkollektiv festgelegt. In der vorliegenden Arbeit fanden sich ANA in allen untersuchten Patientengruppen, darunter hatte jeder Patient der IRD- und jeder der Para-ANA Gruppe nachweisbare ANA. Die ANA-Titer dieser zwei Gruppen waren deutlich höher, als die der übrigen Patientengruppen. Dies

untermauert die hohe Spezifität der ANA und damit die Relevanz in der Diagnostik rheumatischer Erkrankungen.

4.3 IgG-Subklassen

Es ist von Interesse die Rolle der spezifischen Antikörper-Subklassen in der Pathogenese neuroimmunologischer Erkrankungen zu identifizieren, weil einerseits die IgG-Subklasse die Fähigkeit der Komplementfixierung des Antikörpers bestimmt. Andererseits konnten Zusammenhänge zwischen den T-Helferzellen und deren Zytokinproduktion, der T-Zell- vs. B-Zell-vermittelter Immunantwort und der IgG-Subklasse beschrieben werden (Kawano et al. 1995; Greenlee et al. 2001). Die Expression spezifischer Subklassen ist dabei abhängig von der Beschaffenheit des stimulierenden Antigens und dem jeweiligen lokal vorherrschenden Zytokinmilieu (Day 1996). *In vivo* wurde gezeigt, dass TH1 CD4+ Zellen vorrangig IL-2 und IFN- γ sezernieren, was zur Bildung von IgG2a und IgG3 führt (Romagnani 1994). Das Äquivalent im menschlichen Organismus stellen die Subklassen IgG1 und IgG3 dar (Abbas et al. 1996). TH2 CD4+ Zellen stimulieren mittels IL4, IL5, IL10 und IL13 die IgG2-Antwort (Finkelman et al. 1990). Die IgG1- und IgG3-Immunantwort richtet sich gegen Proteinantigene. Bei chronischer Stimulation mit Proteinantigenen resultiert eine IgG4 Antwort. Kohlenhydratantigene induzieren IgG2 Antikörper (Day 1996). Proteinantigene wirken dabei stark immunogen. Polysaccharidantigene sind dagegen nur schwach immunogen (Barrett & Ayoub 1986).

Neben der pathogenetischen Bedeutung könnte es auch von diagnostischer Relevanz sein, die Subklassen von Autoantikörpern zu untersuchen und damit einen möglichen diagnostischen Vorteil zu erhalten.

Bereits Weblacher et al. diskutierte eine möglicherweise tumor-assoziierte Umverteilung der IgG-Subklassen bei Ratten nach Beimpfung mit Tumorzelllinien (Weblacher et al. 1993). Untersuchungen am Menschen von Schauenstein et al. zeigten, dass Patienten mit gynäkologischen und mit kolorektalen Karzinomen eine andere IgG-Subklassenverteilung aufweisen im Vergleich zu Probanden benigner Erkrankungen bzw. zu Gesundkontrollen. Dabei fand sich eine prozentuale Abnahme von IgG1 und ein prozentualer Anstieg von IgG2 bezogen auf das Gesamt-IgG in den Seren der Karzinompatienten gegenüber den Kontrollgruppen (Schauenstein et al. 1996, Schauenstein et al. 1997). Felsner et al. konnten dieses Phänomen bestätigen (Felsner et al. 2000). Diese prozentuale IgG1-Veränderung war sensitiver als herkömmliche Tumormarker gynäkologischer Tumore (z.B. CA 125, SCC, TPA, CEA) und könnte demnach als indirekter, nichtspezifischer früher Marker maligner

Proliferationen betrachtet werden. Der prozentuale IgG1-Abfall in Kombination mit konventionellen Tumormarkern könnte somit diagnostische Vorteile zur Erkennung von Tumorfrühstadien bringen (Schauenstein et al. 1996, Schauenstein et al. 1997).

Klotz et al arbeiteten heraus, dass die unterschiedlichen histologischen Typen des Bronchialkarzinoms die IgG-Subklassen-Verteilung beeinflussen. Dabei wiesen beispielsweise SCLC-Patienten einen Anstieg von IgG2, IgG3 und IgG4 verglichen mit den anderen Typen (Adeno-, Plattenepithelkarzinom, Lungenmetastasen und chronisch entzündliche Lungenerkrankungen) auf (Klotz et al. 1999). Darüber hinaus konnte bei Patienten mit malignen Tumoren und einem PNS andere IgG-Subklassen nachgewiesen werden, als bei Tumorpatienten ohne PNS. So zeigten Blaes et al., dass Anti-Hu-positive SCLC-Patienten mit PNS einen Anstieg von hauptsächlich IgG1 aufwiesen im Vergleich zu SCLC-Patienten ohne PNS die hohe IgG3- und IgG4-Titer hatten (Blaes et al. 2002).

4.4 Subklassenverteilung antineuronaler Antikörper

Eine Reihe von Autoren beschäftigt sich mit der IgG-Subklassenverteilung antineuronaler Antikörper. So beschrieben Jean et al., dass IgG1 und IgG3 die vorherrschenden Subklassen des Anti-Hu Antikörpers bei PNS-Patienten sind. Nur bei vereinzelt Patienten war IgG2 vertreten (Jean et al. 1994). Anti-Yo Antikörper, die zytoplasmatische Antigene von zerebellären Purkinjezellen erkennen, werden ausschließlich der Subklasse IgG1 zugeordnet (Amyes et al. 2001). Bei Patienten mit paraneoplastischer Kleinhirndegeneration bei einem Hodgkin-Lymphom und einem assoziierten Anti-Tr Antikörper wurden die Subklassen IgG1 und IgG3 identifiziert (Bernal et al. 2003). Beck et al. untersuchten die Subklassenverteilung bei OMS-Patienten und konnten die Subklasse IgG3 als prädominant charakterisieren gefolgt von IgG1 und IgG2. IgG4 wurde dabei nicht gefunden (Beck et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte der am häufigsten in der Para-Gruppe nachgewiesene Antikörper Anti-Hu vorrangig der Subklasse IgG1 zugeordnet, aber auch in den Subklassen IgG2 und IgG3 gefunden werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Aussagen der aktuellen Literaturangaben (Jean et al. 1994, Greenlee et al. 2001). Es deutet auf eine Immunantwort hin, die sich gegen Proteinantigene richtet. IgG1 und IgG3 sind in der Lage Komplement zu binden. In Ratten lösen Anti-Hu Antikörper eine Zerstörung von Körnerzellen aus, was in Anwesenheit von Komplementfaktoren schneller geschieht (Greenlee et al. 1993). So könnte dem IgG1

Anti-Hu Antikörper ein signifikanter Stellenwert in der Pathogenese zugesprochen werden, wenn ähnliche Effekte auch *in vivo* abliefen (Greenlee et al. 2001).

Die Anti-CV2/CRMP5 Reaktivität, die am zweithäufigsten in der Patientengruppe mit definitiven PNS in der vorliegenden Studie nachweisbar war, zeigte eine signifikante Häufung in der Subklasse IgG2. Über diese Subklasse im Zusammenhang mit PNS gibt es nur wenige Angaben in der Literatur. Bekannt ist, dass der Isotyp IgG2 nach Präsentation von Polysaccharidantigenen gebildet wird. Das lässt vermuten, dass die Antigene gegen die sich Anti-CV2/CRMP5 Antikörper richten von grundsätzlich anderer Beschaffenheit sind als die Antigene, die von Anti-Hu Antikörpern erkannt werden. Damit könnte möglicherweise ein anderer pathogenetischer Mechanismus zur Durchbrechung der Immuntoleranz und Entstehung eines PNS zugrunde liegen. Andererseits könnten IgG2-Antikörper evtl. auch nur eine Subpopulation von Antikörpern sein, die vorzugsweise durch Polysaccharide der Bakterienzellwand induziert wurden und nun mit intrazellulären Epitopen kreuzreagieren. Eine vergleichbare Vermutung äußerten Winkler et al. am Beispiel der Anti-DNA Antikörper (Winkler et al. 1988). Aus immunpathologischer Sicht sind IgG2-Antikörper eher harmlos und schützen möglicherweise vor Komplement-induzierter Zerstörung (Zouali et al. 1984).

4.5 Subklassenverteilung antinukleärer Antikörper

Im Formenkreis der Kollagenosen gibt es viele Studien über die Subklassenzugehörigkeit der verschiedenen ANA. Bei Patienten mit SLE konnte mehrfach gezeigt werden, dass Anti-dsDNA den Subklassen IgG1 und IgG3 angehört (Schur 1972; Puritz et al. 1973; Sontheimer & Gilliam 1978; Zouali et al. 1984; Eisenberg et al. 1985). Die Isotypen des Anti-Sm Antikörpers bei SLE-Patienten sind IgG1 (Eisenberg et al. 1985) bzw. IgG1 und IgG3 (Rubin et al. 1986) und die des Anti-Histon-Antikörpers sind IgG1 und IgG3 (Rubin et al. 1986). Bei den Anti-ssDNA- und Anti-RNP Antikörpern der Mischkollagenosen besteht Uneinigkeit hinsichtlich der Subklassenverteilung (Zouali et al. 1984; Eisenberg et al. 1985; Rubin et al. 1986). Die bei der Sklerodermie nachweisbaren Scl-Antikörper sind IgG1-Antikörper (French & Bernstein 1987).

Dass ANA auch bei Tumorpatienten eine Rolle spielen wurde bereits im vorangegangenen Kapitel 4.2 beschrieben. Von Tschernatsch et al. wurde kürzlich die Patientengruppe der Paraneoplasien mit ANA definiert (Tschernatsch et al. 2005). In dieser hier vorliegenden Studie wurden die in allen Gruppen vorhandenen ANA-

positiven Patienten auf IgG Subklassen hin untersucht. Ziel war es die IgG-Subklassenverteilung der ANA in der kürzlich beschriebenen Patientengruppe PNS mit ANA mit der in der Patientengruppe Kollagenosen zu vergleichen. Es konnte hier gezeigt werden, dass die ANA der IRD-Gruppe und der Para-ANA-Gruppe in den Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3 vertreten waren. Die Verteilung der ANA-Subklassen unterschied sich in diesen zwei Patientengruppen jedoch signifikant voneinander. Die Tumorpatienten der Para-ANA-Gruppe waren zu 100% IgG3-positiv und je zu 62.5% IgG2- bzw. IgG1-positiv. Hingegen waren die IRD-Patienten zu 55.5% IgG3-positiv, zu 38.8% IgG2-positiv und zu 66.6% IgG1-positiv. In Anlehnung an die Aussagen von Schauenstein et al. (Schauenstein et al. 1996, Schauenstein et al. 1997) ließe sich demnach eine Verschiebung der ANA-Subklassen bei PNS mit ANA im Vergleich zu nicht-paraneoplastischen, rheumatischen Erkrankungen wie folgt vermuten: Prozentuale Zunahme der ANA in der Subklasse IgG3 und ggf. prozentualer Anstieg von IgG2. Obwohl hier ein signifikanter Unterschied zwischen den ANA bei rheumatischen und bei paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen sichtbar wird, ist die Trennschärfe doch sehr gering. Dieser Befund erlaubt nach den Daten dieser Studie derzeit keine Entwicklung eines konkreten diagnostischen Konzepts zur Unterscheidung zwischen paraneoplastischen und nicht-paraneoplastischen neuroimmunologischen Erkrankungen. Ob bei Vorliegen einer rheumatischen Erkrankung oder eines ANA eine Tumordiagnose wahrscheinlich ist, lässt sich wohl besser durch die Bestimmung begleitender antineuronaler Antikörper oder die Bestimmung der Subklassenverteilung des Gesamt-IgG abschätzen, als durch die Subklassenanalyse der ANA.

4.6 Subklassenverteilung von oberflächenbindenden Antikörpern

Bei den oberflächenbindenden Antikörpern gibt es in der Literatur nur einzelne Fallbeschreibungen, letztlich ist die IgG-Subklassenverteilung unklar.

Futei et al. untersuchten Patienten mit Pemphigus vulgaris (PV) und paraneoplastischen Pemphigus (PP) und stellten fest, dass die in der zugrunde liegenden Autoimmunreaktion beteiligten Antikörper gegen Desmoglein 3 bei Patienten mit PV der IgG-Subklasse 4 angehören. Dagegen banden die PP-Antikörper an die extrazelluläre Domäne von Desmoglein 3 und waren prädominant in den Subklassen IgG1 und IgG2 (Futei et al. 2003).

Bei den neuronal oberflächenbindenden Antikörper-assoziierten Syndromen konnten u.a. für VGKC-Antikörper die Subklasse IgG4 und für NMDAR-Antikörper die Subklasse IgG1 als vorherrschend beschrieben werden (Vincent et al. 2011).

Unter den PNS konnten pathogenwirksame, oberflächenbindende Antikörper bei kindlichen paraneoplastischen OMS identifiziert werden (Blaes et al. 2005; Korfei et al. 2005). Beck et al. zeigten, dass diese Autoantikörper gegen Oberflächenantigene den Subklassen IgG3 und geringfügig IgG1 angehören (Beck et al. 2007). In der Literatur gibt es bisher keinen Vergleich mit nicht-paraneoplastischen OMS, der an dieser Stelle hier interessant wäre.

Ziel dieser Studie war es, die Subklassenverteilung oberflächenbindender Antikörper bei paraneoplastischen und nicht-paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen zu vergleichen. Wir konnten mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Oberflächenbindung der Para-ANA-Patienten vorrangig in der Subklasse IgG1 nachweisen. Demgegenüber wurde die Oberflächenbindung nicht-paraneoplastischer IRD-Patienten geprüft. Auch diese Patienten banden hauptsächlich in der Subklasse IgG1. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen, Para-ANA und IRD, in der Subklassenverteilung der Autoantikörper gegen Oberflächenepitope finden. Am oben genannten Beispiel des PV und seiner paraneoplastischen Form konnte gezeigt werden, dass extrazellulärbindende Autoantikörper bei paraneoplastischer und bei nicht-paraneoplastischer Genese eine unterschiedliche IgG-Subklassenverteilung aufweisen können. Dieses Resultat bringt keine diagnostischen Vorteile. Würde bei einem Patienten mit PV in der Subklassenverteilung der oberflächenbindenden Antikörper IgG1 und IgG2 vorherrschen, sollte theoretischerweise die paraneoplastische Form überdacht werden und die umgehende Suche nach einem bisher klinisch stummen Tumor eingeleitet werden. Diese Überlegung lässt sich anhand der hier erhobenen Resultate für PNS nicht realisieren. Die Hypothese die IgG-Subklassen der oberflächenbindenden Antikörper zur diagnostischen Differenzierung paraneoplastischer und nicht-paraneoplastischer neuroimmunologischer Erkrankungen zu nutzen und somit einen diagnostischen Vorteil bei PNS zu erlangen, kann durch die hier vorliegenden Ergebnisse nicht gestützt werden.

4.7 Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit wurde durchgeführt, um Aussagen über die IgG-Subklassenverteilung von Autoantikörpern paraneoplastischer und nicht-paraneoplastischer neuroimmunologischer Erkrankungen zu treffen. Mittels indirektem Immunfluoreszenztest, Immunoblot mit rekombinanten Antigenen, Western Blot und Durchflusszytometrie wurden die Antikörper der Patientenseren der vier unterschiedlichen Gruppen, IRD, OND, Para und Para-ANA neben Gesundkontrollen auf IgG-Isotypen untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- 1) Der unter den antineuronalen Autoantikörpern (ausschließlich bei Para-Patienten mit definitiven PNS) am häufigsten hier nachgewiesene Anti-Hu Antikörper ist in der Subklasse IgG1 vorherrschend, kann aber auch in den Subklassen IgG2 und IgG3 nachgewiesen werden. Der Anti-CV2/CRMP5 Antikörper beschränkt sich vor allem auf die IgG2-Subklasse und ist nur in geringem Maß in der Subklassen IgG1 vertreten.
- 2) Die ANA-Subklassenverteilung der IRD- und der Para-ANA-Patienten unterscheidet sich signifikant. Sie deutet auf eine Verschiebung der ANA-Subklassen bei PNS mit ANA im Vergleich zu nicht-paraneoplastischen, rheumatischen Erkrankungen mit einem prozentualen Anstieg der IgG3- (und ggf. der IgG2-) Subklasse.
- 3) In der Subklassenverteilung oberflächenbindender Autoantikörper gibt es keinen wesentlichen Unterschied zwischen paraneoplastischen und nicht-paraneoplastischen neuroimmunologischen Erkrankungen; beide Patientengruppen, IRD und Para-ANA, waren v. a. IgG1-positiv.

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass sich aktuell aus der IgG-Subklassenverteilung antineuronaler und oberflächenbindender Antikörper bei neuroimmunologischen Erkrankungen besonders im Hinblick auf die Diagnostik keine Tendenz bzw. Konsequenz ableiten lässt.

Die Verteilung der ANA-Subklassen zwischen paraneoplastischen und nicht-paraneoplastischen neuroimmunologischen Erkrankungen hingegen spricht für einen eventuellen diagnostischen Vorteil. Perspektivisch könnte eine IgG-Subklassenverschiebung bei einem rheumatologischen Patienten vor allem in Richtung prozentualem Anstieg von IgG3 auf ein paraneoplastisches Geschehen hindeuten und die sofortige Suche des bislang unentdeckten Tumors nach sich ziehen. Um dieser Hypothese weiter nachgehen zu können und sie bestenfalls zu bekräftigen müssten zukünftig Untersuchungen mit umfangreicheren Patientenzahlen folgen.

5. Literatur

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383: 787-793
- ACR Criteria for Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus (NPSLE): ACR Ad Hoc Committee on Neuropsychiatric Lupus Nomenclature. The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 599-608
- ACR Guidelines for Referral and Management of SLE in Adults: American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Guidelines. Guidelines for referral and management of systemic lupus erythematosus in adults. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1785-1796
- Adamus G, Machnicki M, Seigel GM. Apoptotic retinal cell death induced by antirecoverin autoantibodies of cancer-associated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 283-291
- Adamus G, Machnicki M, Elerding H, Sugden B, Blocker YS, Fox DA. Antibodies to recoverin induce apoptosis of photoreceptor and bipolar cells in vivo. *J Autoimmun* 1998; 11: 523-533
- Alarcon-Segovia D, Ruiz-Arguelles A, Fishbein E. Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. *Nature* 1978; 271: 67-69
- Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* 1998; 4: 1321-1324
- Alexander J, Foltz A, Parylovich K. Paraneoplastic syndromes: a challenge for neuroscience nursing. *J Neurosci Nurs* 1993; 25: 228-232
- Amyes E, Curnow J, Stark Z, Corlett L, Sutton I, Vincent A. Restricted IgG1 subclass of anti-Yo antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroimmunol* 2001; 114: 259-264
- Anderson NE, Budde-Steffen C, Rosenblum MK, et al. Opsoclonus, myoclonus, ataxia, and encephalopathy in adults with cancer: A distinct paraneoplastic syndrome. *Medicine* 1988; 67: 100-109

- Antoine JC, Camdessanché JP. Paraneoplastic neurological syndromes. *Presse Med* 2007; 36: 1418-1426
- Antoine JC, Mosnier JF, Absi L, Convers P, Honnorat J, Michel D. Carcinoma-associated paraneoplastic peripheral neuropathies in patients with and without anti-onconeural antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 7-14
- Antoine JC, Cinotti L, Tilikete C, et al. [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the diagnosis of cancer in patients with paraneoplastic neurological syndrome and anti-Hu antibodies. *Ann Neurol* 2000; 48: 105-108
- Antoine JC, Honnorat J, Camdessanché JP, et al. Paraneoplastic anti-CV2 antibodies react with peripheral nerve and are associated with a mixed axonal and demyelinating peripheral neuropathy. *Ann Neurol* 2001; 49: 214- 221
- Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of Autoantibodies before the clinical onset of Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349: 1526-1533
- Auf G, Chen L, Fornès P, Le Clanche C, Delattre JY, Carpentier AF. CpG-oligodeoxynucleotide rejection of a neuroblastoma in A/J mice does not induce a paraneoplastic disease. *Neurosci Lett* 2002; 327: 189-192
- Azizah MR, Azila MN, Zulkifli MN, Norita TY. The prevalence of antinuclear, anti dsDNA, anti-Sm and anti-RNP antibodies in a group of healthy blood donors. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1996; 14: 125-128
- Bain SC, Rowe BR, Barnett AH, Todd JA. Parental origin of diabetes-associated HLA types in sibling pairs with type I diabetes. *Diabetes* 1994; 43: 1462-1468
- Banchereau J, Pascual V, Palucka AK. Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation. *Immunity* 2004; 20: 539-550
- Barrett DJ, Ayoub EM. IgG2 subclass restriction of antibody to pneumococcal polysaccharides. *Clin Exp Immunol* 1986; 63: 127-134
- Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 81-92

- Beck S, Fühlhuber V, Krasenbrink I, et al. IgG subclass distribution of autoantibodies in pediatric opsoclonus-myoclonus syndrome. *J Neuroimmunol* 2007; 185: 145-149
- Benyahia B, Liblau R, Merle-Béral H, Tourani JM, Dalmau J, Delattre JY. Cell-mediated autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu antibodies. *Ann Neurol* 1999; 45: 162-167
- Berlin T, Zandman-Goddard G, Blank M, et al. Autoantibodies in nonautoimmune individuals during infections. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1108: 584-593
- Bernal F, Shams'ili S, Rojas I, et al. Anti-Tr antibodies as markers of paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Neurology* 2003; 60: 230-234
- Bezrodnyhk AA, Karelin AP. Systemic lupus erythematosus and systemic scleroderma in patients from the aboriginal people and the newcomers of Yakutia under the extreme conditions of the far north. *Alaska Med* 1994; 36: 102-106
- Bini P, Chu JL, Okolo C, Elkon K. Analysis of autoantibodies to recombinant La (SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren`s syndrome. *J Clin Invest* 1990; 85: 325-333
- Blaes F. Immunotherapeutic approaches to paraneoplastic neurological disorders. *Expert Opin Biol Ther* 2002; 2: 419-430
- Blaes F. Paraneoplastic neurological syndromes-diagnosis and management. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 4518-4525
- Blaes F. Paraneoplastic brain stem encephalitis. *Curr Treat Options Neurol* 2013; 15: 201-209
- Blaes F, Beeson D, Plested P, Lang B, Vincent A. IgG from "seronegative" myasthenia gravis patients binds to a muscle cell line, TE671, but not to human acetylcholine receptor. *Ann Neurol* 2000a; 47: 504-510
- Blaes F, Klotz M, Huwer H, et al. Antineural and antinuclear autoantibodies are of prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2000b; 69: 254-258
- Blaes F, Klotz M, Funke D, Strittmatter M, Kraus J, Kaps M. Disturbance in the serum IgG subclass distribution in patients with anti-Hu positive paraneoplastic neurological syndromes. *Eur J Neurol* 2002; 9: 369-372

- Blaes F, Fühlhuber V, Korfei M, et al. Surface-binding autoantibodies to cerebellar neurons in opsoclonus syndrome. *Ann Neurol* 2005; 58: 313-317
- Blank M, Krup M, Mendlovic S, et al. The importance of the pathogenic 16/6 idiotype in the induction of SLE in naive mice. *Scand J Immunol* 1990; 31: 45-52
- Boudin G. Paraneoplastic syndromes. *Concours Med* 1961; 83: 6435-6442
- Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975; 292: 344-347
- Bohan A, Peter JB, Bowman RL, Pearson CM. A computer-assisted analysis of 153 patients with polymyositis and dermatomyositis. *Medicine (Baltimore)* 1977; 56: 255-286
- Brickman CM, Schoenfeld Y. The mosaic of autoimmunity. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61: 3-15
- Brüggemann M, Williams GT, Bindon CI, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 1987; 166: 1351-1361
- Calvanico NJ. The humoral immune response in autoimmunity. *Dermatol Clin* 1993; 11: 379-389
- Camdessanché J, Lassablière F, Meyronnet D, et al. Expression of the onconeural CV2/CRMP5 antigen in thymus and thymoma. *J Neuroimmunol* 2006; 174: 168-173
- Casals SP, Friou GJ, Myers LL. Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum* 1964; 7: 379-390
- Chia SY, Chua R, Lo YL, Wong MC, Chan LL, Tan EK. Acute ataxia, Graves' disease, and stiff person syndrome. *Mov Disord* 2007; 22: 1969-1971
- Chou CH, Wang J, Knuth MW, Reeves WH. Role of a major autoepitope in forming the DNA binding site of the p70 (Ku) antigen. *J Exp Med* 1992; 175: 1677-1684
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K. *Innere Medizin- 6. Auflage*. Urban & Fischer Verlag, München 2009; 752- 770, 780-784
- Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 470-511

- 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: 544-552
- 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: 1757-1764
- Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu--associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992; 71: 59-72
- 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: 318-328
- Dalmau J, Gultekin SH, Voltz R, et al. Ma1, a novel neuron- and testis-specific protein, is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain* 1999; 122: 27-39
- Darnell RB. Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 4529-4536
- Darnell RB, DeAngelis LM. Regression of small-cell lung carcinoma in patients with paraneoplastic neuronal antibodies. *Lancet* 1993; 341: 21-22
- Day MJ. IgG subclasses of canine anti-erythrocyte, antinuclear and anti-thyroglobulin autoantibodies. *Research in Veterinary Science* 1996; 61: 129-135
- DeBaets M, Stassen MH. The role of antibodies in myasthenia gravis. *J Neurol Sci* 2002; 202: 5-11
- DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 2001; 7: 1189-1193
- DeKeyser F, Verbruggen G, Veys EM, et al. "Microgel diffusion blotting" for sensitive detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Chem* 1990; 36: 337-339

- Deng SX, Hanson E, Sanz I. In vivo cell penetration and intracellular transport of anti-Sm and anti-La autoantibodies. *Int Immunol*. 2000; 12: 415-423
- Dinkel K, Meinck HM, Jury KM, Karges W, Richter W. Inhibition of gamma-aminobutyric acid synthesis by glutamic acid decarboxylase autoantibodies in stiff-man syndrome. *Ann Neurol* 1998; 44: 194-201
- Domański J. Paraneoplastic endocrine syndromes. *Wiad Lek* 1989; 42: 956-959
- Dropcho EJ. Autoimmune central nervous system paraneoplastic disorders: mechanisms, diagnosis, and therapeutic options. *Ann Neurol* 1995; 37: 102-113
- Dropcho EJ. Neurologic paraneoplastic syndromes. *J Neurol Sci* 1998; 153: 264-278
- Dropcho EJ. Update on paraneoplastic syndromes. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 331-336
- East L, Isacke CM. The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 364-386
- Edelman GM. Antibody Structure and Molecular Immunology. *Science* 1973; 180: 830-840
- Eisenberg RA, Dyer K, Craven SY, Fuller CR, Yount WJ. Subclass restriction and polyclonality of the systemic lupus erythematosus marker antibody anti-Sm. *J Clin Invest*. 1985; 75: 1270-1277
- Elrington GM, Murray NM, Spiro SG, Newsom-Davis J. Neurological paraneoplastic syndromes in patients with small cell lung cancer. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54: 764-767
- Felsner P, Steinschifter W, Fischer M, Eferl R, Kenner L, Zatloukal K, Lahousen M, Liebmann PM, Schauenstein E, Schauenstein K. The tumor-associated shift in immunoglobulin G1/G2 is expressed at the messenger RNA level of peripheral blood B lymphocytes in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* 2000; 88: 461-467
- Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 303-333
- Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke M. Antinuclear autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. High prevalence in first-degree relatives. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1593-1597

- Fox RI, Robinson CA, Curd JG, Kozin F, Howell FV. Sjögren's syndrome: proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 577-785
- Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep* 1996; 23: 133-145
- French MA, Bernstein RM. Immunoglobulin G subclass distribution of autoantibodies in systemic sclerosis, primary biliary cirrhosis, and overlap syndromes. *Ann Rheum Dis* 1987; 46: 436-440
- Futei Y, Amagai M, Hashimoto T, Nishikawa T. Conformational epitope mapping and IgG subclass distribution of desmoglein 3 in paraneoplastic pemphigus. *J Am Acad Dermatol* 2003; 49: 1023-1028
- Giometto B, Grisold W, Vitaliani R, et al. Paraneoplastic neurologic syndrome in the PNS Euronetwork database: a European study from 20 centers. *Arch Neurol* 2010; 67: 330-335
- Golan TD, Sigal D, Sabo E, Shemuel Z, Guedj D, Weinberger A. The penetrating potential of autoantibodies into live cells in vitro coincides with the in vivo staining of epidermal nuclei. *Lupus* 1997; 6: 18-26
- Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB. Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology* 1985; 35: 538-543
- Graus F, Illa I, Agusti M, Ribalta T, Cruz-Sanchez F, Juarez C. Effect of intraventricular injection of an anti-Purkinje cell antibody (anti-Yo) in a guinea pig model. *J Neurol Sci* 1991; 106: 82-87
- Graus F, Dalmau J, Reñé R, et al. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 1997a; 15: 2866-2872
- Graus F, Dalmau J, Valldeoriola F, et al. Immunological characterization of a neuronal antibody (anti-Tr) associated with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *J Neuroimmunol*. 1997b; 74: 55-61
- Graus F, Keime-Guibert F, Reñé R, et al. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 2001; 124: 1138-1148
- Graus F, Delattre JY, Antoine JC, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1135-1140

- Greenlee JE, Parks TN, Jaeckle KA. Type IIa ('anti-Hu') antineuronal antibodies produce destruction of rat cerebellar granule neurons in vitro. *Neurology* 1993; 43: 2049-2054
- Greenlee JE, Boyden JW, Pingree M, Brashear HR, Clawson SA, Keeney PM. Antibody types and IgG subclasses in paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Sci* 2001; 184: 131-137
- Hart IK, Maddison P, Newsom-Davis J, Vincent A, Mills KR. Phenotypic variants of autoimmune peripheral nerve hyperexcitability. *Brain* 2002; 125: 1887-1895
- Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med* 2001; 7: 365-368
- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725
- Homma M, Tojo T, Akizuki M, Yamagata H. Criteria for Sjögren's syndrome in Japan. *Scand J Rheumatol Suppl* 1986; 61: 26-27
- Honorat J, Antoine JC, Derrington E, Aguera M, Belin MF. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61: 270-278
- Hormigo A, Lieberman F. Nuclear localization of anti-Hu antibody is not associated with in vitro cytotoxicity. *J Neuroimmunol* 1994; 55: 205-212
- Irani SR, Bera K, Waters P, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010; 133: 1655-1667
- Iwahashi T, Inoue A, Koh CS, Yanagisawa N. A study on a new antineural antibody in a case of paraneoplastic sensory neuropathy associated with breast carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 63: 516-519

- Jaekle 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
- Janeway CA Jr, Bottomly K. Responses of T cells to ligands for the T-cell receptor. *Semin Immunol* 1996; 8: 108-115
- Jarius S, Wandinger KP, Horn S, Heuer H, Wildemann B. A new Purkinje cell antibody (anti-Ca) associated with subacute cerebellar ataxia: immunological characterization. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 21
- 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: 140-147
- Jerne NK. Idiotypic networks and other preconceived ideas. *Immunol Rev* 1984; 79: 5-24
- Jura J, Wegrzyn P, Jura J, Koj A. Regulatory mechanisms of gene expression: complexity with elements of deterministic chaos. *Acta Biochim Pol* 2006; 53: 1-10
- Karim AR, Hughes RG, Winer JB, Williams AC, Bradwell AR. Paraneoplastic neurological antibodies: a laboratory experience. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1050: 274-285
- Kaiser R. Paraneoplastic neurologic syndromes. Diagnostic and pathogenetic significance of autoantibodies. *Nervenarzt* 1999; 70: 688-701
- Kawano Y, Noma T, Kou K, Yoshizawa I, Yata J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines: human IgG subclass production enhanced differentially by interleukin-6. *Immunology* 1995; 84: 278-284
- Klotz M, Blaes F, Funke D, Kalweit G, Schimrigk K, Huwer H. Shift in the IgG subclass distribution in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 1999; 24: 25-30
- Korfei M, Fühlhuber V, Schmidt-Wöll T, Kaps M, Preissner KT, Blaes F. Functional characterisation of autoantibodies from patients with pediatric opsoclonus-myoclonus-syndrome. *J Neuroimmunol* 2005; 170: 150-157
- Koscec M, Koren E, Wolfson-Reichlin M, et al. Autoantibodies to ribosomal P proteins penetrate into live hepatocytes and cause cellular dysfunction in culture. *J Immunol* 1997; 159: 2033-2041

- Kraemer M, Berlit P. Progressive encephalomyelitis with rigidity and myoclonus in an 81-year-old patient. *Clin Neurol Neurosurg* 2008; 110: 279-281
- Kumar Y, Bhatia A, Minz RW. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagn Pathol* 2009; 4: 1
- Lang B, Vincent A. Autoantibodies to ion channels at the neuromuscular junction. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 94-100
- Lang B, Newsom-Davis J, Wray D, Vincent A, Murray N. Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet* 1981; 2: 224-226
- Lang B, Dale RC, Vincent A. New autoantibody mediated disorders of the central nervous system. *Curr Opin Neurol* 2003, 16: 351-357
- Lee SS, Li CS, Li PC. Clinical profile of Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1993; 2: 105-109
- Lehmann HP, Block D, Markert-Hahn C, Zolg JW. New concepts in systemic autoimmunity testing. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2001; 235: 84-90
- LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets, and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988; 15: 202-205
- Livneh A, Or G, Many A, Gazit E, Diamond B. Anti-DNA antibodies secreted by peripheral B cells of lupus patients have both normal and lupus-specific features. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 68-73
- Lockman J, Burns TM. Stiff-person syndrome. *Curr Treat Options Neurol* 2007; 9: 234-240
- Lucchinetti CF, Kimmel DW, Lennon VA. Paraneoplastic and oncologic profiles of patients seropositive for type 1 antineuronal nuclear autoantibodies. *Neurology* 1998; 50: 652-657
- Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, et al. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol* 1991; 29: 241-251
- Manser T. Evolution of antibody structure during the immune response. The differentiative potential of a single B lymphocyte. *J Exp Med* 1989; 170: 1211-1230

- Maul GG, French BT, van Venrooij WJ, Jimenez SA. Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:5145-5149
- Messier H, Fuller T, Mangal S, et al. P70 lupus autoantigen binds the enhancer of the T-cell receptor beta-chain gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2685-2689
- Meyer T, Stockfleth E, Christophers E. Immune response profiles in human skin. *Br J Dermatol* 2007; 157: 1-7
- Moll JW, Henzen-Logmans SC, Splinter TA, van der Burg ME, Vecht CJ. Diagnostic value of anti-neuronal antibodies for paraneoplastic disorders of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990; 53: 940-943
- Moll JW, Antoine JC, Brashear HR, et al. Guidelines on the detection of paraneoplastic anti-neuronal-specific antibodies: report from the Workshop to the Fourth Meeting of the International Society of Neuro-Immunology on paraneoplastic neurological disease, held October 22-23, 1994, in Rotterdam, The Netherlands. *Neurology* 1995; 45: 1937-1941
- Moll JW, Hooijkaas H, van Goorbergh BCM, Roos LGE, Henzen-Logmans SC, Vecht CJ. Systemic and anti-neuronal autoantibodies in patients with paraneoplastic neurological disease. *J Neurol* 1996; 243: 51-56
- Moran AP, Prendergast MM. Molecular mimicry in *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides: contribution of gastrointestinal infections to autoimmunity. *J Autoimmun* 2001; 16: 241-256
- Morell A, Skvaril F, Hijmans W, Scherz R. Cytoplasmic immunofluorescence of bone marrow plasma cells producing immunoglobulins of the four IgG subclasses. *J Immunol* 1975; 115: 579-583
- Morita S, Arima T, Matsuda M. Prevalence of nonthyroid-specific autoantibodies in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1203-1206
- Müller M, Gleixner C, Wirth S. *Neurologie und Psychiatrie für Studium und Praxis* 2007/2008- 6. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach 2007; 116 -120, 230-236
- Murphy K. *Janeway's Immunobiology* 8th Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York 2012; 157-200

- Nossal GJ. A purgative mastery. *Nature* 2001; 412: 685-686
- Otsuki T, Maeda M, Murakami S, et al. Immunological effects of silica and asbestos. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 261-268
- Padgett RA, Mount SM, Steitz JA, Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors is inhibited by antisera to small ribonucleoprotein. *Cell* 1983; 35: 101-107
- Pellkofer H, Schubart AS, Höftberger R, et al. Modelling paraneoplastic CNS disease: T-cells specific for the onconeural antigen PNMA1 mediate autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Brain* 2004; 127: 1822-1830
- Pinto A, Gillard S, Moss F, et al. Human autoantibodies specific for the alpha1A calcium channel subunit reduce both P-type and Q-type calcium currents in cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8328-8333
- Pittock SJ, Kryzer TJ, Lennon VA. Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann Neurol* 2004; 56: 715-719
- Polans AS, Buczyłko J, Crabb J, Palczewski K. A photoreceptor calcium binding protein is recognized by autoantibodies obtained from patients with cancer-associated retinopathy. *J Cell Biol* 1991; 112: 981-989
- Posner JB. Paraneoplastic opsoclonus/myoclonus: B cells, T cells, both, or neither? *Neurology* 2004; 62: 1466-1467
- Posner JB, Dalmau JO. Paraneoplastic syndromes of the nervous system. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 117-122
- Prendergast MM, Moran AP. Lipopolysaccharides in the development of the Guillain-Barré syndrome and Miller Fisher syndrome forms of acute inflammatory peripheral neuropathies. *J Endotoxin Res* 2000; 6: 341-359
- Puritz EM, Yount WJ, Newell M, Utsinger PD. Immunoglobulin classes and IgG subclasses of human antinuclear antibodies. A correlation of complement fixation and the nephritis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1973; 2: 98-113
- Putterman C. New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 7-11
- Roep BO. Autoreactive T-cells in endocrine/ organ-specific autoimmunity: why has progress been so slow? *Springer Semin Immunopathol* 2002; 24: 261-271

- Rombach E, Stetler DA, Brown JC. Rabbits produce SLE-like anti-RNA polymerase I and anti-DNA autoantibodies in responses to immunization with either human or murine SLE anti-DNA antibodies. *Autoimmunity* 1992; 13: 291-302
- Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 227-257
- Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* 2007; 179: 1549-1558
- Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 1993; 14: 426-430
- Rosenblum MK. Paraneoplasia and autoimmunologic injury of the nervous system: the anti-Hu syndrome. *Brain Pathol* 1993; 3: 199-212
- Rubin RL, Tang FL, Chan EK, Pollard KM, Tsay G, Tan EM. IgG subclasses of autoantibodies in systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, and drug-induced autoimmunity. *J Immunol* 1986; 137: 2528-2534
- Rudnicki SA, Dalmau J. Paraneoplastic syndromes of the peripheral nerves. *Curr Opin Neurol* 2005; 18: 598-603
- Saloustros E, Zaganas I, Mavridis M, et al. Anti-CV2 associated cerebellar degeneration after complete response to chemoradiation of head and neck carcinoma. *J Neurooncol* 2010; 97: 291-294
- Sano H, Terasaki J, Tsutsumi C, Imagawa A, Hanafusa T. A case of fulminant type 1 diabetes mellitus after influenza B infection. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79: e8-9
- Schauenstein E, Lahousen M, Weblacher M, Steinschifter W, Estelberger W, Schauenstein K. Selective decrease in serum immunoglobulin G1. A tissue nonspecific tumor marker detecting early stages of gynecologic malignant disease with high efficiency. *Cancer* 1996; 78: 511-516
- Schauenstein E, Rabl H, Steinschifter W, Hirschmann C, Estelberger W, Schauenstein K. Selective decrease of serum immunoglobulin G1 as a marker of malignant transformation in colorectal tissue. *Cancer* 1997; 79: 1482-1486

- 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 Autoimmun* 2000; 15: 479-484
- Schatz DA, Barrett DJ, Maclaren NK, Riley WJ. Polyclonal Nature of Islet Cell Antibodies in Insulin-Dependent Diabetes. *Autoimmunity* 1988, 1: 45-50
- Schauer U, Stemberg F, Rieger CH, et al. Levels of antibodies specific to tetanus toxoid, Haemophilus influenzae type b, and pneumococcal capsular polysaccharide in healthy children and adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 202-207
- Schur PH, Monroe M, Rothfield N. The gammaG subclass of antinuclear and antinucleic acid antibodies. *Arthritis Rheum* 1972; 15: 174-182
- Sculier JP, Feld R, Evans WK, et al. Neurologic disorders in patients with small cell lung cancer. *Cancer* 1987; 60: 2275-2283
- Shero JH, Bordwell B, Rothfield NF, Earnshaw WC. High titers of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 1986; 231: 737-740
- Sillevis Smitt PA, Manley GT, Posner JB. Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. *Neurology* 1995; 45: 1873-1878
- Singh AK. Abnormalities in the regulation of variable region genes that encode for antibodies to DNA may be a central factor in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 378-383
- Sivadon V, Orlikowski D, Rozenberg F, et al. Prevalence and characteristics of Guillain-Barré syndromes associated with Campylobacter jejuni and cytomegalovirus in greater Paris. *Pathol Biol (Paris)* 2005; 53: 536-538
- Skorstad G, Hestvik AL, Torjesen P, Alvik K, Vartdal F, Vandvik B, Holmøy T. GAD65 IgG autoantibodies in stiff person syndrome: clonality, avidity and persistence. *Eur J Neurol* 2008; 15: 973-980
- Soh H, Hosokawa H, Miyauchi H, Izumi H, Asada Y. The distribution of IgG subclass autoantibodies in bullous pemphigoid analysed by immunofluorescence and immunoblotting. *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 400-404

- Solimena M, Folli F, Aparisi R, Pozza G, De Camilli P. Autoantibodies to GABA-ergic neurons and pancreatic beta cells in stiff-man syndrome. *N Engl J Med* 1990; 322: 1555-1560
- Sontheimer RD, Gilliam JN. DNA antibody class, subclass, and complement fixation in systemic lupus erythematosus with and without nephritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1978; 10: 459-467
- Soto ME, Vallejo M, Guillén F, Simón JA, Arena E, Reyes PA. Gender impact in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22: 713- 721
- Steiner G, Smolen J. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res* 2002, 4: 1-5
- Stich O, Rauer S. Paraneoplastische neurologische Syndrome. *Der Nervenarzt* 2013; 84: 455-460
- Storstein A, Vedeler CA. Paraneoplastic neurological syndromes and onconeural antibodies: clinical and immunological aspects. *Adv Clin Chem* 2007; 44: 143-185
- Strauss AJ. Myasthenia gravis. *Br Med J* 1963; 1: 56-57
- Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590
- Takamori M, Komai K, Iwasa K. Antibodies to calcium channel and synaptotagmin in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Am J Med Sci* 2000; 319: 204-208
- Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers and clues to the basis of systemic autoimmunity. *Pediatr Infect Dis J.* 1988; 7: 3-9
- Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; 44: 93-151
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-1277
- Tanaka K, Tanaka M, Onodera O, Igarashi S, Miyatake T, Tsuji S. Passive transfer and active immunization with the recombinant leucine-zipper (Yo) protein as an attempt to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neurol Sci* 1994; 127: 153-158

- 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
- Tanaka M, Tanaka K, Shinozawa K, Idezuka J, Tsuji S. Cytotoxic T cells react with recombinant Yo protein from a patient with paraneoplastic cerebellar degeneration and anti Yo antibody. *J Neurol Sci* 1998; 161: 88-90
- Thomas L. Labor und Diagnose - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, 5. Auflage. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main 1998; 684-697
- Toyka KV, Schneider-Gold C. Oculomotor signs in Lambert-Eaton myasthenic syndrome-coincidence with myasthenia gravis. *Ann Neurol* 2003; 54: 135-136
- Toyka KV, Drachman DB, Pestronk A, Kao I. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science* 1975; 190: 397-399
- Tschernatsch M, Stolz E, Strittmatter M, Kaps M, Blaes F. Antinuclear antibodies define a subgroup of paraneoplastic neuropathies: clinical and immunological data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76: 1702-1706
- Tschernatsch M, Singh P, Gross O, et al. Anti-SOX1 antibodies in patients with paraneoplastic and non-paraneoplastic neuropathy. *J Neuroimmunol* 2010; 226: 177-180
- UytdeHaag F, van der Heijden R, Osterhaus A. Maintenance of immunological memory: a role for CD5+ B cells? *Immunol Today* 1991; 12: 439-442
- van Oosterhout AG, van de Pol M, ten Velde GP, Twijnstra A. Neurologic disorders in 203 consecutive patients with small cell lung cancer. Results of a longitudinal study. *Cancer* 1996; 77: 1434-1441
- Van Venrooij WJ, Sillekens PT. Small nuclear RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol* 1989; 7: 635-645
- Verschuuren J, Chuang L, Rosenblum MK, et al. Inflammatory infiltrates and complete absence of Purkinje cells in anti-Yo-associated paraneoplastic cerebellar degeneration. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 519-525

- Verschuuren JJ, Dalmau J, Hoard R, Posner JB. Paraneoplastic anti-Hu serum: studies on human tumor cell lines. *J Neuroimmunol* 1997; 79: 202-210
- Vianello M, Vitaliani R, Pezzani R, et al. The spectrum of antineuronal autoantibodies in a series of neurological patients. *J Neurol Sci* 2004; 220: 29-36
- Vincent A, Jacobson L, Plested P, et al. Antibodies affecting ion channel function in acquired neuromyotonia, in seropositive and seronegative myasthenia gravis, and in antibody-mediated arthrogryposis multiplex congenita. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 841: 482-496
- Vincent A, Bien CG, Irani SR, Waters P. Autoantibodies associated with diseases of the CNS: new developments and future challenges. *Lancet Neurol* 2011; 10: 759-772
- Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 340-347
- Vitali C, Moutsopoulos HM, Bombardieri S. The European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 637-647
- Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, et al. European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 554-558
- Voltz R. Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis, and therapy. *Lancet Neurol* 2002; 1: 294-305
- Voltz R, Dalmau J, Posner JB, Rosenfeld MR. T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology* 1998; 51: 1146-1150
- von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358

- Weblacher M, Leitsberger A, Tillian H, Maninger K, Estelberger W, Schauenstein K, Schauenstein E. A decrease in reactive disulfide bonds of serum IgG signals a characteristic change in the IgG subclass patterns of rats bearing experimental tumors. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 102: 340-346
- Whittingham S, McNeilage LJ. Antinuclear antibodies as molecular and diagnostic probes. *Mol Cell Probes* 1988; 2: 169-179
- Winkler TH, Henschel TA, Kalies I, Baenkler HW, Skvaril F, Kalden JR. Constant isotype pattern of anti-dsDNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1988; 72: 434-439
- Winter G, Milstein C. Man-made antibodies. *Nature* 1991; 349: 293-299
- Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Criteria for identifying a human disease as autoimmune in origin: Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc* 1957; 164: 1439-1447
- Yamamoto A, Shimizu E, Ogura T, Sone S. Detection of autoantibodies against L-myc oncogene products in sera from lung cancer patients. *Int J Cancer* 1996; 69: 283-289
- Yanase K, Smith RM, Puccetti A, Jarett L, Madaio MP. Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin 1. *J Clin Invest* 1997; 100: 25-31
- Yang YY, Yin GL, Darnell RB. The neuronal RNA-binding protein Nova-2 is implicated as the autoantigen targeted in POMA patients with dementia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13254-13259
- Yang VW, Lerner MR, Steitz JA, Flint SJ. A small nuclear ribonucleoprotein is required for splicing of adenoviral early RNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 1371-1375
- Zouali M, Jefferis R, Eyquem A. IgG subclass distribution of autoantibodies to DNA and to nuclear ribonucleoproteins in autoimmune diseases. *Immunology* 1984; 51: 595-600

6. Anhang

Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Halle/S., 14.12.2012

Susanne Stephan

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

- Herrn Prof. Dr. M. Kaps danke ich für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit an der Klinik für Neurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen anzufertigen.
- Herrn Prof. Dr. F. Blaes möchte ich einen besonderen Dank aussprechen zum einen für die Überlassung des Themas, zum anderen für die langjährige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für hilfreiche Anmerkungen, Ratschläge und konstruktive Kritik, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.
- Weiterhin danke ich allen aus der neuroimmunologischen Arbeitsgruppe Blaes und aus dem Neurochemischen Labor der Justus-Liebig-Universität Gießen, die mir in der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Im Besonderen danke ich Oliver Gross, Nina Kneifel und Stefanie Beck für die geduldige Einarbeitung in die methodischen Verfahren, die Beantwortung all meiner Fragen und für den Beistand und die Aufmunterungen in kritischen Situationen meiner Laborarbeit.
- Mein herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich all die Jahre unterstützt und begleitet hat.
- Zu guter Letzt möchte ich an dieser Stelle meinem Lebenspartner, Andreas Berger danken, der mich vor allem in der letzten Phase des Schreibens und der Fertigstellung dieser Promotionsarbeit mit zahlreichen Korrekturen und wertvollen Kritiken unterstützte, mich stets motivierte, immer ein offenes Ohr hatte und geduldig meine Launen ertrug.