

Autoantikörper bei Hodgkin-Lymphom-Patienten
mit und ohne begleitende Paraneoplastische
Neurologische Syndrome

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

vorgelegt von
Julia Huwe, geb. Scharfenberger
aus Worms

Gießen 2009

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

Gutachter: PD Dr. Blaes
Gutachter: PD Dr. Rummel

Tag der Disputation: 28.07.2009

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	iii
1. Einleitung.....	1
1.1 Morbus Hodgkin	1
1.2 Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS).....	5
1.3 Paraneoplastische neurologische Syndrome bei M. Hodgkin.....	12
1.4 Fragestellung.....	15
2. Patienten und Methoden.....	16
2.1 Patienten	16
2.1.1 Patienten mit M. Hodgkin (Hodgkin-Gruppe).....	16
2.1.2 Hodgkinpatienten mit PNS (Hodgkin/Para-Gruppe)	16
2.1.3 Gesunde Kontrollen (Kontroll-Gruppe)	17
2.2 Methoden	17
2.2.1 Zellkultur.....	17
2.2.2 Autoantikörperdiagnostik.....	18
2.2.3 Isolierung von Auerbachplexus	23
2.3 Statistik.....	24
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Klinische Daten	25
3.1.1 Fallbeschreibungen der 5 Hodgkin-Patienten mit PNS (Hodgkin/Para-Gruppe)	25
3.1.2 Patienten mit M. Hodgkin (Hodgkin-Gruppe).....	29
3.2 Autoantikörperergebnisse.....	30
3.2.1 Immunfluoreszenz	30
3.2.2 Durchflußzytometrie	40
3.2.3 Western Blot.....	43
4. Diskussion	48
4.1 Antineuronale Autoantikörper bei PNS	48
4.2 Antineuronale Autoantikörper bei M. Hodgkin	49
4.3 Oberflächen-bindende Autoantikörper bei M. Hodgkin	53
4.4 Antinukleäre Antikörper bei M. Hodgkin	54
5. Literaturverzeichnis	57
6. Anhang	68

Zusammenfassung

Einleitung: Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS) sind Erkrankungen, die mit einem Tumor assoziiert sind, aber nicht durch diesen selbst oder seine Metastasen hervorgerufen werden. Es wird eine autoimmune Genese der PNS vermutet, nachdem mehrere onkoneuronale Autoantikörper identifiziert werden konnten. Beim Hodgkin-Lymphom wurden anti-Tr-Autoantikörper im Zusammenhang mit paraneoplastischer Kleinhirndegeneration (PCD) identifiziert. Antineuronale Autoantikörper konnten niedrigtitrig ebenfalls bei Tumorpatienten ohne PNS festgestellt werden und scheinen mit einer verbesserten Prognose einherzugehen. Wir untersuchten Hodgkin-Lymphom-Patienten ohne und mit PNS auf das Vorkommen antineuronaler Autoantikörper und ob bei vorhandenen Autoantikörpern daraus eine verbesserte Prognose resultiert.

Methoden: Die Seren von 67 Hodgkin-Patienten ohne bekanntes PNS und 5 Seren von Hodgkin-Patienten mit bekanntem PNS (3 PCD; 1 limb. Enzephalitis; 1 Polyneuropathie) wurden untersucht. Seren von gesunden Erwachsenen dienten als Kontrollen. Die Autoantikörperdiagnostik wurde mittels Immunfluoreszenz, Western Blot und Durchflusszytometrie durchgeführt.

Resultate: 4 der 5 Hodgkin-Patienten mit PNS wiesen antineuronale Autoantikörper auf. 2 PCD-Patienten waren anti-Tr positiv. Die Patienten mit Polyneuropathie und limb. Enzephalitis zeigten beide einen atypischen neuronalen Antikörper. Bei den Hodgkin-Patienten ohne PNS wiesen 6/67 (8.9%; Kontrollen: 2.2%; n.s.) einen antineuronalen Antikörper auf. Davon könnte einer ein anti-Tr Antikörper sein. 10/67 (14.9%) zeigten einen antinukleären Antikörper (Kontrollen: 23.9%; n.s.). Durchflußzytometrisch hatten mehr Hodgkin-Patienten (29.9%; 20/67) einen Antikörper gegen ubiquitäre Oberflächenepitope im Vergleich zu den Kontrollen (8.7%; 4/46) ($p < 0.01$). Neuronale Zelloberflächenantikörper zeigten sich bei 22.4% (15/67) der Hodgkin-Patienten im Gegensatz zu 10.9% (5/46) der Kontrollen (n.s.).

Diskussion: Paraneoplastische neurologische Syndrome bei M. Hodgkin sind mit hochtitrigen antineuronalen Autoantikörpern assoziiert. Handelt es sich um eine paraneoplastische Kleinhirndegeneration, so ist es meist der anti-Tr Antikörper, was hier bestätigt werden konnte. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch bei Hodgkin-Patienten ohne PNS antineuronale Antikörper vorkommen, und zwar mit geringem Titer. Eine bessere Tumorprognose in Zusammenhang mit diesen

Antikörpern (wie z.B. für Anti-Hu bekannt), konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. Als weitere Tumor-assoziierte Antikörper wurden antinukleäre Antikörper (ANA) in vorhergehenden Studien beschrieben. Diese können ebenfalls mit einer verbesserten Prognose einhergehen. Auch in dieser Studie zeigten sich bei den Hodgkin-Patienten ohne PNS antinukleäre Antikörper und auch Antikörper gegen ubiquitäre Oberflächenepitope. Es wurde auch für diese Antikörper keine Korrelation zu einem prognostischen Effekt festgestellt. Die erhöhte unspezifische AK-Produktion könnte speziell beim Hodgkin-Lymphom auch durch eine Dysregulation der entarteten B-Zellen verursacht sein, wofür allerdings keine weiteren Hinweise gefunden werden konnten.

Summary

Introduction: Paraneoplastic neurologic syndromes (PNS) are disorders associated with cancer which are not caused by a local effect of the tumour or its metastases. In supposition of autoimmunity, different onconeurological autoantibodies have been found. Hodgkin's disease with paraneoplastic cerebellar degeneration (PCD) is associated with the anti-Tr-antibody. Low titers of antineuronal autoantibodies could also be found in cancer-patients without PNS. These patients had a better clinical outcome. We tested sera of patients with Hodgkin's disease with and without PNS and looked for antineuronal autoantibodies and an association to a better clinical outcome.

Methods: 67 sera of patients with Hodgkin's disease without PNS and 5 sera of patients with Hodgkin's disease with PNS (3 PCD, 1 limbic encephalitis, 1 polyneuropathy) were tested. Sera of healthy adults were used as controls. Autoantibodies were detected by indirect immunofluorescence, western blot analysis and flow cytometry.

Results: 4/5 patients with Hodgkin's disease and PNS had an antineuronal antibody, 2 with PCD had the anti-Tr-antibody. These with polyneuropathy and limbic encephalitis had both an atypical antineuronal antibody. 6/67 (8.9%) patients with Hodgkin's disease without PNS had an antineuronal antibody (controls: 2.2%; n.s.), 1 could be anti-Tr. 10/67 (14.9%) were ANA-positive (controls: 23.9%; n.s.). 20/67 (29.9%) patients had an antibody against indifferent epitope-antigenes in flow cytometry but only 4/46 (8.7%) of the healthy controls ($p < 0.01$). 15/67 (22.4%) patients and 5/46 (10.9%) healthy controls had an epitope antineuronal antibody in flow cytometry (n.s.).

Discussion: Paraneoplastic neurologic syndromes with Hodgkin's disease are associated with high titers of antineuronal autoantibodies. In case of PCD, we confirmed that this is mainly the anti-Tr antibody. Our work shows that also in Hodgkin-Patients without PNS antineuronal antibodies occur in a low titer. A better tumor-prognosis in relation with these antibodies (as known for example for anti-Hu) was not detected. Antinuclear antibodies (ANA) are known as another tumor-associated antibody and can be partially associated with a better clinical outcome. In the group of Hodgkin-Patients without PNS we found ANA and even antibodies against indifferent epitope-antigenes. A better prognosis associated with these antibodies could not be confirmed within this study. In case of Hodgkin's disease the

malignant B-cells may cause a dysregulation of antibody production and a higher incidence but there was no further indication for this.

1. Einleitung

1.1 Morbus Hodgkin

Der Morbus Hodgkin gehört zu den malignen Lymphomen. Er wird synonym auch als Hodgkin-Lymphom, Lymphogranulomatose oder Hodgkin's disease bezeichnet.

Erstmals beschrieben wurde er 1832 von Thomas Hodgkin (1798-1866) (Hodgkin 1832). Carl Sternberg und Dorothy Reed beschrieben unabhängig voneinander die charakteristischen Zellen, die danach als Sternberg-Reed-Zellen bezeichnet wurden (Sternberg 1898, Reed 1902).

Die Inzidenz liegt bei 2-4:100 000 pro Jahr. Männer sind im Verhältnis 5:3 häufiger betroffen als Frauen. Die Altersverteilung zeigt einen zweigipfligen Verlauf. Der erste Gipfel liegt in den industrialisierten Ländern um das 30. Lebensjahr, in Entwicklungsländern bereits im Kindesalter. Der zweite Gipfel findet sich bei einem Alter von 70 Jahren (Wolf et al. 1999).

Das charakteristische Merkmal des M. Hodgkin ist eine kleine klonale Population von großen Zellen. Besitzt diese Zelle nur einen Kern, wird sie als Hodgkin-Zelle bezeichnet, ist sie multinukleär, wird sie Reed-Sternberg-Zelle genannt (Küppers et al. 1998, Thomas et al. 2004).

Umgeben werden diese Zellen von nichtmalignen T-Lymphozyten (hauptsächlich), B-Lymphozyten, Histiocyten, Eosinophilen, Neutrophilen und Plasmazellen (Burke 1992). Das Verhältnis von HRS-Zellen zu den umgebenden, nichtmalignen Zellen liegt bei 1:1000 (Wolf et al. 1999, Cossman 2001).

Früher wurde zur histologischen Einteilung die Rye-Klassifikation angewendet, seit 2001 ist die neue WHO-Klassifikation für Lymphome gültig (Chan 2001). Danach werden verschiedene Formen des M. Hodgkin unterschieden (Tab. 1).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation des Hodgkin-Lymphoms

<u>1. Klassisches Hodgkin-Lymphom</u>	- Lymphozytenreich
	- Nodulär Sklerosierend
	- Mischzellig
	- Lymphozytenarm
<u>2. Nodulär Lymphozytenreiches Hodgkin-Lymphom</u>	

Die eigenständige Betrachtung des Nodulär Lymphozytenreichen Hodgkin-Lymphoms ergab sich durch den Nachweis von morphologischen Unterschieden zwischen den HRS-Zellen des klassischen M. Hodgkin und denen des Nodulär Lymphozytenreichen M. Hodgkin. Erstere tragen als Oberflächenantigene die Merkmale CD30, CD15 und selten CD20 und entstehen aus B-Lymphozyten des Keimzentrums/Follikels, haben aber die Fähigkeit zur Immunglobulinbildung verloren (Küppers et al. 1998, Küppers et al. 2002). Bei den letzteren dominiert CD20. Diese Zellen entstehen ebenfalls aus B-Lymphozyten des Keimzentrums, die Fähigkeit zur mRNA-Bildung für Antikörper ist aber noch vorhanden (Küppers et al. 1998, Chan 2001). In seltenen Fällen gibt es eine Variante, wobei die HRS-Zellen beim klassischen M. Hodgkin aus T-Lymphozyten generiert sind (Küppers et al. 1998).

Der Mutationsvorgang ist bisher unbekannt. Ebenfalls unbekannt ist der Vorgang, wie diese mutierten Zellen der Apoptose entgehen, da normalerweise Zellen im Keimzentrum mit verlorener Fähigkeit zur Antikörper-Bildung eliminiert werden (Cossmann 2001, Jarrett 2002).

Als eine Theorie des Mutationsvorgangs wird der Einfluss von Viren, besonders des Epstein-Barr-Virus (EBV), diskutiert. EBV als onkogenes Agens ist z.B. auch in Zusammenhang mit dem isolierten cerebralen Lymphom bei HIV-Patienten bekannt. Dort konnte in fast allen Zellen aktives EBV-Genom nachgewiesen werden (Camilleri-Broet et al. 1997).

Im Genom der HRS-Zellen konnte in den Industriestaaten bei ca. 50% und in den Entwicklungsländern bei über 90% der Erkrankungen DNS des Epstein-Barr-Virus nachgewiesen werden (Wolf et al. 1999, Gandhi et al. 2004). Diese Zellen exprimieren als Oberflächenmerkmal EBV-codierte Proteine: Latent membrane protein-1 (LMP1), Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA1) und Latent membrane protein-2 (LMP2) (Herbst 1996, Jarrett 2002). Diese könnten durch Veränderung der

Interaktionen im Keimzentrum eine Rolle im Überleben dieser Zellen spielen (Jarrett 2002). EBV-positive Fälle kommen besonders häufig bei Kindern, älteren Erwachsenen (>45Jahre) und beim Mischzelligen M. Hodgkin vor (Gandhi et al. 2004).

Bei einer Untersuchung zum Zusammenhang zwischen M. Hodgkin und dem Masernvirus konnten bei der Hälfte der Fälle eine Bindung von anti-Masern-Antikörpern an HRS-Zellen nachgewiesen werden (Benharroch et al. 2004). Die klinisch-pathologischen Zusammenhänge werden noch diskutiert, wobei in einer anderen Studie keine Zusammenhänge zwischen einer Masern-Infektion und dem gehäuften Auftreten von M. Hodgkin festzustellen war (Wilson et al. 2007).

Als erstes Leitsymptom eines M. Hodgkin gilt die schmerzlose Lymphknotenschwellung, meist zervikal, seltener auch mediastinal, axillär oder inguinal. Zusätzliche Symptome sind häufig Leistungsverlust/Müdigkeit, Fieber >38°C, Nachtschweiß und Gewichtsverlust von >10% des Körpergewichts innerhalb von 6 Monaten.

In der Regel beginnt das Hodgkin-Lymphom in einer Lymphknotengruppe und breitet sich zuerst lymphogen, später auch hämatogen aus. Letztlich kommt es zu einer Systemerkrankung, die sich auch in extralymphatischen Organen manifestiert.

Zur Diagnose und histologischen Einteilung wird eine Extirpation/Biopsie der vergrößerten oder verdächtigen Lymphknoten durchgeführt.

Darüber hinaus wird ein Staging durchgeführt. Dazu müssen die befallenen Lymphknoten und/oder die Hodgkinherde außerhalb von Lymphknoten gefunden werden. Je nach Anzahl und Lokalisation wird dann das Krankheitsstadium festgelegt (Tab. 2) (Wolf et al. 1999).

Tabelle 2: *M. Hodgkin – Stadieneinteilung nach der (modifizierten) Ann-Arbor-Klassifikation*

<u>Stadium</u>	<u>Merkmale</u>
I	Befall einer einzigen Lymphknotenregion (I/N) oder Vorliegen eines einzigen extranodalen Herdes (I/E)
II	Befall von 2 oder mehr Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/N) oder Vorliegen lokalisierter extranodaler Herde mit Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II/E)
III	Befall von 2 oder mehr Lymphknotenregionen beiderseits des Zwerchfells (III/N) oder Befall lokalisierter extranodaler Herde und Lymphknoten beiderseits des Zwerchfells (III/E) III1: Subphrenisch beschränkt auf Milz und/oder zöliakale/portale LK III2: Subphrenisch unterhalb des Truncus coeliacus
IV	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Lymphknotenbefall.
Zusatz: A: Ohne Allgemeinsymptome B: Mit Allgemeinsymptomen (z.B. Fieber, Gewichtsverlust)	

Als Therapieziel wird die komplette Remission angestrebt. Die Behandlung erfolgt meist im Rahmen kontrollierter klinischer Studien je nach Stadium und Klassifikation mit intensivierter Polychemotherapie in Kombination mit Radiotherapie (Diehl et al. 2004). Ein anderer Ansatz stellt die Immuntherapie dar. Dabei will man z. B. cytotoxische T-Zellen gegen das latente EBV-Antigen in den Sternberg-Reed-Zellen einsetzen. Diese Methode ist noch in der Erprobung (Übersicht in (Wiedemann et al. 2002)). Die Prognose ist unterschiedlich, je nach Stadium und Vorliegen von weiteren Symptomen. Durch die Risiko-adaptierte Behandlung konnten sehr gute Überlebensraten erreicht werden (Diehl et al. 2004). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt zur Zeit zwischen 80 und 95%. Diese insgesamt günstige Prognose wird aber auch durch die Langzeittoxizität der Radio- und Chemotherapie, die zu Zweitneoplasien führen kann, getrübt. Die häufigsten soliden Zweittumoren (relatives Risiko: 2.4%) sind Lungenkarzinome, kolorektale Karzinome und Mammakarzinome (Behringer et al. 2004).

1.2 Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS)

Unter Paraneoplasien versteht man allgemein Syndrome, die mit einem Tumor assoziiert sind, jedoch nicht durch seine lokale Wirkung, seine Metastasen oder die angewendete Therapie und deren Nebenwirkungen entstehen („the remote effect of cancer“) (Henson 1982).

Paraneoplastische neurologische Syndrome sind erst in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Erstmals beschrieb Denny-Brown 2 Patienten mit sensorischen Symptomen, bei denen post-mortem ein bronchogenes Karzinom entdeckt wurde (Denny-Brown 1948). Später veröffentlichte Wilkinson 5 Fälle von Tumor-assoziiierter sensorischer Neuromyopathie (Wilkinson 1964) und fand 1965 mit Zeromski bei diesen Patienten einen antineuronalen Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz (Wilkinson/Zeromski 1965).

Insgesamt leiden wenige Tumorpatienten an einer Paraneoplasie (weniger als 15%). Es wurden schon annähernd alle Organe als Ziel von Paraneoplasien beschrieben, die meisten finden sich im endokrinen System, im Nervensystem, Hämatologisch oder Kutan (Übersicht in (Agarwala 1996)). Paraneoplastische **neurologische** Syndrome kommen insgesamt mit einer Häufigkeit zwischen 0.01-2% aller Tumorpatienten vor und sind meistens mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom, gynäkologischen Tumoren oder Lymphomen assoziiert (Grisold et al. 1995, Blaes 2002). Der Zeitpunkt des Auftretens ist variabel und kann dem Tumor vorangehen, gleichzeitig mit ihm auftreten oder nach der Tumorentdeckung in Erscheinung treten (Agarwala 1996). Dabei gehen 50-60% der PNS der Entdeckung des Tumors voraus (Dropcho 1995, Blaes 2002).

Paraneoplastische neurologische Syndrome können im gesamten zentralen und peripheren Nervensystem vorkommen (Tab. 3). Außerdem können mehrere Syndrome gleichzeitig vorliegen, z.B. bei paraneoplastischer Enzephalomyelitis mit sensorischer Neuronopathie (Übersicht in (Posner/Dalmau 2000)).

Tabelle 3: Paraneoplastische neurologische Syndrome

Fett: klassische paraneoplastische neurologische Syndrome nach Graus et al. 2004; ZNS: Zentrales Nervensystem; PNS: Peripheres Nervensystem

ZNS	PNS	Neuromuskulär/ Muskel
<ul style="list-style-type: none"> • Enzephalomyelitis • Limbische Enzephalitis • Hirnstammenzephalitis • Paraneoplastische Kleinhirndegeneration • Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom • Stiff-Person-Syndrom 	<ul style="list-style-type: none"> • Motorische Neuropathie • Sensorische Neuropathie • Autonome Neuropathie/ Gastrointestinale Pseudoobstruktion • Sensomotorische Neuropathie • Guillain-Barré-Syndrom • Paraneoplastische Retinopathie 	<ul style="list-style-type: none"> • Myasthenia gravis • Lambert-Eaton myasthenes Syndrom • Neuromyotonie • Dermatomyositis

2004 wurden von der Arbeitsgruppe um Graus diagnostische Kriterien festgelegt, welche die Diagnose eines sicheren oder möglichen PNS ermöglichen. Diese berücksichtigen das neurologische Syndrom, den Tumor und onkoneuronale Antikörper. (Tab. 4)

Dabei wurden von der Autorengruppe die PNS in klassische und nicht-klassische paraneoplastische neurologische Syndrome aufgeteilt (Tab. 3) (Graus et al. 2004).

Tabelle 4: Diagnostische Kriterien für paraneoplastische neurologische Syndrome

Sichere PNS:
<ol style="list-style-type: none">1. Ein klassisches Syndrom mit einem Tumor, welcher innerhalb von 5 Jahren nach Diagnose der neurologischen Erkrankung in Erscheinung tritt.2. Ein nicht-klassisches Syndrom, das nach der Tumorbehandlung (ohne begleitende Immuntherapie) verschwindet bzw. sich signifikant verbessert. Vorrausgesetzt, dieses Syndrom neigt nicht zu spontaner Remission.3. Ein nicht-klassisches Syndrom mit onkoneuronalem Antikörper und einem Tumor, welcher innerhalb von 5 Jahren nach Diagnose der neurologischen Erkrankung in Erscheinung tritt.4. Ein neurologisches Syndrom (klassisch oder nicht) mit gut charakterisierten onkoneuronalen Antikörpern (anti-Hu, -Yo, -CV2, -Ri, -Ma2 oder -Amphiphysin) und keinem Tumor.
Mögliche PNS:
<ol style="list-style-type: none">1. Ein klassisches Syndrom, kein onkoneuronaler Antikörper, kein Tumor, aber ein hohes Risiko an einem zugrundeliegenden Tumor zu leiden.2. Ein neurologisches Syndrom (klassisch oder nicht) mit teilweise charakterisiertem onkoneuronalem Antikörper und keinem Tumor.3. Ein nicht-klassisches Syndrom, keine onkoneuronalen Antikörper und ein Tumor, welcher innerhalb von 2 Jahren nach Diagnose in Erscheinung tritt.

Die Entstehung einer Paraneoplasie generell kann verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit besteht in der Hormonproduktion von neuroendokrin differenzierten Tumoren. So führt zum Beispiel eine Produktion von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zu einem paraneoplastischen Cushing-Syndrom (Übersicht in (Terzolo et al. 2001)).

Die Pathogenese der paraneoplastischen neurologischen Syndrome ist noch nicht sicher geklärt, es finden sich jedoch deutliche Hinweise auf eine Autoimmunpathogenese. Dabei wird davon ausgegangen, dass Tumor und Neurone identische Antigene exprimieren. Gegen diese "onkoneuronalen" Antigene wird dann eine Immunreaktion generiert. Dadurch kommt es zur klinischen Manifestation des paraneoplastischen Syndroms (Dropcho 1998, Posner/Dalmau 2000).

Die Art der autoimmunen Reaktion wird kontrovers diskutiert. Es werden zelluläre (z.B. zytotoxische T-Zellen) und humorale (Autoantikörper) Auslösungsmechanismen

vorgeschlagen. Tatsächlich wurden verschiedene Autoantikörper gegen neuronale Strukturen im Serum und/oder Liquor von Patienten mit Paraneoplasien gefunden (Tab. 5). Mittlerweile konnten für einen großen Teil von ihnen auch die Antigene in Nervensystem und Tumorgewebe identifiziert werden (Übersicht in (Blaes 2002)).

Tabelle 5: PNS, assoziierte Autoantikörper und assoziierte Tumore

Benennung der Antikörper nach Indexpatienten: Hu, CV2, Yo, Tr, Ri, Ma; SCLC: Small cell lung cancer (Kleinzelliges Bronchialkarzinom); ANA: Antinukleärer Antikörper; ANNA: Antineuronal nukleärer Antikörper; AchR: Acetylcholinrezeptor; VGCC: Voltage gated calcium channel (spannungsabhängiger Kalziumkanal); GAD: Glutamatdecarboxylase; PCA: Purkinjezell Antikörper;

PNS	Autoantikörper	Assoziierte Tumore
Paraneoplastische Neuropathie	Anti-Hu	Verschiedene (meist SCLC)
	ANA	Verschiedene (meist gynäk.)
	ANNA-3	SCLC
	Anti-CV2	Lunge
Paraneoplastische Kleinhirndegeneration	Anti-Hu	SCLC
	Anti-ANNA3	SCLC
	Anti-Yo	Ovar, gynäkologische
	Anti-Tr	Morbus Hodgkin
Opsoclonus-Myoclonus Syndrom	Anti-Ri	Brustdrüse
	Anti-Hu/atypisch	Neuroblastom, SCLC
Limbische Enzephalitis	Anti-Hu	SCLC
	Anti-Ma	Testis
	Anti-PCA-2	SCLC
Paraneoplastische Retinopathie	Anti-Recoverin	SCLC, andere
Gastrointestinale Pseudoobstruktion	Anti-Hu	SCLC
Stiff-man Syndrom	Anti-GAD	
	Anti-Amphiphysin	Brustdrüse
Myasthenia gravis	Anti-AchR	
	Anti-Titin	Thymom
LEMS	Anti-VGCC	SCLC

Als erster paraneoplastischer Autoantikörper wurde z.B. 1985 anti-Hu beschrieben (Graus et al. 1985). Anti-Hu ist der am häufigsten gefundene Antikörper bei PNS und ist meist mit einem kleinzelligen Bronchialkarzinom und einer paraneoplastischen Enzephalomyelitis oder der subakuten sensiblen Neuropathie (PEM/SSN-Paraneoplasie) assoziiert (Graus et al. 2001, Sillevs Smitt et al. 2002).

Bei etwa 2/3 aller Patienten mit paraneoplastischen Erkrankungen können im Serum spezifische antineuronale Antikörper nachgewiesen werden. Diese treten praktisch nie bei gesunden Kontrollen oder Patienten mit nicht-paraneoplastischen Erkrankungen auf, so dass diese Antikörper bei mäßiger Sensitivität eine hohe Spezifität für das Vorliegen eines PNS haben (Blaes et al. 1998a). Wird ein solcher Antikörper (AK) nachgewiesen, ohne dass ein Tumor bisher bekannt ist, sollte eine intensive Tumorsuche durchgeführt werden (Voltz 2002). Eine Ausnahme bilden die Antikörper bei neuromuskulären Erkrankungen (Blaes 2002). Beim Lambert-Eaton-myasthenen-Syndrom (LEMS) wurden Antikörper gegen den spannungsabhängigen Kalziumkanal (Voltage-gated calcium channel/ VGCC) vom P/Q-Typ gefunden, was zu einer Störung der Übertragung an der motorischen Endplatte führt (Lang et al. 1981, Motomura et al. 1997, O'Suilleabhain et al. 1998). Hierbei ist der präsynaptische Anteil der neuromuskulären Synapse betroffen. Diese Antikörper wurden bei der paraneoplastischen und nicht-paraneoplastischen Erkrankung gefunden. Ähnlich ist das Bild bei der Myasthenia gravis (MG). Hier rufen Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor (anti-AchR) der Muskelzelle die Krankheit hervor (Vincent 1980). Antikörper gegen den spannungsabhängigen Kaliumkanal (voltage-gated K⁺ channel/VGKC) sind die Ursache der Neuromyotonie (NMT) (Vincent et al. 1998). Diese Antikörper sind sehr spezifische Marker für das Vorliegen einer MG oder NMT, allerdings unterscheiden diese nicht zwischen der paraneoplastischen und nicht-paraneoplastischen Form der Erkrankung (Voltz 2002).

Bei den autoimmunen Erkrankungen der neuromuskulären Synapse ist die pathogenetische Wirkung der Autoantikörper nachgewiesen und kann im Rahmen eines PNS ausgelöst werden. Die Pathogenität anderer antineuronaler Antikörper (z.B. anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri) konnte bisher nicht vollständig geklärt werden (Brashear et al. 1991, Blaes 2002, Voltz 2002). Einen Hinweis auf die Wirkung von Autoantikörpern auf neuronale Zellen zeigte die Untersuchung von Greenlee et al. Sie konnten in vitro eine Zelllyse der zerebellären Granularzellen von Ratten nachweisen, nachdem diese mit anti-Hu-Serum inkubiert wurden (Greenlee et al.

1993). Ebenso fanden Schäfer et al. einen zytotoxischen Effekt von PNS-Seren und deren IgG auf kultivierten Plexus myentericus (Schäfer et al. 2000). Verschuuren et al. untersuchten die Zytotoxizität von anti-Hu-Serum gegen Tumorzelllinien. Sie konnten feststellen, dass zwar das Serum, nicht aber das reine IgG einen zytotoxischen Effekt zeigte (Verschuuren et al. 1997). Weitere Versuche, über die Immunisierung mit onkoneuronalen Antigenen (HuD-Antigen, (Sillevis Smitt et al. 1995), Yo-Antigen (Tanaka et al. 1995)) ein PNS auszulösen, waren nicht erfolgreich. Bei einer DNA-Immunisierung von Mäusen mit cdr2(PCD17)-cDNA bildeten diese Antikörper und zytotoxische T-Lymphozyten gegen Purkinjenzellen. Allerdings kam es auch hier zu keiner klinischen Symptomatik oder histologischen Schädigung (Sakai et al. 2001). Einzig für Antikörper gegen das retinale Protein Recoverin konnte in vivo ein Beweis der Pathogenität an Ratten erbracht werden. Diese dringen in Photorezeptor- und Bipolarzellen ein und führen zur Apoptose der Zellen (Polans et al. 1991, Adamus et al. 1998).

Es wird nun postuliert, dass neuromuskuläre PNS (LEMS, MG, NMT) meist Antikörper-vermittelt zu sein scheinen, während PNS des ZNS vermutlich T-Zell vermittelt sind, mit fraglichem zusätzlichem Effekt der Antikörper (Blaes 2002).

Es wurden post mortem Zellinfiltrationen im Nervengewebe von Patienten gefunden, die einen Anhaltspunkt für eine zelluläre Beteiligung darstellten (Sutton et al. 2001). Dabei handelte es sich hauptsächlich um CD8+ T-Lymphozyten, die in Gehirn und hinteren Grenzstrangganglien beschrieben wurden (perivaskulär und interstitiell) (Sutton et al. 2002). Ein weiterer Hinweis brachte die Analyse der T-Zell-Rezeptoren im Gehirn anti-Hu-positiver Patienten, die eine oligoklonale Expansion von zytotoxischen T-Zellen zeigte (Voltz et al. 1998). Die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Purkinjenzellen konnte nach einer Immunisierung mit cdr2(PCD17)-Antigen festgestellt werden, allerdings ohne eine Purkinjenzellschädigung zu beobachten (Sakai et al. 2001).

Pellkofer et al. lieferten einen Beweis der Beteiligung von T-Zellen bei der Entstehung von PNS. Nach einer Immunisierung von Ratten mit PNMA1 (Ma1)-Protein konnten von diesen CD4+ T-Helferzellen entnommen werden. Nach Transfer der Zellen in andere Ratten lösten diese dann eine perivaskuläre inflammatorische Reaktion im ZNS in für PNS typischen Regionen aus, allerdings ohne dass die Tiere erkrankten (Pellkofer et al. 2004). Sowohl Autoantikörper als auch T-Lymphozyten scheinen also in der Pathogenese eine Rolle zu spielen.

Warum bei manchen Tumorpatienten eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird, ist noch fraglich. Bei 85% der Patienten mit einem Tumor werden potentiell immunogene Antigene exprimiert ohne eine Antitumor-Immunantwort auszulösen. Bei 15-20% entwickelt sich eine Antitumor-Immunantwort, allerdings ohne ein PNS als Folge (Übersicht in (Albert et al. 2004)). Alle kleinzelligen Bronchialkarzinome exprimieren Hu-Proteine. Dabei finden sich bei 16% der neurologisch unauffälligen Patienten niedrigtitrig Hu-Antikörper, während bei Patienten mit SCLC und PNS die Antikörper in höherer Konzentration vorkommen (Dalmau et al. 1990). Es scheint ebenfalls die Expression von Major Histocompatibility complex 1 (MHC1) neben der Expression der Hu-Proteine bei SCLC bedeutsam zu sein. Es zeigte sich ein erhöhtes Auftreten von Hu-Antikörpern bei diesen SCLC-Patienten, die ebenfalls MHC1 exprimierten (Dalmau et al. 1995).

Dass die Immunantwort gegen den Tumor für den Patienten von prognostischer Bedeutung ist, zeigte eine Studie an 196 Patienten mit SCLC. Bei ebenfalls 16% konnten niedrigtitrige Anti-Hu-Antikörper gefunden werden, wobei kein Patient klinisch neurologische Symptome aufwies. Die AK-positiven Patienten im Vergleich mit den AK-negativen Patienten wiesen im Durchschnitt ein weniger fortgeschrittenes Tumorstadium und eine höhere Sensitivität für die Chemotherapie auf (Graus et al. 1997a). Blaes et al. untersuchten die Seren von Patienten mit Non-SCLC auf antineurale und antinukleäre Autoantikörper. Auch bei diesen AK-positiven Patienten zeigte sich, unabhängig vom Tumorstadium, eine bessere Überlebensrate im Vergleich zu Antikörper-negativen Patienten (Blaes et al. 2000).

Es scheint die folgende Regel zu gelten: Patienten mit hohen Antikörper-Titern zu spezifischen Antigenen haben meist eine neurologische Dysfunktion, sind aber nur niedrige Antikörper-Titer vorhanden, besteht ein Einfluss auf das Tumorwachstum ohne unbedingt mit neurologischen Symptomen einherzugehen (Posner/Dalmau 2000).

1.3 Paraneoplastische neurologische Syndrome bei M. Hodgkin

Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS) kommen auch bei M. Hodgkin vor. Am häufigsten findet sich eine paraneoplastische Kleinhirndegeneration (PCD) (Horwich et al. 1966, Hammack et al. 1992, Cehreli et al. 1995, Graus et al. 1997b, Benzing et al. 1998, Hahn et al. 2000, Spyridonidis et al. 2002). Umgekehrt findet sich ein M. Hodgkin als Auslöser bei der PCD nach Lungen- und gynäkologischen Tumoren an dritter Stelle (Hammack et al. 1992, Shams'ili et al. 2003). PCD-Patienten leiden unter einem sich subakut (innerhalb von wenigen Wochen) entwickelnden panzerebellären Syndrom mit Nystagmus, okulomotorischer Ataxie, Dysarthrie, Dysmetrie und Rumpf- oder Extremitätenataxie. Selten können zusätzlich andere zentralnervöse oder peripherenervöse Störungen auftreten (Al-Lozi et al. 2003). Der häufigste neuropathologische Befund ist ein diffuser Purkinjenzellverlust (McCrystal et al. 1995, Bartos et al. 2002).

Trotter beschrieb 1976 erstmals einen immunologischen Zusammenhang zwischen PCD und M. Hodgkin (Trotter et al. 1976). Später fand man bei einer Studie über 21 Hodgkin-Patienten mit PCD bei 6 Patienten immunhistochemisch anti-Yo ähnliche Autoantikörper (Hammack et al. 1992). Anti-Yo färbt das Purkinjenzellzytoplasma in einem charakteristischen granulären Muster (Altermatt et al. 1991). Der bei M. Hodgkin und PCD gefundene Autoantikörper zeigte ebenfalls eine Bindung an Purkinjenzellzytoplasma, allerdings weniger inhomogen als durch anti-Yo verursacht (Hammack et al. 1992).

1997 beschrieben Graus et al. einen Antikörper, assoziiert mit einer paraneoplastischen Kleinhirndegeneration und einem Hodgkin-Lymphom, und nannten ihn anti-Tr nach Trotter (Graus et al. 1997b). Eine Klonierung des Antigens gelang nicht; das Protein konnte weder im Western Blot dargestellt, noch über ein cDNA-Bank-Screening kloniert werden (Graus et al. 1997b; Graus, Verschuren, persönliche Mitteilung). Die Lokalisation des Antigens zeigte sich im Zytosol und außen am endoplasmatischen Retikulum der Perikaryen in der Molekularschicht und im Zellkörper und den Dendriten der Purkinjenzellen. Immunhistochemisch bindet anti-Tr an Purkinjenzellzytoplasma mit einem charakteristischen gepunktetem Muster der Purkinjenzellendriten. Zusätzlich findet sich ein gepunktetes Muster in der Molekularschicht (Graus et al. 1998). Eine weitere Analyse von 28 Patienten mit anti-Tr Antikörpern zeigte, dass anti-Tr ein sehr spezifischer Marker für die Diagnose

einer M. Hodgkin-assoziierten PCD ist. 27 Patienten davon litten an einem cerebellären Syndrom und 25 Patienten davon an einem M. Hodgkin (Bernal et al. 2003).

Außer anti-Tr gibt es noch 2 weitere Autoantikörper, die mit PCD und M. Hodgkin assoziiert werden. Bataller et al. fanden bei 11 von 19 anti-Tr-positiven PCD Patienten zusätzlich Antikörper gegen das MAZ-Protein (Myc-associated zinc-finger protein) (Bataller et al. 2003). Bei 2 Patienten mit cerebellärer Ataxie wurden Antikörper gegen den extrazellulären Teil des metabotropen Glutamatrezeptors (anti-mGluR1) gefunden. Die Patienten litten zwar an einem M. Hodgkin, der Zusammenhang als PNS konnte allerdings aufgrund der langen Zeitdauer zwischen Beginn der Ataxie und des M. Hodgkin (2 und 9 Jahre) nicht gesichert werden (Sillevis Smitt et al. 2000). In einer anderen Studie fanden sich aber ebenfalls bei 2 PCD-Patienten anti-mGluR1-Antikörper in Assoziation mit dem Hodgkin-Lymphom (Shams'ili et al. 2003).

Neben der PCD finden sich weitere paraneoplastische neurologische Syndrome bei M. Hodgkin. Hier wurden sowohl verschiedene Polyneuropathieformen, wie auch limbische Enzephalitiden beschrieben. Unter einer Polyneuropathie wird die Erkrankung mehrerer peripherer Nerven verstanden, wobei je nach Art der betroffenen Nerven motorische, sensible oder vegetative (autonome) Ausfälle vorliegen können. Die Symptome sind je nachdem Parästhesien, Tiefensensibilitätsstörungen mit sensibler Ataxie, strumpf- bzw. handschuhförmige Oberflächensensibilitätsstörungen, distale Paresen und Reflexabschwächung. So wurden schon Hodgkin-Patienten mit sensorischer (Horwich et al. 1977, Plante-Bordeneuve et al. 1994, Maslovsky et al. 2001, Oh et al. 2004), sensomotorischer (Blaes et al. 1998b, Lahrman et al. 2001), motorischer (Younger 1991) und autonomer (Van Lieshout et al. 1986, Turner et al. 1993) Neuropathie beschrieben. Ebenfalls gibt es mehrere Fallbeschreibungen über Hodgkin-Patienten mit Polyradikulitis in Form des Guillain-Barré-Syndroms (GBS) (Julien et al. 1980, Maslovsky et al. 2001) und der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) (Navellou et al. 2001).

Das Guillain-Barré-Syndrom wird selten paraneoplastisch verursacht, als assoziiertes Neoplasma steht das Hodgkin-Lymphom an erster Stelle (Julien et al. 1980). Die autonome Polyneuropathie scheint eine häufige PNS bei Hodgkin-Patienten zu sein.

Während Van Lieshout et al. von einem Fall von akuter Dysautonomie (Van Lieshout et al. 1986) berichteten, fanden Turner et al. in einer prospektiven Studie bei 80% ihrer Hodgkin-Patienten eine autonome Dysfunktion, die als paraneoplastisch angesehen wurde (Turner et al. 1993). Bei der subakuten sensorischen Neuropathie (SSN) ist der Nachweis von anti-Hu Autoantikörpern charakteristisch (Dalmau et al. 1992), wobei der assoziierte Tumor dann meist ein kleinzelliges Bronchialkarzinom ist (Anderson/Posner 1988). In Zusammenhang mit M. Hodgkin wurden bisher diesbezüglich keine Autoantikörper beschrieben. Es fanden sich auch bei keiner der anderen paraneoplastischen Polyneuropathien neuronale Autoantikörper.

Als ein weiteres PNS bei M. Hodgkin wurden Fälle von Limbischer Enzephalitis beschrieben (Deodhare et al. 1996, Kung et al. 2002). Autoantikörper wurden nicht gefunden. Die limbische Enzephalitis ist Bestandteil verschiedener paraneoplastischer Syndrome und kann isoliert oder in Kombination mit anderen Syndromen als multifokale paraneoplastische Enzephalomyelitis (PEM) auftreten (Dropcho 1998). Assoziierte Tumoren sind das kleinzellige Bronchialkarzinom, Hodentumoren und Mammatumoren (Gultekin et al. 2000), selten auch Thymome oder Hodgkin-Lymphome (Al-Lozi et al. 2003). Weiterhin ist auch die Neuromyotonie als paraneoplastisches Syndrom beschrieben. In der Literatur finden sich 2 Fälle assoziiert mit einem Hodgkin-Lymphom (Caress et al. 1997, Lahrmann et al. 2001). Als Auslöser findet man Antikörper gegen Kaliumkanäle. (anti-VGKC Antikörper/voltage-gated K⁺ channels) (Vincent et al. 1998).

Verschiedenste andere neurologische Paraneoplasien in Zusammenhang mit dem Hodgkin-Lymphom sind als Fallbeschreibungen publiziert worden. Mehrere Fälle von paraneoplastischer Myelopathie wurden in Zusammenhang mit M. Hodgkin gefunden (Hughes et al. 1992, Dansey et al. 1988). Kay et al. beschrieben ein Opsoklonus-Myoklonus Syndrom (Kay et al. 1993) und Batchelor et al. eine Chorea (Batchelor et al. 1998) als Paraneoplasie bei M. Hodgkin. Es wurden auch Fälle von nicht-neurologischen Paraneoplasien bei M. Hodgkin beschrieben, wie z.B. ein nephrotisches Syndrom (Utsch et al. 1999, Spyridonidis et al. 2002).

Ein Patient mit M. Hodgkin zeigte Zeichen einer paraneoplastischen entzündlich-rheumatischen Erkrankung. Dieser Patient litt an Arthralgien, Myalgien, Arthritis und Polyneuritis. Im Serum dieses Patienten fand sich neben zirkulierenden Immunkomplexen ein antinukleärer Antikörper (ANA) mit einem Titer von 1:400 (Miro et al. 1982). Berichte über ANA beim Hodgkin-Lymphom finden sich sonst nicht in

der Literatur. Bei einer Studie über 347 Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom wurden bei 19% Antinukleäre Antikörper gefunden (Guyomard et al. 2003).

Bisherige Autoantikörperuntersuchungen bei M. Hodgkin wurden fast ausschließlich in Zusammenhang mit vorhandener Paraneoplasie durchgeführt. In einer Studie wurde bei Hodgkin-Patienten ohne PNS Autoantikörper gegen ssDNA, anti-RNP und anti-Sm (ribonukleare Protein-Antigene) gefunden (Swissa et al. 1992). Es ist aber bekannt, dass auch bei neurologisch unauffälligen Patienten mit Malignom onkoneuronale Autoantikörper gebildet werden können (Dalmau et al. 1990, Übersicht in (Albert et al. 2004)).

Es konnte bisher bei Hodgkin-Patienten kein Zusammenhang zwischen epidemiologischen Daten und der Neigung zur Autoantikörperbildung festgestellt werden. Bei 21 untersuchten Patienten mit PCD unterschieden sich die anti-Tr-positiven Patienten nicht hinsichtlich Alter, Geschlecht, Hodgkin-Subtyp oder Tumorstadium von den anti-Tr-negativen Patienten (Hammack et al. 1992). Auch bei einer Studie mit 25 Hodgkin-Patienten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Alter, Geschlecht, Tumorklassifikation und Stadium der anti-Tr-positiven und -negativen Patienten in Bezug auf die Antikörperbildung (Bernal et al. 2003).

Auch konnten keine Schlüsse aus dem Auftreten der PCD im Verhältnis zur Diagnose des Hodgkin-Lymphoms gezogen werden. Die zeitlichen Abstände variierten dabei von 0-24 Monaten vor und 1-120 Monaten nach der Lymphom-Diagnose (Hammack et al. 1992, Bernal et al. 2003).

1.4 Fragestellung

Wie häufig finden sich Autoantikörper bei M. Hodgkin-Patienten mit und ohne bekanntes paraneoplastisches neurologisches Syndrom?

Korreliert das Vorhandensein von Autoantikörpern mit klinischen oder epidemiologischen Daten und sind daraus Aussagen bezüglich der Prognose abzuleiten?

2. Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Insgesamt wurde Serum von 72 Patienten untersucht.

Nach Aufklärung und Zustimmung zur Studienteilnahme wurde den Patienten bzw. Probanden Blut abgenommen und das Serum abzentrifugiert. Bis zur Verwendung wurde das Serum bei -20 °C tiefgefroren.

57 Serumproben der M. Hodgkinpatienten wurden uns freundlicherweise von der German Hodgkin Study Group aus Köln zur Verfügung gestellt. Die Zustimmung zur Verwendung dieser Seren wurde von der Ethikkommission der Universität zu Köln erteilt.

Die Patienten mit M. Hodgkin wurden in zwei Gruppen unterteilt. Patienten mit M. Hodgkin und bekanntem PNS wurden gesondert von Patienten mit M. Hodgkin ohne bekannte Paraneoplasie betrachtet.

2.1.1 Patienten mit M. Hodgkin (Hodgkin-Gruppe)

In diese Gruppe wurden Patienten aufgenommen, bei denen ein Hodgkin-Lymphom diagnostiziert und histologisch gesichert und bei denen keine neurologische Krankheit bekannt war. Insgesamt wurden 67 Patientenproben untersucht, von denen 23 weiblich und 44 männlich waren. Das mittlere Alter in dieser Gruppe betrug 37.3 ± 15.8 Jahre (Mittelwert \pm Standardabweichung).

2.1.2 Hodgkinpatienten mit PNS (Hodgkin/Para-Gruppe)

Es wurden 5 Hodgkin-Patienten (4m / 1w, mittleres Alter 33.8 ± 11.9 Jahre) mit bekanntem PNS mituntersucht (Tab. 6). Die Diagnose des M. Hodgkin wurde histologisch gesichert. Die Diagnose des PNS wurde anhand der Richtlinien für Paraneoplastische Neurologische Syndrome von 2004 (Graus et al. 2004) gestellt. Diese Patienten werden gesondert von der Hodgkin-Gruppe als Fallbeschreibungen aufgeführt.

Tabelle 6: Daten der Hodgkinpatienten mit paraneoplastischem neurologischem Syndrom

PCD: Paraneoplastische Kleinhirndegeneration

Patient	Alter/Geschlecht	PNS
1	30m	Polyneuropathie
2	46m	PCD
3	34w	PCD
4	43m	PCD
5	16m	Limbische Enzephalitis

2.1.3 Gesunde Kontrollen (Kontroll-Gruppe)

In diese Gruppe wurden 46 gesunde Probanden aufgenommen. Es waren 28 weibliche und 18 männliche Probanden mit einer Altersverteilung von 38.9 ± 15.3 Jahre.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für unsere Versuche verwendeten wir die Zelllinie SKN-SH (Neuroblastomzelllinie) und die Zelllinie HEK 293 (Nierenfibroblasten, Human embryonic kidney). Das Kulturmedium bestand aus RPMI 1640 (Sigma, Steinheim) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS, HyClone, PerbioScience, USA), L-Glutamin (4mmol/l, Sigma), Streptomycin (20mg/l, Sigma) und Penicillin (20.000IE/l, Sigma). Darin wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Jeden 2. Tag wurde das Medium erneuert. Jeden 4. Tag wurden die Zellen im Verhältnis 1/4 gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin (2.5 g/l, Gibco-Invitrogen, USA) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Autoantikörperdiagnostik

2.2.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz werden Antikörperbindungen von Patientenserum an Zellstrukturen untersucht. Dazu werden histologische Gewebeschnitte zuerst mit Patientenserum (sind Antikörper vorhanden, findet eine Bindung statt) und anschließend mit einem monoklonalen anti-human IgG Zweitantikörper inkubiert. Dieser bindet an die Antikörper der Patienten. Durch einen fluoreszierenden Farbstoff an diesem Zweitantikörper können diese Bindungen dann mikroskopisch untersucht und ausgewertet werden. Mit diesem Verfahren wurden alle Proben ausgetestet, um vorhandene Antikörper im Serum zu finden. Es wurde ein kommerziell erhältlicher Assay zur Diagnostik antineuronaler Autoantikörper (Euroimmun, Lübeck) verwendet. Auf den Objektträgern waren unfixierte Gefrierschnitte von Kleinhirn, humanen Epithelzellen (Hep2-Zellen) und Darmwand mit Auerbachplexus aufgebracht.

Die Objektträger wurden 30 Minuten mit 65 µl Patientenserum (Verdünnung 1/32 in phosphatgepufferter NaCl-Lösung (Phosphate buffered saline (=PBS) Tween 0.2%) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal in PBS Tween 0.2% gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger mit 67µl Fluoreszeinthiocyanat- (FITC-) markiertem anti-human IgG (Verdünnung 1/75 in PBS Tween 0.2%, Dako, Hamburg) bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang mit PBS Tween 0.2% wurden die Objektträger mit Eindeckmedium und Deckgläschen versehen.

Unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) wurden die Schnitte ausgewertet. Als Positivkontrolle wurde ein anti-Hu positives Serum mitgetestet, wobei das typische antineuronal nukleäre Bindungsmuster eindeutig zu erkennen sein musste. Als Negativkontrolle dienten Puffer und Serum von gesunden Probanden.

2.2.2.2 Western Blot

Im Western Blot werden Proteine bestimmter Gewebe nach Größe aufgetrennt. Anschließend können Antikörperreaktivitäten der Patientenseren gegen diese Proteinfractionen dargestellt werden und die Größe der Proteinfraction in kD (kiloDalton) gemessen werden. Zur Messung werden die dargestellten Bindungen mit einem Standardstreifen verglichen und dadurch deren Größe bestimmt.

Als Antigengewebe in unseren Versuchen dienten die löslichen Proteinfractionen von Kleinhirn (Ratte), SKN-SH Zellen, HEK 293-Zellen und Auerbachplexus (Ratte).

1. Herstellung der Proteinfractionen

Zur Herstellung der Proteinfractionen wurde Kleinhirn von Ratten, sofort post-mortem, und Auerbachplexus von Ratten, der nach unten beschriebener Methode gewonnen wurde, verwendet. SKN-SH und HEK 293-Zellen sind im eigenen Labor etabliert. Das entsprechende Gewebe oder die Zellen wurden zunächst in PBS im Glaszylinder durch einen Mörser zerkleinert. Die Probe wurde danach 1min. bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Danach wurde die Probe mit dem Ultraschallhomogenisator (Bandelin HD2070) in 4 Zyklen von je 15 sek. Dauer homogenisiert und dann erneut 5min. zentrifugiert (4000 rpm, RT). Der Überstand, der jetzt die lösliche Proteinfraction enthält, wurde mit LDS sample buffer (Invitrogen) 4/1 verdünnt und bei 90°C für 5 Minuten erhitzt. Abschließend wurde Reducing Agent (Invitrogen) im Verhältnis 9/1 dazugegeben und die Probe bis zur Weiterverwendung bei -24°C tiefgefroren.

2. Elektrophorese

Es wurde eine Elektrophoresekammer (XCell SureLock, Invitrogen) und ein 4-12% Bis-Tris Polyacrylamid 2D-Well Gel (NuPage, Invitrogen) verwendet.

Die Proteinprobe wurde für 5 Minuten bei 70°C erwärmt, anschließend wurden 100µl in die größere Geltasche pipettiert. Als Standard wurde 20µl SeaBlue oder Mark12 (Invitrogen) in die kleinere Geltasche pipettiert. Als Puffer wurde Running Buffer (Invitrogen) verwendet, dem 500µl Antioxidans (Invitrogen) zugesetzt wurde. Es wurde über 10 Minuten ein Strom von 20 mA angelegt, danach 100mA mit einer Dauer von ca. 1 Stunde. Dadurch wurde die Proteinprobe in die einzelnen Proteinfractionen aufgetrennt.

3. Blotting

Es wurde eine Semidry-Blotkammer (XCell II Blotmodule, Invitrogen) und als Puffer Transfer Buffer (Invitrogen) verwendet. Für 2 Stunden wurde ein Strom von 150 mA angelegt. Dabei wurden die Proteinfractionen vom Elektrophoresegel auf eine Nitrocellulose-Blotfolie (Protan Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher&Schuell) übertragen. Die Blotfolie wurde anschließend mit Ponceaurot (Sigma) angefärbt, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Danach wurde die getrocknete Folie in 3mm breite Streifen geschnitten. Jeder Streifen enthält also die komplette aufgetrennte Proteinfraction.

4. Austestung

Zum Austesten der Streifen wurden diese 10 Minuten mit je 1ml Mischpuffer (PBS Tween 0.5% mit 11g/l Trockenmilchpulver) getränkt. Nach Abschütten des Puffers wurde zu jedem Streifen jeweils eine Serumprobe (10µl in 1ml Mischpuffer) gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Streifen 3mal jeweils 5 Minuten mit 1ml Mischpuffer gewaschen.

Danach wurde je 1ml mit Alkalischer Phosphatase- (AP-) markierter anti-human IgG (1/1000 in Mischpuffer, Dako) zu den Streifen pipettiert. Nach 30 Minuten erneuter Inkubationszeit wurde wieder 3mal gewaschen. Zur Visualisierung möglicher Reaktivitäten wurde zu den Streifen je 1ml 5Bromo - 4chloro - 3indolyphosphat - nitroblue - tetrazoliumchloride (BCIP-NBT, Sigma) gegeben und 10 min inkubiert.

Zur Auswertung der Banden wurden die Streifen eingescannt. Mit der GelScan-Software (BioSciTec, Frankfurt) erfolgte die Auswertung. Durch Vergleich mit dem Standardstreifen konnte die Größe des Proteins, an das eine Bindung erfolgte, abgelesen werden. Ebenso wurde semiquantitativ die Bindungsstärke abgeschätzt. Als Positivkontrolle verwendeten wir dabei anti-Hu positives Serum, wobei die typische Bindung an ein 35-40 kD Protein im Kleinhirn-Western Blot vorhanden sein musste. Als Negativkontrolle verwendeten wir Puffer und Serum von gesunden Probanden.

2.2.2.3 Durchflusszytometrie/ Fluorescent activated cell sorting (FACS)

Mit dem Verfahren der Durchflußzytometrie können Antikörperbindungen an extrazelluläre Epitope gemessen werden. Dazu werden einzelne Zellen mit Serum inkubiert (vorhandene Antikörper binden an die Zellen). Anschließend wird ein fluoreszierender Zweitantikörper eingesetzt, dieser bindet an die gebundenen Serumantikörper. Anschließend wird die Fluoreszenz gemessen und somit festgestellt, ob Antikörper gegen diese Zellen im Serum vorhanden sind.

In der Durchflusszytometrie wurden alle Proben mit SKN-SH Zellen und HEK 293 Zellen inkubiert und gemessen. Zeigten sich in einem Serum Antikörperbindungen an beide Zelllinien oder eine Bindung nur an die HEK 293 Zellen, wurde dies als Bindung gegen ubiquitäre Autoantigene gewertet. Bei einer ausschließlichen Antikörperbindung an SKN-SH Zellen wurde dies als neuronal-spezifische Bindung interpretiert.

1. Inkubation

Als Puffer wurde PBS mit 1% FKS (HyClone) und 0.1% Natriumazid (NaN_3 , Sigma) vermischt, im folgenden als FACS Puffer bezeichnet. In eine 96-Well Platte wurden pro Well 10^5 Zellen pipettiert. Die Zellen wurden mit Serum (1/50 in FACS Puffer) 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweifacher Waschung mit FACS Puffer wurde FITC-markiertes anti-human IgG (1/75 in FACS Puffer, Dako) dazugegeben und ebenfalls 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen in Messröhrchen gegeben.

2. Messung

Mit dem FACSCalibur (Becton-Dickinson) wurde die Fluoreszenz der Zellen jeder Serumprobe mit der CellQuest[®]-Software gemessen. Als Positivkontrollen dienten anti-CD 56 (bindet spezifisch an ein neuronales Adhäsionsmolekül (N-CAM 123C3), 1/100 in FACS Puffer, Dako) und anti-MHC1 (bindet an den Major Histocompatibility Complex, 1/100 in FACS Puffer, Dako). Zur Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit FACS-Puffer inkubiert. Zusätzlich wurden bei jedem Versuch 10 Seren gesunder Probanden inkubiert. Bei einer starken Antikörperbindung an die Zellen wurde eine hohe Rate an stark fluoreszierenden Zellen gemessen. (Abb. 1) Eine geringe Anzahl

von fluoreszierenden Zellen wurde hingegen gemessen, wenn keine Antikörperbindung an die Zellen stattgefunden hatte.

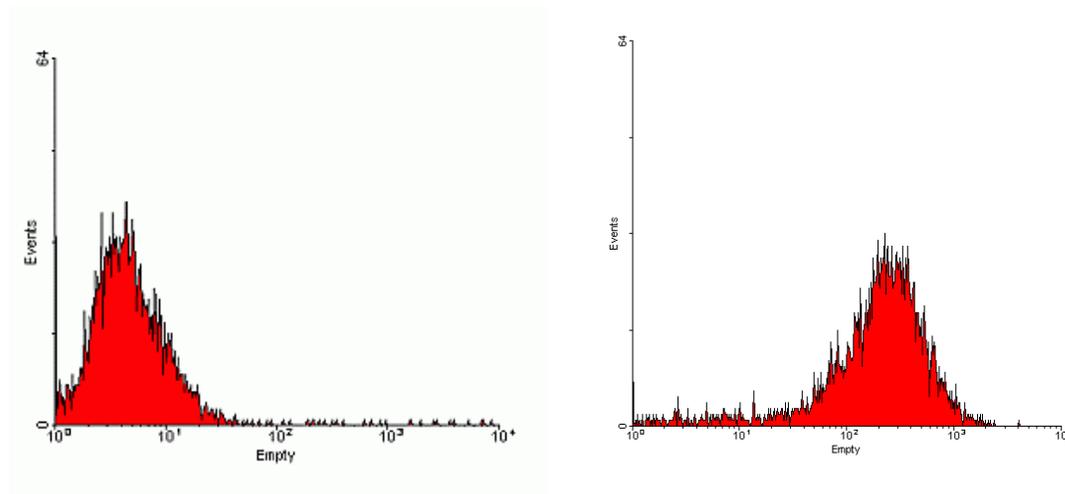


Abbildung 1: FACS-Messung; Unterschied schwach – stark fluoreszierende Zellen. X-Achse: Fluoreszenzstärke der einzelnen Zellen; Y-Achse: Anzahl der gemessenen Zellen. Linkes Bild: unspezifische Hintergrundbindung eines Kontrollserums; Rechtes Bild: Bindung eines Antikörper-positiven Serums

3. Auswertung

Es wurde nun ausgewertet, ob aus einem Serum eine Antikörperbindung an die Zellen stattgefunden hatte.

Es zeigte sich bei allen Proben eine leichte Fluoreszenz der Zellen. Zur Unterscheidung zwischen unspezifischen Bindungen und spezifischer positiver Antikörperbindung wurden zunächst die Ergebnisse der 10 Probandenserum ausgewertet. Von diesen wurde jeweils die Fluoreszenzstärke (mean fluorescence intensity (mfi)) gemessen und aus den Ergebnissen ein Mittelwert mit Standardabweichung errechnet. Dieser Mittelwert wurde als Grundlage zur Auswertung verwendet und jeweils mit den Ergebnissen der übrigen Proben verglichen.

Dabei wurde einem Serum eine positive Antikörperbindung zugeschrieben, wenn eine Fluoreszenzstärke gemessen wurde, die über dem Cut-off (Mittelwert + 2,5-facher Standardabweichung) lag.

2.2.3 Isolierung von Auerbachplexus

Der Auerbachplexus wurde aus Wistar-Ratten gewonnen. Die Tiere wurden zur Präparation durch Decapitation getötet und das Peritoneum eröffnet. Es wurde der gesamte Darm herausgetrennt und auf Eis gelegt. Weiterhin wurde der Darm in Kolon und Dünndarm unterteilt und unter mikroskopischer Sicht das Bindegewebe und die Gefäße abgetrennt. Nach Verkleinerung in 3-5 Teilstücke wurde das Peritoneum viscerale strumpfförmig abgezogen (Stripping) und das verbleibende Material in ein Eppendorfgefäß gegeben. Im Verhältnis 1:1 wurde nun Stammlösung (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, ICN Biomedicals, Inc., USA) + Gentamycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) + Metronidazol (Bayer AG, Leverkusen) + Glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)) mit Kollagenase Typ II (2mg/ml, Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Dabei wurde für ein 3 Tage altes Tier die Inkubationszeit von 1 Stunde gewählt und für jeden weiteren Lebenstag 10 Minuten hinzuaddiert.

Nach der Inkubation wurden die angefallenen Netze abpipetiert und in eisgekühltes DMEM gegeben. Mit dem restlichen Gewebe wurde dann ein weiterer Inkubationsschritt mit Kollagenase (1mg/ml DMEM) für 30 Minuten durchgeführt und danach je nach Lösungseigenschaft weitere Inkubationsschritte mit einer Inkubationszeit von jeweils 15-20 Minuten. Die Netze wurden in ein Eppendorfgefäß gesammelt und 10 Minuten bei 800 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert und der Rest mit einer Lösung aus 400µl Start V[®] (serumfreies Fertigmedium, speziell für neuronale Zellen, Biochrom AG, Berlin) + FKS (10%, Biochrom AG) resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand abpipetiert. Die so verbleibenden Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -82°C tiefgefroren.

2.3 Statistik

Häufigkeitsvergleiche zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des Fisher's exact tests, Häufigkeitsvergleiche mit mehr als zwei Variablen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests berechnet. Vergleiche sonstiger Werte wurden mit Hilfe des ANOVA-Tests auf ihre Signifikanz überprüft. Ein $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 4®.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

3.1.1 Fallbeschreibungen der 5 Hodgkin-Patienten mit PNS (Hodgkin/Para-Gruppe)

Table 7: Übersicht der Hodgkin/Para-Gruppe

PCD: Paraneoplastische Kleinhirndegeneration; KR: Komplette Remission

Patient	Alter/ Geschlecht	Hodgkin- Subtyp/ Stadium	Paraneoplast. Neurologisches Syndrom	B- Sympt- ome	Verlauf
1	30m	Lymphzytenreich/ 3	Polyneuropathie	Ja	KR
2	46m	Nodulär-Sklerosierend/ 3	PCD	Ja	KR
3	34w	Mischzellig/ 3	PCD	Ja	KR
4	43m	Lymphozytenreich/ 2	PCD	Ja	KR
5	16m	Nodulär-Sklerosierend/ 2	Limbische Enzephalitis	Nein	KR

Patient 1:

Ein 30-jähriger männlicher Patient entwickelte über einen Zeitraum von 6 Monaten Parästhesien und Taubheitsgefühle an beiden Händen und Füßen. Die neurologische Untersuchung zeigte eine Schwäche der distalen Muskeln der linken, mehr als der rechten Hand und eine Areflexie. Es fand sich eine distal-symmetrische Hypästhesie und Hypalgesie. Es bestand eine Pallhypästhesie von 4/8 beidseits im Bereich des Großzehengrundgelenks. 6 Monate nach dem Beginn der neurologischen Symptome wurden eine zervikale Lymphknotenschwellung, intermittierendes Fieber und Gewichtsverlust festgestellt. Eine Lymphknotenbiopsie zeigte einen lymphozytenreichen M. Hodgkin, das Staging ergab ein Ann Arbor-Stadium III BE, wobei die zervikalen, inguinalen Lymphknoten und die pharyngeale Tonsille betroffen waren.

Die neurophysiologische Untersuchung (Elektroneuro- und Elektromyographie) zeigte verminderte Amplituden der sensorischen Nervaktionspotenziale der Nn. surales und des rechten N. medianus und fehlende sensorische Nervaktionspotenziale der Nn. ulnares und des linken N. medianus. Die sensiblen

Nervenleitungsgeschwindigkeiten lagen alle im Bereich der unteren Norm. In der motorischen Neurographie fanden sich leicht reduzierte Amplituden der Muskelsummenaktionspotenziale (MSAP) der Nn. peronei und ulnares und deutlich verminderte MSAP-Amplituden in beiden Nn. mediani und tibiales, bei nur diskret verminderten motorischen Nervenleitungsgeschwindigkeiten.

Die F-M- Latenzen der Nn. ulnaris und tibialis waren jeweils leicht verzögert. Diese Befunde sind vereinbar mit der Diagnose einer vorwiegend sensorischen, axonalen Neuropathie. Hinweise auf eine chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie konnten nicht festgestellt werden.

Die Liquordiagnostik zeigte eine leichte Pleozytose, erhöhtes Eiweiß (9.8 g/l) und eine Störung der Blut-Liquor-Schranke.

In der indirekten Immunfluoreszenz zeigte sich in Serum und Liquor ein antineuronaler Antikörper ebenso wie im Western Blot (Tab. 8). Damit wurde die Diagnose einer paraneoplastischen sensomotorischen Polyneuropathie gestellt.

Die Therapie des M. Hodgkin umfasste eine Chemotherapie nach dem BEACOPP-Schema. Dadurch kam es zur kompletten Remission des Lymphoms. Zur Therapie der Polyneuropathie wurden intravenöse Immunglobuline (IVIg, 0.4 g/KgKG für 5 Tage), gefolgt von 5 Zyklen Plasmapheresen 2 Monate später, eingesetzt, was aber jeweils zu keiner Besserung der Polyneuropathie führte.

Patient 2:

Bei einem 46-jährigen männlichen Patienten wird ein nodulär sklerosierender M. Hodgkin im Stadium 3 diagnostiziert. Bereits 2 Monate zuvor bestand eine B-Symptomatik mit Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Der Patient erhält eine kombinierte Strahlen- und Chemotherapie. Zwei Monate nach Diagnosestellung tritt eine sich innerhalb weniger Tage entwickelnde cerebelläre Symptomatik mit Rumpf- und Extremitätenataxie, Nystagmus und Schwindel auf. Die Kernspintomographie des Gehirns zeigt einen unauffälligen Befund. Im Liquor findet sich ein Eiweiß von 5g/l, 8 Zellen/µl (lymphozytär-monozytär, keine Lymphomzellen), und keine oligoklonalen Banden. Nach dem Nachweis eines anti-Tr- Autoantikörpers (Tab. 8) wird die Diagnose einer paraneoplastischen Kleinhirndegeneration gestellt. Während sich unter der Strahlen- und Chemotherapie eine vollständige Remission des M. Hodgkin zeigt, bleibt die schwere cerebelläre Symptomatik auch nach der Gabe von intravenösen Immunglobulinen unverändert.

Patient 3:

Eine 34-jährige weibliche Patientin wird mit einem gemischtzelligen M. Hodgkin im Stadium 3 diagnostiziert. Zwei Tage vor Beginn der Chemotherapie (3 Wochen nach Diagnosestellung) tritt bei der Patientin zusätzlich eine subakute cerebelläre Symptomatik mit Schwindel, skandierender Sprache und einer rumpf-betonten Ataxie auf. Die Kernspintomographie des Kopfes ist unauffällig. Nach dem serologischen Nachweis eines anti-Tr Antikörpers (Tab. 8) wird die Diagnose einer paraneoplastischen Kleinhirndegeneration gestellt. Eine Liquordiagnostik wurde nicht durchgeführt. Eine Chemotherapie (BEACOPP-Schema) des M. Hodgkin führt zur kompletten Remission des Lymphoms, das paraneoplastische Syndrom bessert sich jedoch nicht. Eine spezifische Therapie des neurologischen Krankheitsbildes erfolgte nicht.

Patient 4:

Ein 43-jähriger männlicher Patient wird mit zunehmendem Schwindel und Gangstörung, seit 7 Tagen zunehmend, aufgenommen. In der neurologischen Untersuchung finden sich eine schwere Rumpf- und Extremitätenataxie. Computertomographie und Kernspintomographie des Schädels sind unauffällig. Im Liquor finden sich 7 Zellen/ μ l, ein erhöhtes Eiweiß (8.3 g/l), aber keine oligoklonalen Banden. Die Autoantikörperdiagnostik (antinukleäre und antineuronale Antikörper) bleibt ohne Erfolg. Da der Patient seit einigen Wochen über vermehrte Gewichtsabnahme klagt, erfolgt eine Tumorsuche. Diese führt zum Nachweis mediastinaler Lymphome, nach einer Probeentnahme kann die Diagnose eines lymphozytenreichen M. Hodgkin Stadium 2 gestellt werden, die neurologischen Symptome werden als paraneoplastische Kleinhirndegeneration gesehen. Der Patient erhält eine Chemotherapie, was zur kompletten Remission führt. Über den Verlauf der paraneoplastischen Kleinhirndegeneration liegen keine Informationen vor.

Patient 5:

Bei einem 16-jährigen männlichen Patienten treten gleichzeitig mit der Diagnose eines nodulär-sklerosierendem M. Hodgkin Stadium 2 (ohne B-Symptome) eine zunehmende wahnhafte Depression und Störungen des Kurzzeitgedächtnisses auf. Nachdem zweimalig komplex-fokale Krampfanfälle auftraten, wird die Verdachtsdiagnose einer paraneoplastischen limbischen Enzephalitis gestellt. Die Kernspintomographie des Schädels zeigt keine Auffälligkeiten. Im Liquor finden sich 5 Zellen, 5.5 g/l Eiweiß und oligoklonale Banden. Nach dem Nachweis eines nicht weiter charakterisierbaren antineuronalen Autoantikörpers (Tab. 8) gilt die Diagnose einer paraneoplastischen limbischen Enzephalitis als sicher. Der Patient erhält eine Chemotherapie (BEACOPP-Schema), dies führt zur kompletten Remission des M. Hodgkin. Eine weitere Therapie der limbischen Enzephalitis erfolgt nicht.

Table 8: Antikörperbefunde der Hodgkin/Para-Gruppe

VGKC: voltage-gated potassium channel (Spannungsabhängiger Kaliumkanal), PCD:

Paraneoplastische Kleinhirndegeneration

Patient	PNS	Immunfluoreszenz	Western Blot	Beurteilung
1	Polyneuropathie	Zellkerne des Plexus myentericus, Purkinjezellkerne	Kleinhirn: Bande bei 38-40 kD	Atypischer Antikörper
2	PCD	Purkinjezellzytoplasma	negativ	anti-Tr Titer: 1:1000
3	PCD	Purkinjezellzytoplasma	negativ	anti-Tr Titer: 1:500
4	PCD	negativ	negativ	-
5	Limbische Enzephalitis	Purkinjezellkerne, Neuronenzellkerne	Kleinhirn: Bande bei 50-60 kD	Atyp. Antikörper Titer: 1:2000 (Anti-VGKC negativ)

3.1.2 Patienten mit M. Hodgkin (Hodgkin-Gruppe)

Es wurden 67 Patienten mit M. Hodgkin untersucht. 40 Patienten davon wiesen den Subtyp nodulär sklerosierend, 16 Patienten den mischzelligen Typ und 11 Patienten den lymphozytenreichen Typ des M. Hodgkin auf. Die Daten zum klinischen Verlauf sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Übersicht über die klinischen Daten der Hodgkin-Gruppe

		Insgesamt	Nodulär Sklerosierend	Mischzellig	Lymphozytenreich
Insgesamt		67	40 (59.7%)	16 (23.9%)	11 (16.4%)
Geschlechts- verteilung		23w, 44m	18w, 22m	3w, 13m	2w, 9m
Mittleres Meldealter		37.3 +/- 15.8	32.8 +/- 13.8	43.8 +/- 15.8	44.2 +/- 17.7
Stadium	1	10 (14.9%)	4	5	1
	2	25 (37.3%)	18	4	3
	3	23 (34.3%)	12	4	7
	4	9 (13.4%)	6	3	0
B-Symptome		30 (44.8%)	17	10	3
Verlauf	Komplette Remission	61 (91%)	37	14	10
	Partiale Remission	6 (9%)	2	2	1
	Rezidiv	25 (37.3%)	17	4	4
	Tod	7 (10.4%)	1	3	3

3.2 Autoantikörperergebnisse

3.2.1 Immunfluoreszenz

Zur initialen Suche nach Autoantikörpern (AK) wurde ein Immunfluoreszenztest durchgeführt. Alle Proben wurden in der Immunfluoreszenz auf folgenden Geweben ausgetestet: Kleinhirn, Hep2-Zellen (humane Epithelzellen) und Darm mit Auerbachplexus. Anhand der Bindungsmuster wurde differenziert, ob es sich um Autoantikörper gegen Neurone, Astrozyten oder andere Strukturen handelt. Ebenfalls wurden Antinukleäre Antikörper (ANA) detektiert. Eine Bindung wurde als neuronal definiert, wenn nur Neuronenstrukturen oder –kerne (z.B. Purkinjezellen und/oder Auerbachplexus) angefärbt wurden, nicht aber Hep2-Zellen.

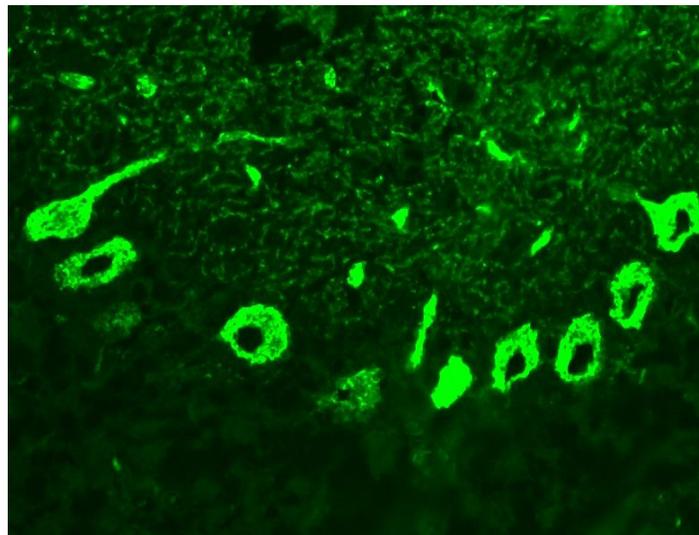


Abbildung 2: Darstellung eines Purkinjezellantikörpers in der Immunfluoreszenz.

Kleinhirnschnitt, Vergrößerung 1:250; Serumverdünnung 1:100

Wurden ausschließlich im Kleinhirn faserige Strukturen angefärbt, so wurde davon ausgegangen, dass es sich dabei um die Myelinscheide der Axone handelt. Dies wurde als anti-Myelin Autoantikörper bezeichnet. Wurden sternförmige Gliazellen des Kleinhirns angefärbt, wurde ein astrozytärer Autoantikörper angenommen.

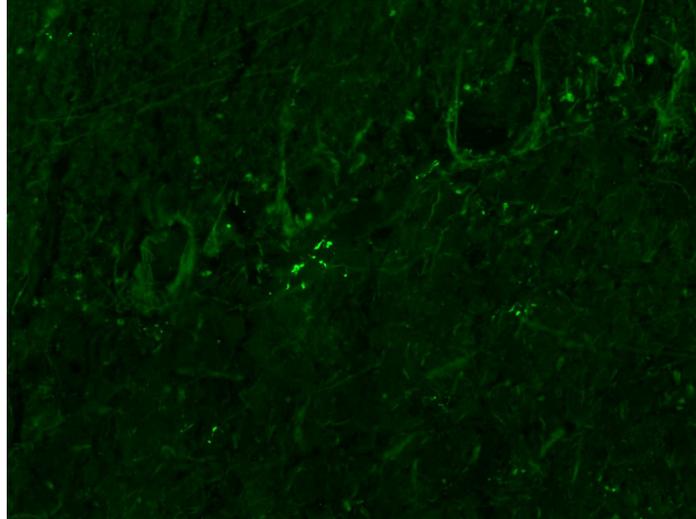


Abbildung 3: Immunfluoreszenzbild mit einer spezifischen Färbung rund um die Purkinjezellen, die Myelinstrukturen entspricht.

Kleinhirnschnitt, Vergrößerung 1:250; Serumverdünnung 1:50

Ein antinukleärer Antikörper (ANA) zeigte sich in einer Kernfluoreszenz aller Zellen. Dieser wurde weiter unterteilt in homogen (der ganze Zellkern war homogen angefärbt), nukleolär (nur der Nukleolus war angefärbt), und zytoplasmatisch (nur das Zytoplasma der Zelle zeigte eine Färbung). Dabei zeigte sich bei fast allen ANA ein Antikörpertiter von 1:80, wurde ein anderer Titer festgestellt, ist dies separat vermerkt.

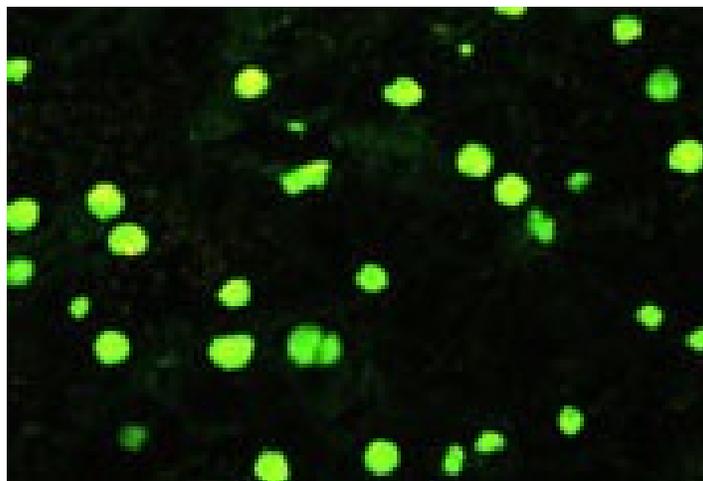


Abbildung 4: Antinukleärer Antikörper (ANA) in der Immunfluoreszenz.

Hep2-Zellen, Vergrößerung 1:250; Serumverdünnung 1:200

3.2.1.1 Ergebnisse der Immunfluoreszenz

Insgesamt zeigt sich bei einer Zusammenfassung von Hodgkin-Gruppe und Hodgkin/Para-Gruppe ein signifikant häufigeres Auftreten von neuronalen Autoantikörpern verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Absolutzahlen belaufen sich dabei auf 10/72 (13.9%) Hodgkin-Patienten zusammen mit Hodgkin/Para-Patienten gegenüber 1/46 (2.2%) Probanden der Kontrollgruppe ($p < 0.05$).

Sonst ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vorkommen der Autoantikörper. In der Hodgkin-Gruppe zeigte sich bei 23/67 (34%) Patienten insgesamt ein Auto-Antikörper. In der Kontrollgruppe waren es prozentual wenig mehr mit 16/46 (34.8%) Probanden. Betrachtet man die Nervensystemspezifischen Antikörper insgesamt, so findet sich in der Hodgkin-Gruppe mit 13/67 (19.4%) Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 4/46 (8.7%) Probanden ein höherer Anteil an Autoantikörper-positiven Ergebnissen (n.s.).

6/67 (9%) Patienten der Hodgkin-Gruppe, jedoch nur ein Proband der Kontroll-Gruppe (1/46; 2.2%) hatten antineuronale Antikörper (n.s.). Von diesen Patienten hatten 3 einen Antikörper gegen Auerbachplexus, 1 Patient einen Antikörper gegen Purkinjezellen und 2 Patienten hatten Antikörper gegen beides, Auerbachplexus und Purkinjezellen. Es zeigten sich bei 6/67 (9%) Patienten der Hodgkin-Gruppe anti-Myelin AK, bei einem Patienten ein astrozytärer AK (1.5%). In der Kontroll-Gruppe wiesen 2/46 (4.3%) Probanden einen anti-Myelin AK auf, es wurde ein astrozytärer AK gefunden (2.2%).

Bei 10/67 (15%) Hodgkin-Patienten wurden ANA detektiert, davon hatten 3 ein homogenes, 4 ein nukleoläres und 2 ein zytoplasmatisches (1x Titer 1/200) Muster. Ein Patient zeigte einen ANA gegen proliferierendes Antigen (Titer 1/400). In der Kontroll-Gruppe fanden sich bei 11/46 (23.9%) Probanden ANA, wovon 8 homogen und 3 nukleolär waren. Damit weisen mehr Probanden der Kontrollgruppe (23.9%) einen ANA auf als Patienten der Hodgkingruppe (15%) (n.s.).

In der Hodgkin/Para-Gruppe fanden sich bei 4 Patienten neuronale Antikörper. Bei Patient 1 mit paraneoplastischer Polyneuropathie fand sich ein Antikörper gegen Purkinjezellkerne mit einem Titer von 1/32. Die Patienten 2 und 3 mit paraneoplastischer Kleinhirndegeneration wiesen beide im Serum Antikörper gegen Purkinjezellzytoplasma auf. Titer bei Patient 2: 1/1000, bei Patient 3: 1/500. Diese

Antikörper konnten als anti-Tr identifiziert werden. Patient 4 zeigte keine Bindung in der Immunfluoreszenz. Bei Patient 5 färbten sich die Purkinje- und Neuronenzellkerne mit einem Titer 1/2000 an.

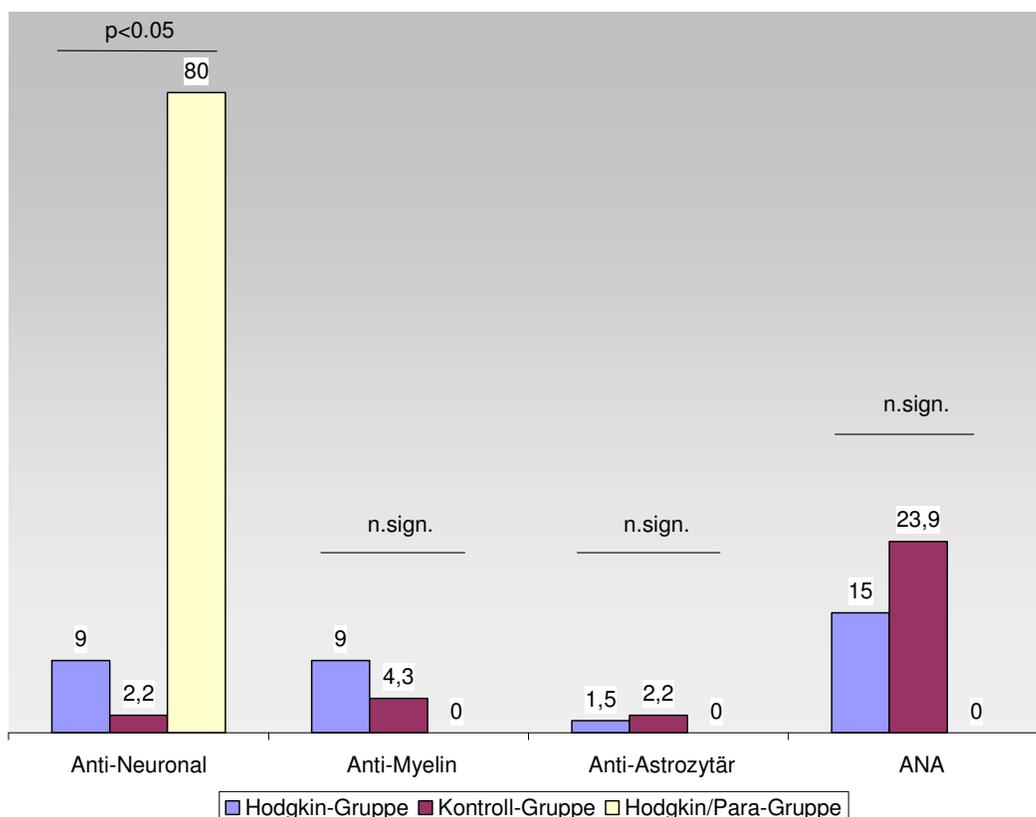


Abbildung 5: Ergebnisse der Immunfluoreszenz.

Blau: Hodgkin-Gruppe; Violett: Kontrollgruppe; Hellgelb: Hodgkin/Para-Gruppe;
 Antikörperergebnisse jeweils unterteilt in Balkengruppierungen; Von links nach rechts: Antineuronaler Antikörper; Anti-Myelin Antikörper, Anti-Astrozytärer Antikörper; Antinukleärer Antikörper (ANA);
 Zahlenangaben über den Balken in %; Signifikanter Unterschied bei den Antineuronalen AK bei einem Vergleich der Hodgkin-Gruppe zusammen mit der Hodgkin/Para-Gruppe gegen die Kontrollgruppe

Um eventuelle Zusammenhänge zwischen epidemiologischen und klinischen Daten und dem Vorhandensein von Antikörpern festzustellen, wurden die Gruppen bezüglich verschiedener Kriterien verglichen.

Es wurden insgesamt bei allen Hodgkin-Patienten mehrere verschiedene Therapieprotokolle durchgeführt. Aufgrund der jeweils zu geringen Fallzahlen konnte ein möglicher Einfluss auf die Ergebnisse statistisch nicht berechnet werden. Daher werden die einzelnen Therapieregimes in den folgenden Tabellen nicht aufgeführt.

3.2.1.2 Vergleich der neuronalen Antikörper-positiven und -negativen Hodgkin-Patienten (Hodgkin-Gruppe)

Es konnte bezüglich der B-Symptomatik ein signifikanter Unterschied festgestellt werden: Bei den Hodgkin-Patienten mit neuronalem Antikörper wies keiner eine B-Symptomatik auf, während bei 30/61 (49%) Hodgkin-Patienten ohne neuronalem Antikörper eine B-Symptomatik vorhanden war.

In Bezug der anderen Kriterien gab es keine signifikanten Unterschiede. Insbesondere zeigte sich kein Unterschied in den Gruppen bezüglich Rezidivhäufigkeit und Erreichen einer Remission (Tab.10).

Tabelle 10: Unterschiede der aus Immunfluoreszenz antineuronalen Antikörper-positiven und -negativen Hodgkin-Patienten

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		Anti-neuronal+ Hodgkin-Gruppe	Anti-neuronal- Hodgkin-Gruppe	p
Anzahl n		6	61	
Alter		31.5 ± 14.7	37.8 ± 15.8	
Geschlecht		4w, 2m	19w, 42m	n.s.
Tumorstadium				n.s.
	1	1 (16.7%)	9 (14.8%)	
	2	1 (16.7%)	24 (39.3%)	
	3	3 (50%)	20 (32.8%)	
	4	1 (16.7%)	8 (13.1%)	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	5 (83.3%)	35 (57.4%)	
	MZ	1 (16.7%)	15 (24.6%)	
	LR	0	11 (18%)	
B-Symptome		0	30 (49.2%)	<0.05
Kompl. Remission		6 (100%)	55 (90.2%)	n.s.
Partiale Remission		0	6 (9.8)	n.s.
Rezidivhäufigkeit		2 (33.3%)	23 (37.7%)	n.s.
Tod		0	7 (11.5%)	n.s.

3.2.1.3 Vergleich der Antineuronal-positiven Hodgkin-Patienten (Hodgkin-Gruppe) zusammen mit der Hodgkin/Para-Gruppe gegen die Antineuronal-negativen Hodgkin-Patienten (Hodgkin-Gruppe)

In diesem Vergleich wurden die Gruppe der Antineuronal-positiven Hodgkinpatienten und die Hodgkin/Para-Gruppe zusammengefasst, um mit einer höheren Patientenanzahl einen neuen Vergleich aufzustellen. In der Hodgkin/Para-Gruppe wiesen 4 Patienten ebenfalls einen antineuronalen Antikörper auf. Es ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede (Tab.11).

Tabelle 11: Unterschiede der aus Immunfluoreszenz antineuronalen Antikörper-positiven Hodgkinpatienten mit Hodgkin/Para-Patienten und der -negativen Hodgkin-Patienten

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		Anti-neuronal+ mit Hodgkin/Para	Anti-neuronal- Hodgkin-Gruppe	p
Anzahl n		11	61	
Alter		32.5 ± 12.9	37.8 ± 15.8	
Geschlecht		5w, 6m	19w, 42m	n.s.
Tumorstadium				n.s.
	1	1 (9.1%)	9 (14.8%)	
	2	3 (27.3%)	24 (39.3%)	
	3	6 (54.5%)	20 (32.8%)	
	4	1 (9.1%)	8 (13.1%)	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	7 (63.6%)	35 (57.4%)	
	MZ	2 (18.2%)	15 (24.6%)	
	LR	2 (18.2%)	11 (18%)	
B-Symptome		4 (36.4%)	30 (49.2%)	n.s.
Kompl. Remission		11 (100.0%)	55 (90.2%)	n.s.
Partiale Remission		0	6 (9.8%)	n.s.
Rezidivhäufigkeit		2 (18.2%)	23 (37.7%)	n.s.
Tod		0	7 (11.5%)	n.s.

3.2.1.4 Vergleich der Neuronal-positiven Hodgkinpatienten (Hodgkin-Gruppe) und der Hodgkin/Para-Gruppe

Vergleicht man die neuronal-positiven Hodgkinpatienten mit den Patienten der Hodgkin/Para-Gruppe, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der B-Symptome (Antineuronal-positive Hodgkin-Gruppe 0/6, Hodgkin/Para-Gruppe 4/5, $p < 0.01$, Tab.12).

Tabelle 12: Unterschiede der aus Immunfluoreszenz Neuronal-positiven Hodgkinpatienten und der Hodgkinpatienten mit Paraneoplast. Neurol. Syndrom

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		Anti-neuronal+ Hodgkin-Gruppe	Hodgkin/Para	p
Anzahl n		6	5	
Alter		31.5 ± 14.7	33.8 ± 11.9	
Geschlecht		4w, 2m	1w, 4m	n.s.
Tumorstadium				n.s.
	1	1 (16.7%)	0	
	2	1 (16.7%)	2 (40.0%)	
	3	3 (50.0%)	3 (60.0%)	
	4	1 (16.7%)	0	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	5 (83.3%)	2 (40.0%)	
	MZ	1 (16.7%)	1 (20.0%)	
	LR	0	2 (40.0%)	
B-Symptome		0	4 (80.0%)	<0.01
Kompl. Remission		6 (100.0%)	5 (100.0%)	
Partiale Remission		0	0	
Rezidivhäufigkeit		2 (33.3%)	0	n.s.
Tod		0	0	

3.2.1.5 Vergleich der ANA-positiven und -negativen Hodgkinpatienten

Auch hinsichtlich der antinukleären Antikörper wurde ein Vergleich durchgeführt, wozu die Hodgkin-Gruppe in ANA-positive und ANA-negative Patienten geteilt wurde. Dabei zeigt sich bezüglich der Tumorstadienverteilung ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$). Bei den ANA-positiven findet sich kein Patient im Tumorstadium 2, bei den ANA-negativen 44% (25/57) (Tab.13). Bei einem Vergleich der beiden Gruppen bezüglich der günstigen Tumorstadien 1+2 zusammengenommen gegenüber den eher ungünstigen Tumorstadien 3+4 ergibt sich allerdings kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 13: Unterschiede der ANA-positiven und -negativen Hodgkinpatienten

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		ANA +	ANA -	p
Anzahl n		10	57	
Alter		49.2 ± 16.6	35.2 ± 14.7	
Geschlecht		4w, 6m	19w, 38m	n.s.
Tumorstadium				<0.05
	1	3 (30.0%)	7 (12.3%)	
	2	0	25 (43.9%)	
	3	4 (40.0%)	19 (33.3%)	
	4	3 (30.0%)	6 (10.5%)	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	6 (60.0%)	34 (59.6%)	
	MZ	2 (20.0%)	14 (24.6%)	
	LR	2 (20.0%)	9 (15.8%)	
B-Symptome		4 (40.0%)	26 (45.6%)	n.s.
Kompl. Remission		8 (80.0%)	53 (93.0%)	n.s.
Partiale Remission		2 (20.0%)	4 (7.0%)	n.s.
Rezidivhäufigkeit		4 (40.0%)	21 (36.8%)	n.s.
Tod		2 (20.0%)	5 (8.8%)	n.s.

3.2.1.6. Vergleich der Hodgkinpatienten mit anti-Myelin AK gegen Hodgkinpatienten ohne anti-Myelin AK

Wird die Hodgkin-Gruppe in anti-Myelin –positiv und –negativ geteilt und diese beiden Gruppen miteinander verglichen, so findet sich bezüglich der Geschlechtsverteilung ein signifikanter Unterschied (anti-Myelin-positive 5w/1m, anti-Myelin-negative 18w/43m, $p < 0.05$, Tab.15). Die anderen Kriterien zeigten im Vergleich keinen signifikanten Unterschied (Tab. 14).

Tabelle 14: Unterschiede zwischen anti-Myelin –positiven und –negativen Hodgkinpatienten

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		Anti-Myelin +	Anti-Myelin -	P
Anzahl n		6	61	
Alter		42 ± 16.6	36.8 ± 15.7	
Geschlecht		5w, 1m	18w, 43m	<0.05
Tumorstadium				n.s.
	1	1 (16.6%)	9 (15.8%)	
	2	3 (50.0%)	22 (38.6%)	
	3	2 (33.3%)	21 (36.8%)	
	4	0	9 (15.8%)	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	4 (66.6%)	36 (63.2%)	
	MZ	1 (16.6%)	15 (26.3%)	
	LR	1 (16.6%)	10 (17.5%)	
B-Symptome		2 (33.3%)	28 (49.1%)	n.s.
Kompl. Remission		6 (100.0%)	55 (96.5%)	n.s.
Partiale Remission		0	6 (10.5%)	n.s.
Rezidivhäufigkeit		2 (33.3%)	23 (40.4%)	n.s.
Tod		0	7 (12.3%)	n.s.

3.2.1.7 Vergleich aller Antikörper-positiven Hodgkinpatienten gegen Antikörper-negative Hodgkinpatienten (Hodgkin-Gruppe)

Werden sämtliche Antikörper-positiven Hodgkin-Patienten (anti-Neuronal, anti-Myelin, anti-Astrozytär, ANA) gegen die Antikörper-negativen verglichen, so ergibt sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Geschlechtsverteilung (Antikörper-positiv 13w/10m, Antikörper-negativ 10w/34m, $p < 0.01$, Tab.15). Bezüglich der übrigen Kriterien zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Table 15: Unterschiede der aus Immunfluoreszenz AK-positiven Hodgkinpatienten gegen AK-negativen Hodgkinpatienten

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		Antikörper +	Antikörper -	p
Anzahl n		23	44	
Alter		42.2 ± 16.6	34.7 ± 14.8	
Geschlecht		13w, 10m	10w, 34m	<0.01
Tumorstadium				n.s.
	1	6 (26.1%)	4 (9.1%)	
	2	4 (17.4%)	21 (47.7%)	
	3	9 (39.1%)	14 (31.8%)	
	4	4 (17.4%)	5 (11.4%)	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	15 (65.2%)	25 (56.8%)	
	MZ	5 (21.7%)	11 (25.0%)	
	LR	3 (13.0%)	8 (18.2%)	
B-Symptome		6 (26.1%)	24 (54.5%)	n.s.
Kompl. Remission		21 (91.3%)	40 (90.9%)	n.s.
Partiale Remission		2 (8.7%)	4 (9.1%)	n.s.
Rezidivhäufigkeit		8 (34.8%)	17 (38.6%)	n.s.
Tod		2 (8.7%)	5 (11.4%)	n.s.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Um Antikörper gegen Oberflächenautoantigene zu messen, wurde die Durchflusszytometrie (FACS) eingesetzt. Es wurden alle Proben mit Zellen der SKN-SH Zelllinie und der HEK-293 Zelllinie inkubiert und im Durchflusszytometer die Fluoreszenz und damit die Bindung gemessen.

Die Auswertung nach oben beschriebenem Verfahren (2.2.2.3) zeigte für jeden Patienten ein Ergebnis als positive oder negative Bindung durch Vergleich der Fluoreszenzstärke (Abb. 6).

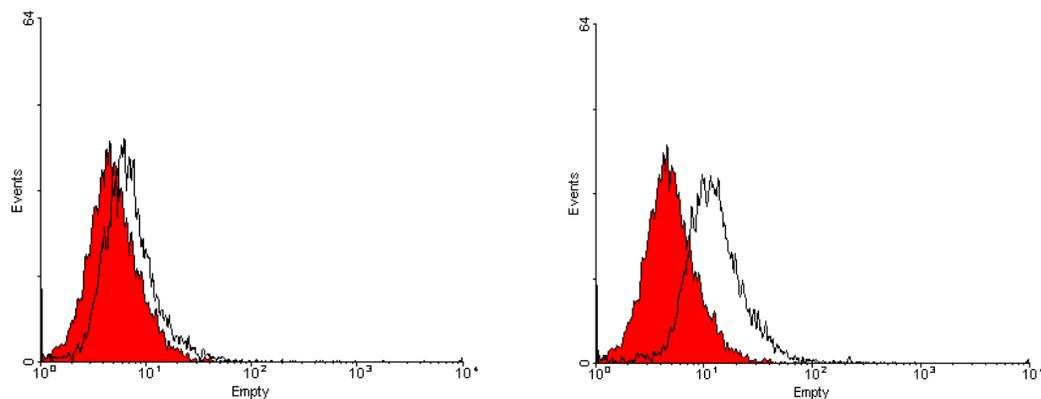


Abbildung 6: FACS-Messung; Vergleich Negativpatient - Positivpatient.

X-Achse: Fluoreszenzstärke der einzelnen Zellen; Y-Achse: Anzahl der gemessenen Zellen. Linkes Bild: Negativkontrolle (rot) überlagert mit dem Ergebnis eines Negativpatienten (weiß); Rechtes Bild: Negativkontrolle (rot) überlagert mit dem Ergebnis eines Positivpatienten (weiß)

Dabei wurde eine gleichzeitige Bindung an SKN-SH und HEK-293 als Antikörper gegen ubiquitäre Autoantigene interpretiert. Waren nur Bindungen an SKN-SH vorhanden, so wurde eine neuronal-spezifische Bindung angenommen.

3.2.2.1 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie zeigt sich im Vergleich der Hodgkin-Patienten mit der Kontroll-Gruppe ein signifikanter Unterschied bezüglich der Autoantikörper gegen ubiquitäre Autoantigene. 20/67 (29.9%) Hodgkin-Patienten und 4/46 (8.7%) der Kontrollen weisen Autoantikörper gegen ubiquitäre Autoantigene auf ($p < 0.01$, Abb.7).

Bei 15/67 (22.4%) der Hodgkin-Patienten und bei 5/46 (10.9%) der Kontrollen waren neuronale Oberflächenbindungen festzustellen (n.s.). Von den 6 Patienten, die in der Immunfluoreszenz neuronale Bindungen aufwiesen, zeigten im FACS 2 Patienten Autoantikörper gegen ubiquitäre Autoantigene (Immunfluoreszenz: 1 nur Auerbach pos., 1 Auerbach+Purkinjezell pos.) und 1 Patient einen neuronalen Antikörper (Immunfluoreszenz: Auerbach+Purkinjezell pos.). Die anderen 3 Patienten, in der Immunfluoreszenz neuronal positiv, zeigten im FACS kein erhöhtes Bindungsverhalten. Die 5 Patienten mit M. Hodgkin und PNS wurden nicht gemessen.

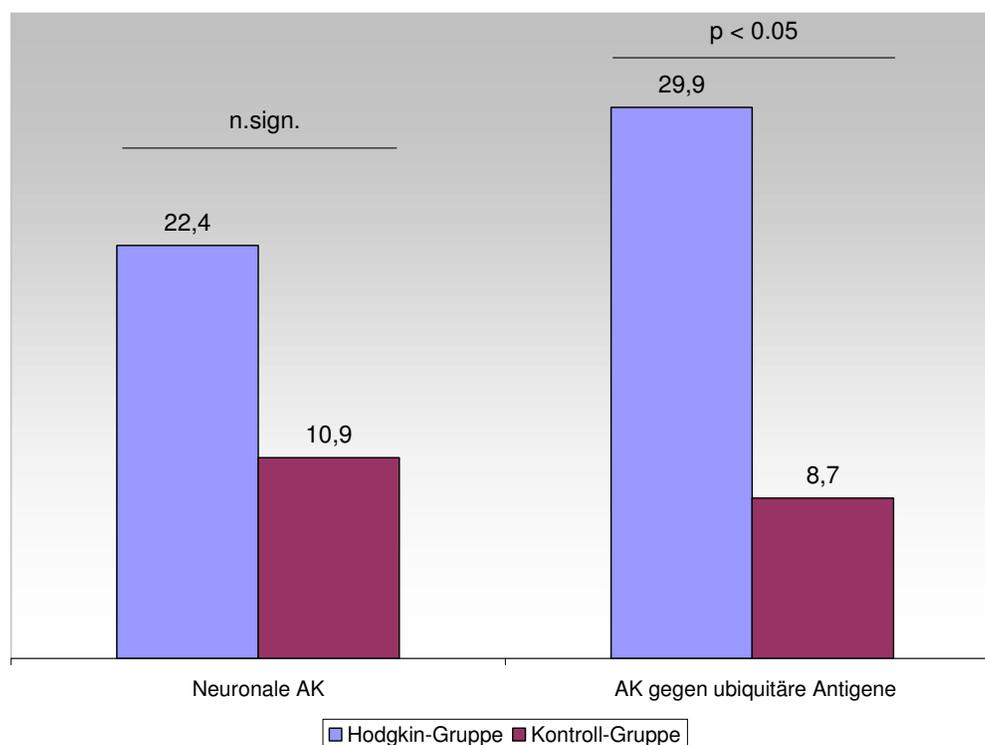


Abbildung 7: Ergebnisse der Durchflußzytometrie.

Blau: Hodgkin-Gruppe; Violett: Kontrollgruppe; Links: Ergebnisse der neuronalen Oberflächenantikörper, Rechts: Ergebnisse der AK gegen ubiquitäre Oberflächenantigene; Zahlenangaben über den Balken in %; Signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der AK gegen ubiquitäre Antigene

Auch bezüglich der FACS-Tests wurden Vergleiche durchgeführt, um eventuelle Zusammenhänge zwischen vorhandenen Antikörpern und epidemiologischen, bzw. klinischen Daten festzustellen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede

zwischen den jeweils anti-Neuronal –positiven und –negativen Hodgkinpatienten und den Hodgkin-Patienten ohne und mit AK gegen ubiquitäre Antigene.

3.2.2.2 Vergleich FACS Neuronal-positiver und -negativer Hodgkinpatienten

Die Patienten mit neuronaler Reaktivität wurden mit den Patienten mit keiner bzw. einer Reaktivität gegen ubiquitäre Autoantigene verglichen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich epidemiologischer oder onkologischer Parameter (Tab. 16).

Tabelle 16: Unterschiede zwischen FACS Neuronal –positiven und –negativen Hodgkinpatienten

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		FACS neuronal+	FACS neuronal-/ ubiquitär	p
Anzahl n		15	52	
Alter		38.2 ± 15.5	37 ± 15.9	
Geschlecht		4w, 11m	19w, 33m	n.s.
Tumorstadium				n.s.
	1	2 (13.3%)	8 (15.4%)	
	2	5 (33.3%)	20 (38.5%)	
	3	7 (46.7%)	16 (30.8%)	
	4	1 (6.7%)	8 (15.4%)	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	11 (73.3%)	29 (55.8%)	
	MZ	3 (20.0%)	13 (25.0%)	
	LR	1 (6.7%)	10 (19.2%)	
B-Symptome		6 (40.0%)	24 (46.2%)	n.s.
Kompl. Remission		13 (86.7%)	48 (92.3%)	n.s.
Partiale Remission		2 (13.2%)	4 (7.7%)	n.s.
Rezidivhäufigkeit		4 (26.7%)	21 (40.4%)	n.s.
Tod		2 (13.3%)	5 (9.6%)	n.s.

3.2.3 Western Blot

Um Antikörper weiter spezifizieren zu können, wurde der Western Blot-Versuch durchgeführt. Im Western Blot wurden die Patientenseren mit den aufgetrennten Proteinen aus verschiedenen Geweben bzw. Zellen inkubiert. Es wurden Kleinhirn, SKN-SH Zellen, Auerbachplexus und HEK-293 Zellen aufgetrennt und mit Patientenserum inkubiert. Zeigte sich eine Bande, wurde dem Serum eine Reaktivität gegen ein Protein des entsprechenden Gewebes zugeschrieben. Das Molekulargewicht des Proteins in kD konnte dabei angegeben werden (Abb. 8).

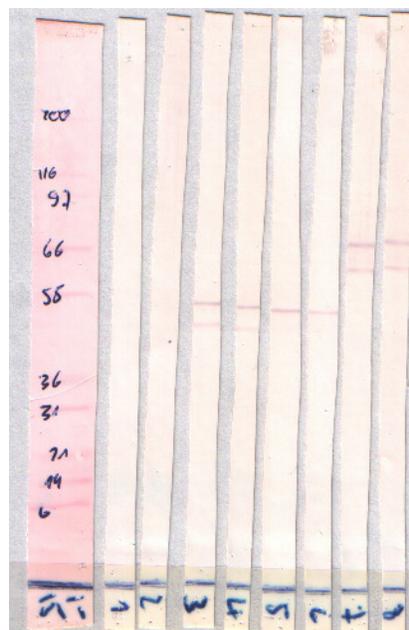


Abbildung 8: Darstellung von Banden im Western Blot mit dazugehörigem Standardstreifen.

Streifen links: Standardstreifen mit Banden von bekanntem Molekulargewicht in kD zum Vergleich; Streifen 1-8: ausgetestete Streifen. Bei Streifen 3-6 sichtbare Bande im Bereich 51 kD, Streifen 3+4 zusätzlich mit Bande im Bereich 47 kD, Streifen 7+8 je mit Banden im Bereich 60 und 66 kD.

Auf der Kleinhirnprobe und den SKN-SH Zellen wurden alle 67 Hodgkinpatientenseren ausgetestet. Auf den HEK-293 Zellen wurden nur die Seren ausgetestet, welche im Western Blot des Kleinhirns oder der SKN-SH Zellen Banden gezeigt hatten. Somit wurde unterschieden, ob es sich um neuronale oder unspezifische Bindungen handelt. Zeigte sich die gleiche Bande wie zuvor im Kleinhirn- oder SKN-SH-Blot auch im HEK-293-Blot, wurde dies als unspezifische

Bindung gewertet. Zeigte sich keine Bande im HEK-293-Blot, wurde die Bande des Kleinhirn- oder SKN-SH-Blot als antineuronale Bindung gewertet.

Auf Auerbachplexus wurden nur die Proben getestet, die im indirekten Immunfluoreszenztest Bindungen an den Auerbachplexus gezeigt hatten.

Eine stark gefärbte Bande wurde als starke Serumreaktivität interpretiert, weniger stark gefärbte Banden als mittlere Serumreaktivität (Auswertung mit GelScan-Software). Sehr schwache Banden wurden nicht gewertet.

3.2.3.1 Western Blot Ergebnisse

Im Western Blot mit Kleinhirnantigenen konnten bei 15/67 (22.4%) Hodgkin-Patienten Reaktivitäten gezählt werden, im Western Blot der SKN-SH Zellen bei 5/67 (7.5%) Patienten. Im Blot des Auerbachplexus und der HEK-293 Zellen wurden, wie oben beschrieben, nicht alle Seren ausgetestet. Im Auerbachplexus-Blot fanden sich bei 3/7 Patienten und im HEK-293-Blot bei 11/39 Patienten Reaktivitäten.

Durch den Vergleich der Bandenmuster der neuronalen Gewebe mit den HEK-293 Zellen wurden Reaktionen gegen ubiquitäre Autoantigene erkannt und eliminiert. Es wurden hierbei Banden, die z.B. im Kleinhirn-Blot und im HEK-293-Blot mit gleichem Molekulargewicht vorhanden waren, nicht gewertet.

Es konnten bei 17/67 (25.4%) Hodgkin-Patienten und 6/46 (13.0%) Kontrollen neuronal spezifische Bindungen im Western Blot gezählt werden (n.s.). Bei den Hodgkin-Patienten konnten diese in 10/67 (14.9%) gegen Proteine des Kleinhirns, 1/67 (1.5%) gegen SKN-SH Zellen und 3/67 (4.5%) gegen Auerbachplexus unterteilt werden. 3/67 (4.5%) Patienten reagierten gleichzeitig gegen Kleinhirn und SKN-SH Zellen, mit unterschiedlichen Banden.

Bei einem Vergleich der Bandenmuster zeigten sich gemeinsame Reaktivitäten bei verschiedenen Patienten.

Es fand sich bei 9 Patienten eine identische Bande im Bereich um 53kD. Diese zeigte sich in den verschiedenen Blots bei 6 Patienten im Kleinhirn-Blot, bei 1

Patienten im SKN-SH-Blot, bei 1 Patienten im Auerbach-Blot und bei 1 Patienten gleichzeitig im Kleinhirn und SKN-SH-Blot

Bei einem Vergleich der Hodgkin-Patienten insgesamt mit 53kD-Reaktivität mit den Hodgkin-Patienten ohne 53kD-Reaktivität zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Tab. 17).

Tabelle 17: Unterschiede zwischen Hodgkin-Patienten mit 53-kD-Reaktivität und Hodgkin-Patienten ohne 53kD-Reaktivität im Western Blot

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		Hodgkin-Patienten mit 53kD-Reaktivität	Hodgkin-Patienten ohne 53kD-Reaktivität	p
Anzahl n		9	58	
Alter		27.1 ± 15.2	38.8 ± 15.3	
Geschlecht		3w, 6m	20w, 38m	n.s.
Tumorstadium				n.s.
	1	2 (22.2%)	8 (13.8%)	
	2	1 (11.1%)	24 (41.4%)	
	3	4 (44.4%)	19 (32.8%)	
	4	2 (22.2%)	7 (12.1%)	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	7 (77.8%)	33 (56.9%)	
	MZ	0 (0%)	16 (27.6%)	
	LR	2 (22.2%)	9 (15.5%)	
B-Symptome		5 (55.6%)	25 (43.1%)	n.s.
Kompl. Remission		8 (88.9%)	53 (91.4%)	n.s.
Partiale Remission		1 (11.1%)	5 (8.6%)	n.s.
Rezidivhäufigkeit		3 (33.3%)	21 (36.2%)	n.s.
Tod		0 (0%)	7 (12.1%)	n.s.

3.2.3.2 Vergleich der Ergebnisse aus Western Blot und Immunfluoreszenz

6 Patienten waren in der Immunfluoreszenz neuronal positiv. Von den 3 Patienten mit Bindung an Auerbachplexus zeigte sich bei einem Patienten eine Bande bei 19 kD im Auerbach-Blot. Die anderen beiden Patienten zeigten keine Reaktivitäten im Western Blot.

Die 2 Patienten mit Bindung an Auerbachplexus und Purkinjezellzytoplasma in der Immunfluoreszenz zeigten auch eine Reaktivität im Western Blot. Davon wies der eine Patient eine Bindung im Kleinhirn-Blot an ein 49 kD Protein auf, der andere eine Bindung im Auerbach-Blot an ein 19 kD Protein.

Der Patient mit alleiniger Bindung an Purkinjezellzytoplasma zeigte keine Bindungen im Western Blot.

Die 6 Patienten mit Myelinstrukturen in der Immunfluoreszenz zeigten keine Reaktivitäten im Western Blot. Ein negatives Resultat zeigte ebenso der Patient mit astrozytärem Antikörper.

In der Auswertung der Patienten mit 53 kD-Reaktivität im Western Blot zeigten davon in der Immunfluoreszenz 3 Patienten eine Bindung. Ein Patient wies einen neuronalen Antikörper gegen Purkinjezellzytoplasma und Auerbachplexus auf, ein Patient einen homogenen ANA und ein Patient einen nukleolären ANA.

Insgesamt fand sich also keine eindeutige Assoziation zwischen einem bestimmten immunhistochemischen Bindungsmuster und einer definierten Reaktivität im Western Blot.

3.2.3.3 Vergleich aller antineuronal AK-positiven (Immunfluoreszenz, WesternBlot und FACS) gegen antineuronal AK-negative Hodgkin-Patienten

Zum Vergleich wurden die Patienten mit neuronalen Reaktivitäten in Immunfluoreszenz, Western Blot und FACS zusammengenommen und den neuronal-negativen Patienten in diesen Untersuchungen gegenübergestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (Tab. 18)

Tabelle 18: Unterschiede aller antineuronalen AK-positiven aus Immunfluoreszenz, WesternBlot und FACS gegen die -negativen Hodgkin-Patienten

NS: nodulär sklerosierend; MZ: mischzellig; LR: lymphozytenreich

Kriterium		Neur+ in ICH und WB und FACS	Neur- in ICH und WB und FACS	p
Anzahl n		30	37	
Alter		32.4 ± 14.2	41.2 ± 16	
Geschlecht		11w, 19m	12w, 25m	n.s.
Tumorstadium				n.s.
	1	4 (13.3%)	6 (16.2%)	
	2	10 (33.3%)	15 (40.5%)	
	3	12 (40%)	11 (29.7%)	
	4	4 (13.3%)	5 (13.5%)	
Hodgkin-Subtyp				n.s.
	NS	22 (73.3%)	18 (48.6%)	
	MZ	5 (16.7%)	11 (29.7%)	
	LR	3 (10%)	8 (21.6%)	
B-Symptome		12 (40%)	18 (48.6%)	n.s.
Kompl. Remission		27 (90%)	34 (91.9%)	n.s.
Partiale Remission		3 (10%)	3 (8.1%)	n.s.
Rezidivhäufigkeit		12 (40%)	13 (35.1%)	n.s.
Tod		2 (6.7%)	4 (10.8%)	n.s.

4. Diskussion

4.1 Antineuronale Autoantikörper bei PNS

Zu paraneoplastischen neurologischen Syndromen (PNS) konnten in den vergangenen Jahren viele neue Erkenntnisse gewonnen werden. Die Syndrome können das gesamte Nervensystem betreffen und werden danach in zentrale, periphere, neuromuskuläre oder autonome PNS unterteilt. Die Arbeitsgruppe um Graus hat 2004 eine Übersicht zusammengestellt, in der klassische und nicht-klassische PNS unterschieden werden und Kriterien zu deren Diagnose festgelegt sind (Graus et al. 2004). Bei diesen Kriterien werden antineuronale Autoantikörper, der zugrundeliegende Tumor und das neurologische Krankheitsbild zur Diagnosefindung herangezogen. Dabei können verschiedene Fallkombinationen die Diagnose eines sicheren PNS bewirken, wie zum Beispiel ein klassisches neurologisches Syndrom in Zusammenhang mit einem Tumor, der innerhalb von 5 Jahren in Erscheinung tritt. Hierbei ist die Diagnose unabhängig von vorhandenen Autoantikörpern möglich. Zur gleichen Diagnose kommt es aber auch, wenn ein klassisches neurologisches Syndrom in Zusammenhang mit einem gut charakterisierten onkoneuronalen Antikörper ohne bisher bekanntem Tumor auftritt. Die Autoantikörper sind zum einen zur Diagnose eines paraneoplastischen neurologischen Syndroms notwendig, andererseits aber auch zur Tumordiagnose, falls dieser noch nicht in Erscheinung getreten ist. Von den verschiedenen bekannten Autoantikörpern sind manche mit einem bestimmten Tumor assoziiert (siehe Tab. 5). In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass ein bestimmter antineuronaler Autoantikörper auf einen bestimmten zugrundeliegenden Tumor schließen lässt, mehr noch, als auf das assoziierte PNS (Jaeckle et al. 1985, Dalmau et al. 1996, Bataller et al. 2001, Graus et al. 2001). Zum Beispiel ist der anti-Hu Antikörper assoziiert mit neuro-endokrin differenzierten Tumoren, meistens (>90%) handelt es sich um ein kleinzelliges Bronchialkarzinom (Dalmau et al. 1992, Graus et al. 2001). Anti-Hu ist der insgesamt am häufigsten gefundene PNS-Antikörper und tritt meist in Zusammenhang mit einer Subakuten Sensorischen Neuropathie oder paraneoplastischen Enzephalomyelitis auf (Graus et al. 2001, Sillevs Smitt et al. 2002). Im Zusammenhang mit paraneoplastischer Kleinhirndegeneration werden am häufigsten Yo-Antikörper gefunden. Die zugrundeliegenden Tumore sind

gynäkologischen Ursprungs, meist ein Ovarial- oder Mammakarzinom (Jaeckle et al. 1985, Altermatt et al. 1991). Für anti-Tr konnte eine Kombination von M. Hodgkin mit begleitender Kleinhirndegeneration als charakteristisch nachgewiesen werden (Graus et al. 1997b, Bernal et al. 2003). Wurde bereits die Diagnose eines PNS ohne bekannten Autoantikörper gestellt, kann im Rahmen von Screeninguntersuchungen zusätzlich eine Autoantikörpersuche durchgeführt werden. Wird ein gut charakterisierter Autoantikörper (Graus et al. 2004) gefunden, kann die Diagnose bestätigt werden. Andere gefundene Autoantikörper, die in Immunfluoreszenz und Western Blot eine spezifische neuronale Bindung aufweisen, können nicht unbedingt nach bekannten Mustern spezifiziert werden. Diese Antikörper werden als „atypischer antineuronaler Antikörper“ bezeichnet. Auch werden bei über einem Drittel der Patienten keine Antikörper gefunden (Graus et al. 2004).

Abgesehen vom diagnostischen Nutzen sind antineuronale Autoantikörper auch von prognostischer Bedeutung. Bezüglich der Prognose von Tumoren konnte in verschiedenen Studien bewiesen werden, dass ein Patient mit Autoantikörpern einen prognostischen Vorteil gegenüber einem Patienten ohne Autoantikörper besitzt (Graus et al. 1997a, Blaes et al. 2000). Dabei wird nicht unterschieden, ob der Antikörper in hoher Titerkonzentration vorliegt oder nicht. Ein Unterschied bezüglich des Antikörpertiters fand sich allerdings in der Tatsache des Auftretens eines PNS. So wurde bei Patienten mit niedriger Titerkonzentration eine bessere Prognose, aber kein begleitendes paraneoplastisches Syndrom festgestellt. Bei den Patienten mit hoher Antikörper-Titerkonzentration ging die Tumorerkrankung dabei mit einer begleitenden Paraneoplasie einher (Dalmau et al. 1990, Graus et al. 1997a, Posner/Dalmau 2000).

4.2 Antineuronale Autoantikörper bei M. Hodgkin

In Zusammenhang mit M. Hodgkin wurden verschiedene paraneoplastische Syndrome beschrieben. Insgesamt selten vorkommend, findet sich als häufigstes Syndrom die Kleinhirndegeneration (Hammack 1992, Dalmau/Posner 1996). In dieser Kombination konnte ein bestimmter Autoantikörper – anti-Tr – charakterisiert werden (Graus et al. 1997b, 1998; Bernal et al. 2003). Dieser Autoantikörper bindet immunhistochemisch an Purkinjezellzytoplasma, während im Western Blot des

Kleinhirns keine Banden angefärbt werden. In mehreren Studien fand sich bei Hodgkin-Patienten mit cerebellären Störungen dieser Autoantikörper (Graus et al. 1997b, 1998, Bataller et al. 2003, Bernal et al. 2003). Somit wird der anti-Tr-Antikörper als typisch für Hodgkin-Patienten angesehen und wurde noch nie in Zusammenhang mit einem anderen Neoplasma gefunden. Als weitere Autoantikörper bei M. Hodgkin und PCD wurden anti-GluR1-Antikörper und anti-MAZ Antikörper (Myc-associated zinc-finger protein) beschrieben (Sillevis Smitt et al. 2000, Bataller et al. 2003, Shams'ili et al. 2003). Ebenfalls gibt es Berichte über atypische antineuronale Antikörper bei Hodgkin-Patienten im Zusammenhang mit verschiedensten paraneoplastischen neurologischen Syndromen (Chorea, PCD, Stiff-man-Syndrom) (Ferrari et al. 1990, Batchelor et al. 1998, Hahn et al. 2000).

In dieser Untersuchung fanden sich unter den Hodgkin-Patienten mit PNS bei 4 von 5 Patienten Autoantikörper gegen neuronale Strukturen (3 Patienten hatten eine PCD, ein Patient eine limbische Enzephalitis und ein Patient eine sensomotorische Polyneuropathie). 2 von 3 Patienten mit PCD wiesen auch in der vorliegenden Untersuchung den anti-Tr-Antikörper auf. Bei dem dritten Patienten fand sich kein Antikörper. Über eine limbische Enzephalitis als PNS bei M. Hodgkin gibt es bereits Berichte (Deodhare et al. 1996, Kung et al. 2002), bei diesen Patienten konnten allerdings keine Antikörper detektiert werden. Bei dem Patienten dieser Studie zeigte sich im Serum ein Antikörper gegen ein 50-60 kD Protein im Kleinhirn-Blot und in der Immunfluoreszenz eine Bindung gegen Purkinjezell- und Neuronenkerne. Dieses Muster ist zu keinem der bekannten Autoantikörper zutreffend, so dass der Antikörper als atypisch gewertet wurde. Bei dem Patienten dieser Untersuchung mit sensomotorischer Polyneuropathie als PNS konnte ebenfalls ein Autoantikörper dargestellt werden. Fallbeispiele über eine sensomotorische Polyneuropathie assoziiert mit M. Hodgkin wurden bereits publiziert (Plante-Bordeneuve et al. 1994, Lahrmann et al. 2001). Diese Patienten wiesen klinische Parameter einer sensorischen Polyneuropathie mit motorischen Symptomen auf. Es wurden dabei keine Autoantikörper gefunden. Auch in anderen Berichten über M. Hodgkin-assoziierte Polyneuropathien anderer Arten wurden keine Autoantikörper gefunden (Horwich et al. 1977, Lieshout et al. 1986, Younger et al. 1991, Van, Turner et al. 1993, Maslovsky et al. 2001, Oh et al. 2004). Es zeigte sich bei unserem Patienten mit sensomotorischer PNP als einziger bisher bekannter Fall ein Autoantikörper.

Dieser bindet im Kleinhirn Blot gegen ein 38 kD Protein und in der Immunfluoreszenz gegen Purkinjezellkerne. Diese Kombination trifft für den Hu-Antikörper zu. Im ImmunBlot mit rekombinatem HuD-Antigen trat allerdings keine Bindung auf, womit ein Hu-Antikörper ausgeschlossen wurde. Der Antikörper wurde somit ebenfalls als atypisch bezeichnet. Ein ähnlicher AK fand sich allerdings in einer Studie bei einigen Patienten mit Sjögren's Syndrom und sensorischer Neuropathie. Auch hier wurde ein Antikörper mit Bindung an ein 38-40 kD cerebelläres Protein, der nicht an HuD bindet, gefunden (Sillevis-Smitt et al. 1996).

Bisherige Untersuchungen in der Literatur zu Autoantikörpern bei M. Hodgkin fanden nur im Zusammenhang mit vorhandener Paraneoplasie statt. Eine Untersuchung nach Autoantikörpern bei Hodgkin-Patienten ohne klinisch-neurologische Auffälligkeit wurde einzig in einer Studie beschrieben, in der Antikörper über das enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gegen verschiedene Zellbestandteile gesucht wurden. Dabei konnten bei 4/84 Hodgkin-Patienten Autoantikörper gegen ssDNA (Einzelstrang-DNA) nachgewiesen werden. Ebenso gab es einen signifikanten Unterschied bezüglich der Antikörper anti-RNP und anti-Sm (ribonukleare Protein-Antigene) zwischen Hodgkin-Patienten und Kontrollen (Swissa et al. 1992).

Eine Untersuchung nach Autoantikörpern bei Hodgkin-Patienten anhand von Immunhistochemie, Western Blot und FACS wurde in dieser Testreihe durchgeführt. Dass antineuronale Autoantikörper auch bei Tumorpatienten **ohne** PNS vorkommen können, zeigte eine Studie über anti-Hu. In einem Test wurde nachgewiesen, dass alle kleinzelligen Bronchialkarzinome das Hu-Protein exprimieren. Weiterhin fanden sich bei 16% der neurologisch unauffälligen Patienten niedrigtitrig Hu-Antikörper (Dalmau et al. 1990). Insgesamt wird postuliert, dass bei 85% der Tumorpatienten Antigene exprimiert werden, die als potenziell immunogen anzusehen sind. Davon entwickelt sich bei 15-20% eine Antitumor-Immunantwort, ohne ein PNS als Folge zu haben (Übersicht in (Albert/Darnell 2004)).

In der hier vorgestellten Untersuchung zeigte sich bei 6/67 (9%) Patienten der Hodgkin-Patienten-Gruppe ohne begleitendes PNS niedrigtitrig ein neuronaler Antikörper in der Immunfluoreszenz. Bei einem Patienten davon, mit Bindung in der Immunfluoreszenz an Purkinjezellzytoplasma und keiner Bindung im Western Blot, könnte es sich um einen anti-Tr Autoantikörper handeln. Zum Zeitpunkt der Serumgewinnung war bei diesem Patienten kein PNS bekannt, Information über eine

spätere Entwicklung eines PNS liegen nicht vor. Die anderen Patienten wiesen untypische Bindungsmuster bezüglich der bekannten Autoantikörper auf. Somit können diese Autoantikörper nur als atypisch bezeichnet werden. Bei 2 Patienten davon mit Bindung an Auerbachplexus zeigte sich eine identische Bande im Auerbachplexus-Western-Blot an ein 19kD-Protein.

Bezüglich des Antikörpertiters unterschied sich die Hodgkin/Para-Gruppe und die Hodgkin-Gruppe: Bei den Antikörper-positiven Patienten der Hodgkin/Para-Gruppe fand sich bei 3/4 ein hoher Antikörpertiter im Serum, während bei den Hodgkin-Patienten ohne begleitende Paraneoplasie bei keinem Patienten ein hoher Titer festgestellt worden war. Diese Feststellung deckt sich mit der Beobachtung, dass bei Patienten ohne Paraneoplasie der Antikörpertiter, wenn vorhanden, niedriger ausfällt, als bei Patienten mit Paraneoplasie. So wurde bereits bei SCLC und dem Auftreten von Hu-Antikörpern festgestellt, dass hohe Antikörpertiter mit dem Vorkommen eines PNS, niedrige Antikörpertiter dabei ohne Krankheitsfolge einhergehen (Dalmau et al. 1990, Graus et al. 1997a, Posner/Dalmau 2000).

Da in mehreren Studien ein prognostischer Vorteil bei Autoantikörper-positiven Patienten festgestellt worden war, wurde hier ebenfalls ein Vergleich zwischen Antikörper-positiven und Antikörper-negativen Hodgkin-Patienten durchgeführt. Unabhängig davon, ob ein PNS vorliegt oder nicht, zeigte sich in dieser Untersuchung dabei kein signifikanter Unterschied. Möglicherweise konnte hier aufgrund zu geringer Patientenzahl keine Signifikanz festgestellt werden (10 Patienten AK-positiv gegen 62 Patienten AK-negativ). In einer zuvor durchgeführten Studie wurde bei 27/196 SCLC-Patienten ein anti-Hu-Antikörper nachgewiesen und ein signifikanter Unterschied bezüglich besserer prognostischer Faktoren festgestellt (Graus et al 1997a). In einer weiteren Studie bei NSCLC-Patienten wurde allerdings eine ähnliche Patientenzahl wie in dieser Studie untersucht. Dabei wurde bei 17/61 Patienten ein antineuronaler Autoantikörper festgestellt. Diese Patienten hatten ebenfalls eine signifikant bessere Prognose hinsichtlich ihres Tumorleidens (Blaes et al 2000).

Es konnten bei den Ergebnissen die verschiedenen Therapieprotokolle nicht in die Auswertung mit einbezogen werden. Da insgesamt bei allen Hodgkin-Patienten mehrere verschiedene Therapieprotokolle durchgeführt wurden, konnte aufgrund der

jeweils zu geringen Fallzahlen ein möglicher Einfluss auf die Ergebnisse statistisch nicht berechnet werden.

4.3 Oberflächen-bindende Autoantikörper bei M. Hodgkin

Im Bereich der onkoneuronalen Autoantikörper wurden bereits für einige Antikörper die Zielantigene identifiziert. Dabei können zwei Gruppen unterschieden werden. Die Autoantikörper der neuromuskulären Erkrankungen binden an extrazelluläre Antigene. Die Antigene der übrigen PNS-Autoantikörper liegen dagegen, soweit bekannt, meist intrazellulär (Übersicht in (Posner/Dalmau 2000)). So binden z.B. anti-Hu und anti-Ri intrazellulär an Neuronenkerne (Budde-Steffen et al. 1988, Luque et al. 1991, Dalmau et al. 1992); anti-Yo und anti-Tr binden beide an Antigene des Purkinjenzellzytoplasmas (Jaeckle et al. 1985, Graus et al. 1997b). Das LEMS, eine neuromuskuläre Erkrankung, wird hingegen durch den anti-VGCC-Antikörper (anti-voltage gated calcium channel) ausgelöst. Dieser bindet extrazellulär gegen den präsynaptischen Kalzium-Kanal (Lang et al. 1981, Motomura et al. 1997, O'Suilleabhain et al. 1998). Möglicherweise findet allerdings bei intrazellulären Antigenen zusätzlich eine Expression auf der Zelloberfläche statt. Dies konnte z.B. für das hauptsächlich zytoplasmatisch gelegene Glykolyseenzym alpha-Enolase nachgewiesen werden (Miles et al. 1991).

Untersuchungen zu vorhandenen Autoantikörpern bei Hodgkin-Patienten wurden bereits zu verschiedenen Fällen publiziert, meist im Zusammenhang mit vorhandener Paraneoplasie. So wurde zum Beispiel eine Autoantikörperdiagnostik durch Immunfluoreszenz, Western Blot oder Elisa durchgeführt (Hammack et al. 1992, Swissa et al. 1992, Graus et al. 1997b, Bataller et al. 2003, Shams'ili et al. 2003).

In dieser Studie wurde erstmals nach oberflächen-bindenden Auto-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie bei Hodgkin-Patienten **ohne** paraneoplastisches Syndrom gesucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei Hodgkin-Patienten oberflächen-bindende Autoantikörper vorkommen. Es wurde zwischen neuronal-spezifischen und Antikörpern gegen ubiquitäre Autoantigene unterschieden. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied ($p < 0.01$) im Vorkommen der Antikörper gegen ubiquitäre Autoantigene. Es könnte nun postuliert werden, dass bei Hodgkin-Patienten ein Antikörper gegen ein

unspezifisches Oberflächenantigen vorhanden sein kann bzw. ein Antikörper gegen ein Fibroblastenoberflächenantigen. Bei Tumorerkrankungen konnte als spezifische Abwehrreaktion des Körpers bereits die Antikörperbildung gegen Tumorantigene erwiesen werden. In unserem Fall handelt es sich bei dem AK gegen ubiquitäre Antigene, nicht um einen „onkoneuronalen“ Autoantikörper. Auch bei anderen Tumoren war ein gehäuftes Auftreten von AK gegen ubiquitäre Antigene bereits festzustellen, diese scheinen ebenfalls Tumor-assoziierte AK zu sein (z.B. ANA beim Bronchialkarzinom (Yamamoto et al. 1996)). Da die malignen Zellen des Hodgkin-Lymphoms aus B-Zellen generiert sind, könnte es sich in diesem Fall allerdings auch um eine Dysregulation des B-Zell-Systems mit einer vermehrten Produktion von Auto-AK allgemein handeln. Hingegen konnte eine vermehrte Produktion von ANA als AK gegen ubiquitäre intrazelluläre Antigene nicht festgestellt werden. Ebenfalls spricht gegen diese Hypothese das Fehlen einer allgemeinen Immunaktivierung. Die produzierten Oberflächen-AK zeigten keine pathogenetischen Effekte, obwohl diese sogar wirksamere pathogenetische AK im Vergleich zu intrazellulär bindenden AK sind. Ein Zusammenhang zu einer paraneoplastischen Erkrankung oder zu einer verbesserten Prognose konnte jedenfalls nicht festgestellt werden, außer ein gehäuftes Auftreten der Antikörper unter den weiblichen Patienten.

Die Häufigkeit von neuronal-spezifischen oberflächenbindenden Autoantikörpern unterschied sich nicht signifikant zwischen der Hodgkin-Gruppe und der Kontroll-Gruppe. Es konnten weiterhin keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit neuronalem Oberflächenantikörper und Patienten ohne neuronalem Oberflächenantikörper bezüglich klinisch-pathologischer Zusammenhänge festgestellt werden.

4.4 Antinukleäre Antikörper bei M. Hodgkin

Antinukleäre Antikörper (ANA) binden gegen Zellkernbestandteile aller Zellen des Körpers. Besondere Bedeutung kommt ihnen in der Diagnostik von rheumatischen Erkrankungen, wie Lupus erythematodes oder dem Sjögren-Syndrom zu (Übersicht in (Fritzler 1996)). Zur Diagnose von ANA wird hauptsächlich die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. So findet sich z. B. beim Lupus erythematodes eine homogene Färbung des Zellkerns mit Anfärbung von Mitosen, verursacht durch

Antikörper gegen Doppelstrang-DNS. Heutzutage sind über 40 ANA-Untergruppen charakterisiert. In weiteren Versuchen wie Western Blot-, Dot Blot- oder ELISA-Systemen mit rekombinanten oder aufgereinigten Antigenen können die ANA weiter unterteilt werden und eine genaue Titerbestimmung ist möglich (De Keyser et al. 1990). ANA kommen aber nicht nur im Zusammenhang mit rheumatischen Erkrankungen vor. Es gibt Beschreibungen von ANA z.B. auch bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Folwaczny et al. 1997), Schilddrüsenerkrankungen (Morita et al. 1995) oder mit malignem Melanom (Thomas et al. 1983). Auch bei 2-6% aller gesunden Probanden finden sich ANA im Serum, dabei liegen die Titer sehr viel niedriger als bei den Kollagenose-Patienten (Azizah et al. 1996).

Neben den rheumatischen Erkrankungen zählen die Neoplasien zu den häufigsten ANA-assoziierten Erkrankungen. Es wurden bei 40% der Patienten mit einem Bronchialkarzinom ANA detektiert (Yamamoto et al. 1996), ebenso bei 32% der Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (Blaes et al. 2000). Mittlerweile gibt es Untersuchungen zu einem Zusammenhang von ANA und paraneoplastischen neurologischen Syndromen. So wurden in einer Studie bei 34.7% der Patienten mit anti-Hu oder anti-Yo Antikörpern zusätzlich ANA nachgewiesen (Moll et al. 1996). In einer weiteren Studie fanden sich bei 48% der Patienten mit anti-Hu und bei 37% der Patienten mit anti-Yo zusätzlich ANA im Serum. Es konnten hier keine klinisch-pathologischen Unterschiede im Zusammenhang mit ANA im Serum festgestellt werden (Aguirre-Cruz et al. 2005).

Kürzlich konnte für die paraneoplastischen Neuropathien ein Unterschied zwischen Patienten mit ausschließlichem hohem ANA-Titer gegenüber den ANA-negativen Neuropathiepatienten nachgewiesen werden. Während Patienten mit paraneoplastischer Neuropathie insgesamt häufig an einem Bronchialkarzinom leiden, litten die ANA-positiven Patienten meistens an einen gynäkologischen Tumor und keiner an einem Bronchialkarziom (Tschernatsch et al. 2005).

In der hier vorgestellten Studie konnten ebenfalls ANA nachgewiesen werden. Es fanden sich bei 10/67 Hodgkin-Patienten (15%) antinukleäre Antikörper. Die ANA-positiven Patienten zeigten dabei keine begleitenden antineuronalen Autoantikörper oder eine begleitende rheumatische Erkrankung.

Vorhandene ANA scheinen möglicherweise auch im Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf bedeutsam zu sein. In einer Studie über NSCLC-Patienten konnte

für die ANA-positiven Patienten eine bessere Prognose gegenüber den ANA-negativen Patienten festgestellt werden (Blaes et al 2000). Dies war hier nicht der Fall. Ähnlich dem Ergebnis einer Studie von 2005 (Aguirre-Cruz et al. 2005) war bei uns kein Zusammenhang zum Krankheitsverlauf in Bezug auf ANA festzustellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen ANA-positiven und ANA-negativen Hodgkinpatienten konnte zwar bezüglich des Tumorstadiums festgestellt werden. Dabei zeigte sich bei den ANA-positiven kein Patient im klinischen Tumorstadium 2 gegen 25/57 ANA-negativen Patienten im Tumorstadium 2. In der Tumorstadienverteilung der ANA-positiven Patienten zeigten sich allerdings auch Patienten im Stadium 3 und 4, welche zuvor Stadium 2 durchlaufen mussten. Es können also keine prognostischen Schlüsse gezogen werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass paraneoplastische neurologische Syndrome bei Hodgkin-Patienten mit antineuronalen Autoantikörpern einhergehen. Es finden sich antineuronale Autoantikörper niedrigtitrig allerdings auch bei Hodgkin-Patienten ohne PNS. Weiterhin weisen Hodgkin-Patienten Antikörper gegen ubiquitär vorkommende Autoantigene auf. In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen einer verbesserten Prognose und dem Vorkommen von Autoantikörpern festgestellt werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Adamus G, Machnicki M, Elerding H, et al.: Antibodies to recoverin induce apoptosis of photoreceptor and bipolar cells in vivo. *J Autoimmun* 1998; 11: 523-533
2. Agarwala SS: Paraneoplastic Syndromes. *Med. Clin. North Am.* 1996; 80: 173-184
3. Aguirre-Cruz L, Charuel JL, Carpentier AF, Benyahia B, Delattre JY, Musset L. Clinical relevance of non-neuronal auto-antibodies in patients with anti-Hu or anti-Yo paraneoplastic diseases. *J Neurooncol* 2005; 71: 39-41
4. Albert ML, Darnell RB: Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumor immunity. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 36-43
5. Al-Lozi MT, Pestronk A, Blaes F, Kaps M: Paraneoplastische Neurologische Syndrome in *Harrisons Innere Medizin 1, Deutsche Ausgabe.* ABW Wissenschaftsverlag GmbH 15. Auflage 2003; 706-711
6. Altermatt HJ, Rodriguez M, Scheithauer BW, Lennon V: Paraneoplastic Anti-Purkinje and Type I Anti-Neuronal Nuclear Autoantibodies Bind Selectively to Central, Peripheral, and Autonomic Nervous System Cells. *Lab. Invest.* 1991; 4: 412-420
7. Anderson NE, Posner JB: Antineuronal Autoantibodies in Neurologic Paraneoplastic Syndromes. *Ann N Y AcadSci.* 1988; 540: 440-441
8. 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
9. Bartos A, Stourac P, Rusina R, Sejdova M, Velenska Z: Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with ovarian cancer: anti-Yo immunoreactivity in autaptic cerebellum and ovarian carcinoma. *Nervenarzt.* 2002; 73: 995-998
10. Bataller L, Graus F, Saiz A, Vilchez JJ; Spanish Opsoclonus-Myoclonus Study Group: Clinical outcome in adult onset idiopathic or paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *Brain* 2001; 124: 437-443
11. Bataller L, Wade DF, Graus F, Rosenfeld MR, Dalmau J: The MAZ protein is an autoantigen of Hodgkin's disease and paraneoplastic cerebellar dysfunction. *Ann Neurol.* 2003; 53: 123-127

12. Batchelor TT, Platten M, Palmer-Toy DE, Hunter GJ, Lev MH, Dalmau J, Hochberg FH: Chorea as a paraneoplastic complication of Hodgkin's disease. *J. Neurooncol.* 1998; 36: 185-190
13. Behringer K, Josting A, Schiller P, et al.: Solid tumors in patients treated for Hodgkin's disease: a report from the German Hodgkin Lymphoma Study Group. *Ann. Oncol.* 2004; 15: 1079-1085
14. Benharroch D, Shemer-Avni Y, Myint YY, et al. :Measles virus : evidence of an association with Hodgkin's disease. *Br J Cancer* 2004; 91: 572-579
15. Benzing T, Rump LC, Kaiser R, Peter HH: Paraneoplastic cerebellar degeneration in Hodgkin's disease. *Dtsch Med Wochenschr.* 1998; 123: 493-496
16. 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
17. Blaes F, Holzer G, Merkelbach S, Strittmatter M, Schimrigk K, Schäfer KH: Immunfluoreszenzmikroskopische Autoantikörperdiagnostik bei Erkrankungen des Nervensystems. *J. Lab. Med.* 1998; 22: 33-39
18. Blaes F, Strittmatter M, Schwammborn J, Heide G, Hamann GF, Merkelbach S, Schimrigk K: Antineuronal antibody-associated paraneoplastic neuropathy in Hodgkin's disease. *Eur. J. Neurol.* 1998; 5: 109-112
19. Blaes F, Klotz M, Huwer H, Straub U, Kalweit G, Schimrigk K, Schäfers HJ: Antineural and Antinuclear Autoantibodies are of prognostic relevance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 2000; 69: 254-258
20. Blaes F: Immunotherapeutic approaches to paraneoplastic neurological disorders. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2002; 2: 419-430
21. Brashear HR, Caccamo DV, Heck A, Keeney PM: Localization of antibody in the central nervous system of a patient with paraneoplastic encephalomyeloneuritis. *Neurology* 1991; 41: 1583-1587
22. Budde-Steffen C, Anderson NE, Rosenblum MK, Graus F, Ford D, Synek BJ, Wray SH, Posner JB: An antineuronal autoantibody in paraneoplastic opsoclonus. *Ann. Neurol.* 1988; 23: 528-531
23. Burke JS: Hodgkin's disease: histopathology and differential diagnosis. *Neoplastic Hematopathology*, ed. DM Knowles, Williams & Wilkins, Baltimore 1992; 497-533

24. Caress JB, Abend WK, Preston DC, Logigian EL: A case of Hodgkin's lymphoma producing neuromyotonia. *Neurology* 1997; 49: 258-259
25. Camilleri-Broet S, Davi F, Feuillard J et al.: AIDS-related primary brain lymphomas: histopathologic and immunohistochemical study of 51 cases. The French Study Group for HIV-Associated Tumors; *Hum Pathol.* 1997; 28(3): 367-374
26. Cehreli C, Payzin B, Undar B, Yilmaz U, Alakavuklar MN: Paraneoplastic cerebellar degeneration in association with Hodgkin's disease: a report of two cases. *Acta Haematol.* 1995; 94: 210-213
27. Chan JKC: The new World Health Organization Classification of Lymphomas: the past, the present and the future. *Hematol. Oncol.* 2001; 19: 129-150
28. Cossmann J: Gene expression analysis of single neoplastic cells and the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J. Histochem. Cytochem.* 2001; 49: 799-800
29. 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
30. Dalmau J, Furneaux HM, Cordon-Cardo C, Posner JB: The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *Am. J. Pathol.* 1992; 141: 881-886
31. Dalmau J, Graus F, Cheung NK, Rosenblum MK, Ho A, Cañete A, Delattre JY, Thompson SJ, Posner JB: Major histocompatibility proteins, anti-Hu antibodies, and paraneoplastic encephalomyelitis in neuroblastoma and small cell lung cancer. *Cancer.* 1995; 75: 99-109
32. Dalmau J, Posner JB: Neurological paraneoplastic syndromes. *Springer Semin. Immunopathol.* 1996; 18: 85-95
33. Dansey RD, Hammond-Tooke GD, Lai K, Bezwoda WR: Subacute Myelopathy: An Unusual Paraneoplastic Complication of Hodgkin's disease. *Med. Pediatr. Oncol.* 1988; 16: 284-286
34. Denny-Brown D: Primary sensory neuropathy with muscular changes associated with carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1948; 11: 73-87
35. De Keyser F, Verbruggen G, Veys EM, Nimmegeers J, Schatteman L, Goethals K, Vandebossche M. Microgel diffusion blotting: sensitivity of the

- technique for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Chem* 1990; 36: 337-339
36. Deodhare S, O'Connor P, Ghazarian D, Bilbao JM: Paraneoplastic Limbic Encephalitis in Hodgkin's Disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 1996; 23: 138-140
 37. Diehl V, Thomas RK, Re D: Part II: Hodgkin's lymphoma – diagnosis and treatment. *Lancet Oncol.* 2004; 5: 19-26
 38. Dropcho EJ: Autoimmune central nervous system paraneoplastic disorders: mechanisms, diagnosis, and therapeutic options. *Ann Neurol.* 1995; 37 1S: 102-113
 39. Dropcho EJ: Neurologic paraneoplastic syndromes. *J. Neurol. Sci.* 1998; 153: 264-278
 40. Ferrari P, Federico M, Grimaldi LME, Silingardi V: Stiff-man Syndrome in a patient with Hodgkin's disease. An unusual paraneoplastic Syndrome. *Haematologica* 1990; 75: 570-572
 41. 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
 42. Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep* 1996; 23: 133-145
 43. Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R: Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2004; 125: 267-281
 44. Graus F, Cordon-Cardo C, Posner JB : Neuronal antinuclear antibody in sensory neuronopathy from lung cancer. *Neurology* 1985; 35: 538-543
 45. Graus F, Dalmau J, René R, Torà M, Malats N, Verschuuren, et al. : Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer : Association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2866-2872
 46. 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.* 1997; 74: 55-61
 47. Graus F, Gultekin SH, Ferrer I, Reiriz J, Alberch J, Dalmau J: Localization of the neuronal antigen recognized by anti-Tr antibodies from patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and Hodgkin's disease in the rat nervous system. *Acta Neuropathol* 1998; 96: 1-7

48. Graus F, Keime-Guibert F, Rene R, et al.: Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain* 2001; 124: 1138-1148
49. Graus F, Delattre JY, Antoine JC: Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75:1135-1140
50. 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
51. Grisold W, Drlicek M, Casati B, Setinek U, Wondrusch E: Paraneoplastische neurologische Syndrome. *Nervenarzt* 1995; 66: 736-744
52. Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, Eichen J, Posner JB, Dalmau J: Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain* 2000; 123: 1481-1494
53. Guyomard S, Salles G, Coudurier M, Rousset H, Coiffier B, Bienvenu J, Fabien N: Prevalence and pattern of antinuclear autoantibodies in 347 patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol*. 2003; 123: 90-99
54. Hahn A, Claviez A, Brinkmann G, Altermatt HJ, Schneppenheim R, Stephani U: Paraneoplastic cerebellar degeneration in pediatric Hodgkin disease. *Neuropediatrics*. 2000; 31: 42-44
55. Hammack J, Kotanides H, Rosenblum MK, Posner JB: Paraneoplastic cerebellar degeneration. II. Clinical and immunologic findings in 21 patients with Hodgkin's disease. *Neurology* 1992; 42: 1938-1943
56. Henson RA, Urich H (Hrsg): *Cancer of the nervous system*. Blackwell, Oxford 1982
57. Herbst H: Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Semin. Cancer Biol*. 1996; 7: 183- 189
58. Hodgkin T: On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med. Chir. Trans*. 1832; 17: 68-114
59. Horwich L, Buxton PH, Ryan GM: Cerebellar degeneration with Hodgkin's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1966; 9: 45-51
60. Horwich MS, Cho L, Porro RS, Posner JB: Subacute sensory neuropathy. A remote effect of carcinoma. *Ann. Neurol*. 1977; 2: 7-19

61. Hughes M, Ahern V, Kefford R, Boyages J: Paraneoplastic Myelopathy at Diagnosis in a Patient with Pathologic Stage 1A Hodgkin Disease. *Cancer* 1992; 70: 1598-1600
62. Jaeckle KA, Graus F, Houghton A, Cardon-Cardo C, Nielsen SL, Posner JB. Autoimmune response of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration to a Purkinje cell cytoplasmic protein antigen. *Ann Neurol* 1985; 18: 592-600
63. Jarrett RF: Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* 2002; 13 (Suppl 1): 23-29
64. Julien J, Vital C, Aupy G, Laguëny A, Darriet D, Brechenmacher C: Guillain-Barré syndrome and Hodgkin's disease. Ultrastructural study of a peripheral nerve. *J. Neurol. Sci.* 1980; 45: 23-27
65. Kay CL, Davies-Jones GA, Singal R, Winfield DA: Paraneoplastic opsoclonus-myoclonus in Hodgkin's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1993; 56: 831-832
66. Küppers R, Rajewski K: The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu. Rev. Immunol.* 1998 ; 16 : 471-493.
67. Küppers R, Schwering I, Bräuninger A, Rajewsky K, Hansmann ML: Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* 2002; 13 (Suppl 1): 11-18
68. Kung S, Mueller PS, Geda YE, Krahn LE: Delirium Resulting from Paraneoplastic Limbic Encephalitis caused by Hodgkin's Disease. *Psychosomatics* 2002; 43: 498-501
69. Lahrman H, Albrecht G, Drlicek M, Oberndorfer S, Urbanits S, Wanschitz J, Zifko UA, Grisold W: Acquired neuromyotonia and peripheral neuropathy in a patient with Hodgkin's disease. *Muscle Nerve* 2001; 24: 834-838
70. Lang B, Newsom-Davis J, Wray D, Vincent A, Murray N: Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet* 1981; 2: 224-226
71. Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, Rosenblum MK, Wray SH, Schold SC Jr, Glantz MJ, Jaeckle KA, Biran H, Lesser M, Paulsen WA, River ME, Posner J: Anti-Ri: An antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol* 1991; 29: 241-251
72. Maslovsky I, Volchek L, Blumental R, Ducach A, Lugassy G: Persistent paraneoplastic neurologic syndrome after successful therapy of Hodgkin's disease. *Eur. J. Haematol.* 2001; 66: 63-65

73. McCrystal M, Anderson NE, Jones RW, Evans BD: Paraneoplastic cerebellar degeneration in a patient with chemotherapy-responsive ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 1995; 5: 396-399
74. Miles LA, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF: Role of cell surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 1991; 30: 1682-1691
75. Miro JM, Gatell JM, Llebaria C, Montserrat E, Garcia SanMiguel J: Hodgkin's disease associated with unusual immunological manifestations. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1982; 24: 81-83
76. 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
77. Morita S, Arima T, Matsuda M. Prevalence of nonthyroid-specific autoantibodies in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1203-1206
78. Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Newsom-Davis J: Incidence of serum anti-P/Q-type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J. Neurol. Sci.* 1997; 147: 35-42
79. Navellou JC, Michel F, Vuillier J, Toussiroit E, Wendling D: Chronic polyradiculoneuropathy in a patient with Hodgkin's disease. *Rev Med Interne.* 2001; 22: 592-594
80. Oh BC, Lim YM, Kwon YM, Khang SK, Kim KK: A case of Hodgkin's lymphoma associated with sensory neuropathy. *J Korean Med Sci.* 2004; 19: 130-133.
81. O'Suilleabhain P, Low PA, Lennon VA: Autonomic dysfunction in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome: serologic and clinical correlates. *Neurology* 1998; 50: 88-93
82. Pellkofer H, Schubart AS, Hoftberger 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

83. Plante-Bordeneuve V, Baudrimont M, Gorin NC, Gherardi RK: Subacute sensory neuropathy associated with Hodgkin's disease. *J Neurol Sci.* 1994; 121: 155-158
84. Polans AS, Buczylo 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
85. Posner JB, Dalmau JO: Paraneoplastic Syndromes of the Nervous System. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000; 38: 117-122
86. Reed D: On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relationship to tuberculosis. *J. Hopkins Hosp. Rep.* 1902; 10: 133-196
87. Sakai K, Shirakawa T, Kitagawa Y, Li Y, Hirose G: Induction of Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Paraneoplastic cerebellar Degeneration-associated Antigen in vivo by DNA Immunization. *J. Autoimmun.* 2001; 17: 297-302
88. 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
89. Shams'ili S, Grefkens J, de Leeuw B, et al.: Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain* 2003; 126: 1409-1418
90. Sillevs Smitt P, Manley GT, Posner JB: Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. *Neurology* 1995; 45: 1873-1878
91. Sillevs-Smitt P, Manley G, Moll JW, Dalmau J, Posner JB: Pitfalls in the diagnosis of autoantibodies associated with paraneoplastic neurologic disease. *Neurology* 1996; 46: 1739-1741
92. Sillevs Smitt P, Kinoshita A, De Leeuw B, et al.: Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342: 21-27
93. Sillevs Smitt P, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, van Putten W, Hooijkaas H, Vecht C: Survival and outcome in 73 anti-Hu positive patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *J. Neurol.* 2002; 249: 745-753

94. Spyridonidis A, Fischer KG, Glocker FX, Fetscher S, Klisch J, Behringer D: Paraneoplastic cerebellar degeneration and nephrotic syndrome preceding Hodgkin's disease: case report and review of the literature. *Eur. J. Haematol.* 2002; 68: 318-321
95. Sternberg C: Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberkulose des lymphatischen Apparates. *Z. Heilkunde* 1898; 19: 21-90
96. Sutton I, Fursdon Davis CJ, Esiri MM et al.: Anti-Yo antibodies and cerebellar degeneration in a man with adenocarcinoma of the esophagus. *Ann Neurol* 2001; 49: 253-257
97. Sutton I, Winer JB: The immunopathogenesis of paraneoplastic neurological syndromes. *Clin. Sci.* 2002; 102: 475-486
98. Swissa M, Cohen Y, Shoenfeld Y: Autoantibodies in the sera of patients with lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1992; 7: 117-122
99. 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
100. Terzolo M, Reimondo G, Ali A, Bovio S, Daffara F, Paccotti P, Angeli A: Ectopic ACTH syndrome: molecular bases and clinical heterogeneity. *Ann Oncol.* 2001; 12 Suppl 2: 83-87
101. Thomas PJ, Kaur JS, Aitcheson CT, Robinson WA, Tan EM: Antinuclear, antinucleolar and anticytoplasmic antibodies in patients with malignant melanoma. *Cancer Res* 1983; 43: 1372-1380
102. Thomas RK, Re D, Wolf J, Diehl V: Part I: Hodgkin's lymphoma – molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol.* 2004; 5: 11-18
103. Trotter JL, Hendin BA, Osterland CK: Cerebellar degeneration with Hodgkin's disease: an immunological study. *Arch Neurol.* 1976; 33: 660-661
104. 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

105. Turner ML, Boland OM, Parker AC, Ewing DJ: Subclinical autonomic dysfunction in patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* 1993; 84: 623-626
106. Utsch B, Fleischhack G, Hasan C, Bode U: Nephrotic syndrome as paraneoplastic syndrome of Hodgkin Disease. *Eur. J. Pediatr.* 1999; 158: 768
107. Van Lieshout JJ, Wieling W, van Montfrans GA, Settels JJ, Speelman JD, Endert E, Karemaker JM: Acute dysautonomia associated with Hodgkin's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1986; 49: 830-832
108. Verschuuren JJ, Dalmau J, Hoard R, Posner JB: Paraneoplastic anti-Hu serum: studies on human tumor cell lines. *J. Neuroimmunol.* 1997; 79: 202-210
109. Vincent A: Immunology of acetylcholine receptors in relation to myasthenia gravis. *Physiol. Rev.* 1980; 60: 756-824
110. 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
111. Voltz R, Dalmau J, Posner JB, Rosenfeld MR: T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology* 1998; 51: 1146-1150
112. Voltz R: Paraneoplastische neurologische Autoimmunerkrankungen. *Nervenarzt* 2002; 73: 909-929
113. Wiedemann S, Wolf J, Diehl V: An overview of the Fifth International Symposium on Hodgkin's Lymphoma: Recent advances in basic and clinical research. *Ann. Oncol.* 2002; 13 (Suppl 1): 1-3
114. Wilkinson PC: Serologic findings in carcinomatous neuropathy. *Lancet I* 1964; 1301-1303
115. Wilkinson PC, Zeromski J: Immunofluorescent detection of antibodies against neurons in sensory carcinomatous neuropathy. *Brain* 1965; 88: 529-538
116. Wilson KS, Freeland JM, Gallagher A, Cosby SL, Earle JA, Alexander FE, Taylor GM, Jarrett RF: Measles virus and classical Hodgkin lymphoma: no evidence for a direct association. *Int J Cancer* 2007; 121: 442-447
117. Wolf J, Diehl V: *Morbus Hodgkin.* Thiemes Innere Medizin; Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999; 4.13: 932-937

118. 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
119. Younger DS, Rowland LP, Latov N, Hays AP, Lange DJ, Sherman W, Inghirami G, Pesce MA, Knowles DM, Powers J, et al: Lymphoma, motor neuron diseases, and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 1991; 29: 78-86

6. Anhang

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der 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.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kaps danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Giessen durchführen zu können.

Ganz besonders danke ich Herrn PD Dr. F. Blaes für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte freundliche und engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank allen, die mir bei der Durchführung und dem Gelingen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen: den MTAs des Neurochemischen Labors für ihre Geduld und Unterstützung, Fr. Dr. vet. med. G. Förster für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie, den anderen Doktoranden und vor allem Fr. Dr. med. Marlene Tschernatsch für die stete Hilfestellung und die jederzeit geleisteten Aufmunterungen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Tobias Huwe für die liebevolle Unterstützung all die Jahre hindurch.