

**Spezifität und Sensitivität von verschiedenen
Testverfahren zur Diagnostik antineuronaler
Autoantikörper bei Paraneoplastischen
Neurologischen Syndromen**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin der

Justus- Liebig- Universität Gießen

vorgelegt von

Valentina Novakova

aus Frankfurt am Main

Gießen, 2014

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie

Klinik für Neurologie

des Fachbereichs Medizin der Justus- Liebig- Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Blaes

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 21.09.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Autoimmunität	1
1.2	Paraneoplastische Syndrome.....	5
1.3	Paraneoplastische Neurologische Syndrome	6
1.4	Rolle der Autoantikörper bei der Ätiologie und Pathogenese von PNS	8
1.5	Rolle der Autoantikörper bei der Diagnostik von PNS.....	14
1.6	Autoimmundiagnostik.....	17
1.7	Ziele und Fragestellung.....	20
2	Patienten und Methoden.....	21
2.1	Patientenkollektiv.....	21
2.2	Definition der Patientengruppen	22
2.2.1	Adulte Paraneoplastische Neurologische Syndrome (PNS).....	22
2.2.2	Gesunde Kontrollen (HC)	24
2.2.3	Other neurological diseases (OND)	24
2.3	Autoantikörperdiagnostik.....	26
2.3.1	Immunfluoreszenz.....	27
2.3.2	Western Blot.....	29
2.3.3	Referenztestung.....	32
3	Statistik.....	33
4	Resultate	34
4.1	Indirekte Immunfluoreszenz	34
4.1.1	Die einzelnen antineuronalen Antikörper im IFT	37
4.2	Western Blot von Euroimmun	38
4.2.1	Die einzelnen antineuronalen Antikörper im Western Blot von Euroimmun	41
4.3	Western Blot von ravo.....	41
4.3.1	Die einzelnen antineuronalen Antikörper im Western Blot von ravo	44
4.4	Referenztestung nach Leitlinie.....	45
4.4.1	Die einzelnen antineuronalen Antikörper in der Referenztestung	48
4.5	Vergleich der antineuronal positiven Befunde zwischen den verschiedenen Testverfahren.....	49

4.6	Vergleich der unterschiedlichen Testverfahren.....	51
4.6.1	Vergleich Immunfluoreszenz und Western Blot von Euroimmun.....	51
4.6.2	Vergleich Immunfluoreszenz und Western Blot von ravo.....	52
4.6.3	Vergleich Western Blot von Euroimmun und Western Blot von ravo.....	52
4.7	Vergleich der Referenztestung mit einzelnen Testverfahren	53
4.7.1	Vergleich der Referenztestung mit der indirekten Immunfluoreszenz	53
4.7.2	Vergleich der Referenztestung mit dem Western Blot von Euroimmun.....	54
4.7.3	Vergleich der Referenztestung mit dem Western Blot von ravo.....	54
5	Diskussion	56
6	Zusammenfassung	72
7	Summary	74
8	Abkürzungsverzeichnis	76
9	Tabellenverzeichnis.....	77
10	Abbildungsverzeichnis	78
11	Literaturverzeichnis.....	79
12	Ehrenwörtliche Erklärung	87
13	Danksagung.....	88

1 Einleitung

1.1 Autoimmunität

Autoimmunität umschreibt den Zustand der Immunreaktivität gegenüber körpereigenen Strukturen, die dadurch Ziele der immunologischen Aggression werden. Damit bildet sie das Gegenstück zur Autoimmuntoleranz, die auf der immunologischen Reaktionslosigkeit gegenüber körpereigenen Strukturen beruht und die Grundvoraussetzung eines funktionierenden Immunsystems darstellt.

Die körpereigenen Strukturen oder Komponenten werden in diesem Zusammenhang Autoantigene genannt. Die Immunantwort wird durch T- Zell- Rezeptoren (von autoreaktiven T- Zellen) oder durch Antikörper (Autoantikörper) vermittelt. Sie kann, muss jedoch nicht, zu einer Krankheit führen. So hat das Auftreten von Autoantikörpern nicht immer Krankheitswert. Autoreaktive T- Zellen und Autoantikörper werden auch bei gesunden Personen gefunden. Sie können physiologische Funktionen haben, z.B. die Entfernung gealterter Erythrozyten oder anderer Gewebebestandteile.

Autoimmunkrankheiten sind Erkrankungen, bei denen pathogenetisch wirksame Autoantikörper oder autoreaktive T- Lymphozyten nachweisbar sind. Der pathogene Prozess läuft solange ab, wie (Auto) Antigen vorhanden ist. Daraus ergibt sich der häufig nachweisbare chronisch- progrediente Verlauf.

Autoimmunerkrankungen weisen ein weites Spektrum auf und können sich gegen jedes Organ, jede Zelle und gegen jede antigene Struktur richten. Man unterscheidet Immunreaktionen, die ein spezifisches Organ oder Gewebe betreffen, z.B. bei der chronischen lymphozytären Thyreoiditis Hashimoto oder beim juvenilen (insulinabhängigen) Typ 1 Diabetes mellitus. In allen Fällen finden sich typische Autoantikörper, die meist gegen das erkrankte Organ gerichtet sind. Eine autoimmune Erkrankung kann jedoch auch den ganzen Organismus mit einbeziehen (systemische Erkrankungen), wie z.B. der systemische Lupus erythematodes (SLE). Der verantwortliche Pathomechanismus ist hierbei ganz überwiegend die Immunkomplexreaktion. Da diese vor allem im Kapillarbereich lokalisiert ist, imponiert das Krankheitsbild als ubiquitärer Entzündungsprozess. Die hierbei nachweisbaren Autoantikörper sind gegen ubiquitär vorkommende Strukturantigene gerichtet, beispielsweise gegen doppelsträngige DNA. Zwischen diesen Extremfällen liegen

Erkrankungen wie das Goodpasture- Syndrom, bei dem die Antikörper gegen Basalmembranstrukturen der Lunge und der Niere gerichtet sind.

Kriterien zur Klassifikation einer Erkrankung als autoimmun wurden erstmals 1957 von Witebsky publiziert und 1993 von Rose und Bona modifiziert. Nach diesen Kriterien wird eine Erkrankung als autoimmun anerkannt, wenn Autoantikörper oder autoreaktive T- Lymphozyten im Blut der Patienten nachweisbar sind und die Erkrankung durch Übertragung eben dieser im Tiermodell ausgelöst werden kann. Diese Beweise sind erfolgreich für Myasthenia gravis geführt worden: Die Übertragung von IgG der betroffenen Patienten auf Mäuse induziert eine transiente Muskelschwäche in den Versuchstieren. Diese beruht auf der Übertragung der Autoantikörper gegen postsynaptische Acetylcholinrezeptoren (AChR) [Lindstrom JM et al. 1976]. Nach Abbau der übertragenen Antikörper bilden sich auch die klinischen Symptome wieder zurück.

Die Entstehung von Autoimmunkrankheiten wird im gesunden Organismus normalerweise verhindert, weil

(1) unreife T- Zellen, die Autoantigene erkennen, der klonalen Deletion im Thymus unterliegen. Im Thymus werden T- Zellen mit hochaffinen T- Zell- Rezeptoren gegen Autoantigene in Zusammenhang mit HLA- Klasse I/ II negativ selektioniert; d.h. sie erhalten keine Wachstums- Überlebenssignale und sterben durch Apoptose.

(2) reife T- Zellen klonal inaktiviert werden. Einige der autoreaktiven T- Zellen entgehen der klonalen Deletion im Thymus und gelangen in die Körperperipherie, wo sie Kontakt mit dem Autoantigen erhalten und daran binden. Die meisten Körperzellen im Gewebeverband geben jedoch im Gegensatz zu den antigen- präsentierenden Zellen kein Kostimulationssignal an die gebundene T- Zelle ab. Diese wird dadurch anerg, d.h. sie überlebt, wird allerdings inaktiv gegenüber dem Antigenstimulus und bleibt das auch nach Reexposition.

(3) die autoantigen- spezifischen T- Zellen in bestimmten Fällen trotz Erkennung nicht aktiviert werden (immunologische Ignoranz).

Es werden verschiedene Pathomechanismen von Autoimmunerkrankungen und Verlust der Selbsttoleranz diskutiert:

(1) Bypass der T- Zell Toleranz durch Modifikation von Autoantigenen und/ oder Induktion kostimulierender Signale: Die Toleranz wird z.B. nach

Medikamentenexposition, aber auch durch Mikroorganismen überwunden. Die Autoantigene werden modifiziert und dadurch können T- Zellen aktiviert werden. Die notwendigen kostimulierenden Signale können durch Entzündungsreaktionen induziert werden. Unter diesen Bedingungen wird die Signalkaskade aktiviert und die gewebespezifische zytotoxische Antwort induziert.

(2) Molekulares Mimikry: Als Antwort auf ein infektiöses Agens werden Antikörper oder T- Zellen gebildet, die eine Kreuzreaktion mit Autoantigenen aufweisen. Die Immunantwort führt dann nicht nur zur Beseitigung der Erreger, sondern hat auch eine autoaggressive Komponente. Als Beispiel hierfür lässt sich Rheumatisches Fieber aufführen. Hier findet sich eine Kreuzreaktivität zwischen Streptokokken- Antigenen der Gruppe A und Autoantigenen in Herz (Endokarditis), Gelenken (Arthritis) und Niere (Glomerulonephritis).

(3) Epitope spreading: Hierbei können Proteindeterminanten (Epitope), die normalerweise nicht von Lymphozyten erkannt werden (versteckte Epitope), als assoziierte Moleküle erkannt werden und so eine Immunantwort auslösen. Diese geschieht im Tierexperiment, bei dem man gegen eine bestimmte Proteinkomponente eines multimolekularen Komplexes immunisiert und dadurch die Produktion von Antikörpern gegen verschiedenste andere Proteine aus diesem Komplex induziert [Rombach et al. 1992].

(4) Polyklonale Aktivierung von Lymphozyten: Manche Infektionen haben eine antigenunspezifische polyklonale Vermehrung verschiedenartiger Lymphozyten zur Folge. Die polyklonale B- Zell- Aktivierung erfolgt beispielsweise nach Epstein- Barr- Virus Infektion der B- Zellen. Die Zellen transformieren polyklonal, d.h. sehr viele B- Zellen werden infiziert und klonal amplifiziert, so dass auch autoreaktive B- Zellen (normalerweise supprimiert) aktiviert werden; es kommt dann zur Bildung von Autoantikörpern. Die polyklonale T- Zell- Aktivierung kann durch bakterielle/ virale Superantigene (z.B. Staphylokokken- Exotoxine) erfolgen. Sie binden an den T- Zell- Rezeptor und können die T- Zellen polyklonal, d.h. antigenunabhängig aktivieren. Es kommt wiederum zur Transformation und Proliferation von T- Zellen, darunter auch autoaggressive. Das Missverhältnis autoaggressiver, zytotoxischer T- Zellen zu T- Suppressorzellen führt dann zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung.

(5) Imbalance von T- Helfer/ T- Suppressorzellen und deren Funktion: Ein „Zuviel“ an T- Zell- Hilfe führt zu einer überschießenden B- Zellaktivierung mit Autoantikörperproduktion. Ein „Zuwenig“ an T- Zell- Suppression führt ebenfalls zu

Dysregulation und Autoantikörperproduktion. Eine Kombination beider Mechanismen findet sich z.B. beim systemischen Lupus erythematoses. Neben dieser veränderten Immunregulation können auch eine verminderte Apoptose (bei Defekten von Fas oder Fas- Ligand) oder eine verminderte Produktion von Interleukin-10 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) mit Autoimmunität assoziiert sein.

(6) Präsentation bisher „okkult“ Antigene: Diese Antigene finden sich normalerweise in immunologisch privilegierten Stellen des Körpers, wie vordere Augenkammer und Gehirn. Das Immunsystem hat normalerweise durch anatomische Barrieren (Blut- Hirn-Schranke) keinen Zugang zu diesen Proteinen und verhält sich ihnen gegenüber ignorant. Bei Zerstörung der Barriere, beispielsweise traumatisch bedingt, kommt es zur Freisetzung dieser bisher „okkulten“ Antigene, sie werden vom Immunsystem als „fremd“ erkannt und aktivieren T- Zellen. Dieses Szenario spielt sich bei der sympathischen Ophthalmie und der traumatischen Orchitis ab [Shah et al. 1993].

Es liegt auf der Hand, dass nicht ein einzelner Mechanismus herangezogen werden kann um alle unterschiedlichen Manifestationen von Autoimmunität zu erklären. Man geht vielmehr von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Weitere Faktoren, die ganz entscheidend die Induktion von Autoimmunität determinieren sind Alter, Geschlecht (deutliche Bevorzugung des weiblichen Geschlechts bei vielen Autoimmunerkrankungen), genetische Prädisposition (Träger des HLA- Allels B27 erkranken sehr viel häufiger an Spondylitis ankylosans) sowie Erreger- und Umweltexposition. Die Korrelation gewisser HLA- Allele mit der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen wird heute im Allgemeinen so interpretiert, dass solche MHC- Moleküle durch ihre spezifische Bindung an Peptide die Aktivierung autoreaktiver T- Zellen kontrollieren. In tierexperimentellen Modellen konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte MHC- Allele direkt für die Präsentation von Peptiden verantwortlich sind, welche die Empfänglichkeit für eine Autoimmunpathologie entweder erhöhen oder verhindern.

Infektionen können die schützenden Gewebebarrieren aufheben und durch die Zellnekrose dazu beitragen, dass normalerweise im Zellinneren sequestrierte (Selbst)-Antigene freigesetzt werden.

1.2 Paraneoplastische Syndrome

Unter dem Begriff Paraneoplastische Syndrome fasst man Funktionsstörungen und Krankheitszustände zusammen, die in zeitlichem Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung auftreten, jedoch weder durch das lokale oder metastatische Tumorwachstum noch durch therapeutische Ursachen (toxische Wirkung von Chemotherapeutika) zu erklären sind. Die paraneoplastischen Syndrome werden hervorgerufen durch gestörte Bildung und Abgabe von Wirkstoffen durch die Tumorzellen, die tumorfern ihre Wirkung ausüben („the remote effect of cancer“) [Johnson PC et al. 1979]. Dies ist beim Bronchialcarcinom über die Sekretion eines parathormonähnlichen Peptids und darüber Auslösen einer Hypercalciämie der Fall. Zu den Wirkstoffen gehören Hormone, Gerinnungsfaktoren, Wachstumsfaktoren etc. Als weiteres Beispiel lässt sich das Karzinoid anführen: hierbei handelt es sich um einen neuroendokrinen Tumor, dieser ist meist im terminalen Ileum lokalisiert. Er sezerniert Serotonin, welches ein Karzinoidsyndrom auslöst (anfallsweise Flushsymptomatik, wässrige Diarrhoe, kolikartige Bauchschmerzen und Bronchuskonstriktion).

Paraneoplastische Syndrome werden schätzungsweise bei 10-15% der Patienten mit Tumorleiden beobachtet [DeAngelis LM, Posner JB 2009]. Man unterscheidet paraneoplastische Endokrinopathien, paraneoplastische neurologische und muskuläre Syndrome, paraneoplastische hämatologische und paraneoplastisch kutane Syndrome. Das Cushing- Syndrom durch Sekretion von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) oder einer ACTH- ähnlichen Substanz der neuro- endokrin differenzierten Tumorzellen bei kleinzelligem Bronchialkarzinom [Domanski 1989] ist ein Beispiel für eine Endokrinopathie und Venenthrombose beim Pankreaskarzinom ein Beispiel für vaskuläre Veränderungen. Hierbei sind durch den Tumor freigesetzte thrombogene Faktoren Ursache der Hyperkoagulabilität.

1.3 Paraneoplastische Neurologische Syndrome

Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS) sind seltene Krankheitsbilder. Sie kommen bei ca. 1% der erwachsenen Patienten mit Tumorleiden vor [Blaes 2002]. Sie können in jedem zeitlichen Zusammenhang mit dem Tumorleiden auftreten, meist (50-60% der Fälle) gehen sie der Diagnose des Tumors voraus. Das Auftreten eines PNS und die Identifikation als solches kann die Tumordiagnose zu einem Zeitpunkt herbeiführen, zu dem der Tumor klein und lokalisiert und damit möglicherweise einer Therapie zugänglicher ist. Die Art des PNS und die eventuell gefundenen anti-neuronalen Autoantikörper können hierbei helfen, die Tumorsuche auf bestimmte Entitäten zu fokussieren. Die häufigsten mit PNS assoziierten Tumore sind das kleinzellige Bronchialkarzinom (small cell lung carcinoma, SCLC), gynäkologische Neoplasien, Thymome und Lymphome. Bei Kindern sind Neuroblastome am häufigsten mit paraneoplastischen neurologischen Syndromen assoziiert.

PNS können vom Muskel und dem neuromuskulären Übergang über das periphere Nervensystem bis hin zum zentralen Nervensystem jede Struktur betreffen. Man findet dementsprechend Polyneuropathien und verschiedene Enzephalopathien als klinische Manifestation eines PNS. Diese neurologischen Krankheitsbilder können auch unabhängig von einer paraneoplastischen Genese als eigenständige Erkrankungen auftreten. So ist das Lambert- Eaton myasthene Syndrom (LEMS) nur in 50- 60 % der Fälle mit einem Tumor, meist SCLC, assoziiert [O'Neill et al. 1988]. Umgekehrt ist die Inzidenz dieses PNS bei Tumorpatienten niedrig: nur 1.5- 3% der Patienten mit einem SCLC entwickeln ein LEMS.

Antoine et al. berichteten, dass 4.5% der erwachsenen Patienten mit unklarer axonaler sensomotorischer Polyneuropathie einen bisher unerkannten Tumor haben. Einige klinische Merkmale können in einem solchen Fall den Verdacht einer paraneoplastischen Genese erhärten: der Beginn ist akuter und die Progredienz der klinischen Symptomatik und der elektrophysiologischen Befunde innerhalb von Wochen oder Monaten schneller. Schmerz ist ein typisches Symptom und es kommt auch zu ungewöhnlichen Symptomen (beispielsweise intensiver Juckreiz bei Mamma-Ca). In elektrophysiologischen Untersuchungen kann man Zeichen für eine weitläufigere Beteiligung unter Einschluss der Nervenwurzeln und peripherer Nerven finden [Antoine et al. 1999].

Nach einer neuen Einteilung der PNS unterscheidet man klassische von nicht-klassischen PNS [Graus et al 2004]. Erstere werden besonders häufig in Assoziation mit Tumoren gefunden. Sie werden nach Lokalisation in PNS des zentralen und peripheren Nervensystems, der neuromuskulären Verbindung und des Muskels eingeteilt. Zu Ersteren zählen limbische Enzephalitis, subakute Kleinhirndegeneration, Opsoklonus-Myoklonus, tumorassoziierte Retinopathie, melanomassoziierte Retinopathie und das Stiff- Person- Syndrom. Zu den peripheren PNS rechnet man die subakute sensorische Neuronopathie und die chronische gastrointestinale Pseudoobstruktion. Es folgen das Lambert- Eaton- myasthene Syndrom und die Dermatomyositis für die letzte Gruppe.

Paraneoplastische Enzephalomyelitis (PEM) ist eines der häufigsten PNS. Sie ist gekennzeichnet durch Neuronenverlust und inflammatorische Infiltrate in bestimmten Arealen des Gehirns [Henson 1982]. Je nachdem welche und in welchem Ausmaß sie betroffen sind, lassen sich die unterschiedlichen Symptome erklären. Das klinische Auftreten ist subakut, geht der Tumordiagnose in 70 % der Fälle voraus und verursacht eine schwere neurologische Dysfunktion. Ist der Hippocampus betroffen, führt dies zu einer limbischen Enzephalitis, andere Manifestationen können eine Hirnstammenzephalitis oder entsprechende Mischbilder sein. Häufig findet sich auch eine intestinale Pseudoobstruktion oder eine sensorische Neuronopathie, die durch Beeinträchtigung der Spinalganglienneurone entsteht. Im Rahmen dieses PNS kommt es zu schweren neurologischen Beeinträchtigungen und 60% der Patienten verstirbt an (den Folgen) der PEM. Das kleinzellige Bronchialkarzinom und anti- Hu Antikörper waren damit am häufigsten assoziiert [Graus et al. 2001]. Komplette Remission des Tumors auf die eingeleitete antineoplastische Therapie ist ein unabhängiger Vorhersagewert für die Stabilisierung der PEM, während eine Immuntherapie keinen Einfluss auf den Tumor oder die PEM hat. Die Prognose für das SCLC in Patienten mit PEM ist schlecht, sobald der Tumor radiologisch sichtbar ist: nur 30% der Patienten leben nach drei Jahren [Keime- Guilbert et al. 1999]. Das Vorhandensein von anti-Hu Antikörpern ist wiederum ein unabhängiger Prädiktor für das Ansprechen des Tumors auf die Therapie und ist außerdem mit einem signifikant längeren Überleben assoziiert [Graus et al. 1997]. Früher Nachweis des Tumors und eine zügig eingeleitete Therapie bieten die besten Chancen einer Stabilisierung der neurologischen Symptomatik. Symptomatische Therapiemaßnahmen sollten zusätzlich alle betroffenen Patienten erhalten.

1.4 Rolle der Autoantikörper bei der Ätiologie und Pathogenese von PNS

Die Ätiologie des PNS ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Seit der Entdeckung von sehr spezifischen antineuronalen Antikörpern im Serum von Patienten mit sensorischer Polyneuropathie und kleinzelligem Bronchialkarzinom scheint die autoimmune Pathogenese die plausibelste zu sein [Wilkinson 1965].

Man nimmt an, dass die ektope Expression eines neuronalen Proteins auf dem Tumor (auch onkoneurales Antigen genannt) dem paraneoplastischen Syndrom zugrunde liegt. Die Immunantwort ist initial gegen das Tumorgewebe gerichtet, allerdings wird sie in einigen Fällen fehlgeleitet und es kommt zu einer Kreuzreaktion mit der physiologischen Proteinexpression im Nervensystem, die betroffenen Zellen werden angegriffen und es resultiert ein neurologisches Defizit [Dalmau et al. 1992]. Je nachdem welche Region des Nervensystems von der fehlgeleiteten Immunantwort betroffen ist, kommt es zu unterschiedlichen Manifestationen des PNS.

Der Beweis einer direkten autoimmunologischen Komponente ist am besten belegt für LEMS [Lang et al. 1981]. In Patienten mit LEMS wurden Antikörper gegen spannungsabhängige Calciumkanäle (voltage gated calcium channels, VGCC) gefunden. Passiver Transfer von IgG betroffener Patienten induziert die Erkrankung in Versuchstieren. Die Antikörper gegen VGCC binden an den präsynaptischen Calciumkanal der neuromuskulären Endplatte, zerstören die Struktur des Kanals und verhindern damit die Freisetzung von Calcium im Anschluss an ein eintreffendes Aktionspotential und es resultiert eine geringere Freisetzung von Acetylcholin aus Vesikeln der präsynaptischen Endigung in den synaptischen Spalt.

In 60% der Fälle tritt LEMS als paraneoplastische Genese auf, meist in Kombination mit SCLC [Giometto et al. 2010]. SOX-1 Antikörper unterscheiden mit einer Spezifität von 95% und einer Sensitivität von 67% zwischen einem paraneoplastischen LEMS bei SCLC und einem idiopathischen LEMS [Titulaer et al. 2009]. SOX- Proteine sind bereits als immunogene Antigene in SCLC identifiziert worden [Gure AO et al. 2000].

SOX-1-Antikörper (= AGNA, = Anti-Glial-Nuclear Antibodies, = Antikörper gegen Kerne von Bergmann-Gliazellen) gehören zu den antineuronalen Antikörpern und werden als teilcharakterisierte paraneoplastische Antikörper geführt. Beim Antigen SOX-1 handelt es sich um ein "Sry-like highmobility group"-Protein", das zu einer Familie von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren gehört. SOX-1 spielt eine wichtige Rolle bei der frühen embryonalen Neurogenese und ist ein Marker für neuronale

Stammzellen. Es wird aber auch in den Bergmann-Gliazellen im Kleinhirn und in neuroendokrinen Tumoren exprimiert.

In etwa 50- 60% der Patienten mit PNS lassen sich im Serum Autoantikörper gegen neuronale Strukturen nachweisen [Antoine et al. 1999]. Dabei sind häufig RNA-bindende Proteine als Zielantigen betroffen. Die Benennung der Autoantikörper erfolgt meist nach den Initialen des Indexpatienten (Hu, Yo, Ri, Ma, Tr). Diese Benennung basiert auf den Befunden in der Immunhistochemie und im Western Blot gleichermaßen. Ohne letztere Methode müsste man korrekterweise von ANNA 1 resp. PCA1 etc. sprechen. ANNA 1 ist ein Akronym für antinukleäre neuronale Antikörper und PCA 1 bedeutet Purkinje-Cell Antikörper. Diese Begrifflichkeiten gilt es nach alleiniger immunhistochemischer Färbung zu verwenden. Bei weiterer Charakterisierung durch Western Blot werden diese nach der Nomenklatur von Posner anti- Hu und anti- Yo benannt.

Man unterscheidet gut charakterisierte und teilweise charakterisierte onkoneurale Antikörper [Graus et al. 2004]. Gut charakterisierte Antikörper erfüllen folgende Kriterien: Sie müssen in der Immunhistochemie und im Immunoblot mit rekombinanten Proteinen einwandfrei reproduzierbar sein, und dies sollte von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander der Fall sein; in ausreichender Anzahl mit bekannten Malignomen auftreten; mit gut beschriebenen/ charakteristischen neurologischen Syndromen assoziiert sein und kaum in Patienten ohne Malignome auftreten. Diese Kriterien erfüllen anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, anti-CV2, anti-Ma2 und anti-Amphiphysin (Tab. 1). Teilweise charakterisierte onkoneurale Antikörper erfüllen diese Kriterien nicht und bedürfen weiterer Untersuchungen und Beschreibungen.

Anti- Hu Antikörper reagieren mit einer Gruppe von Proteinen (HuC, HuD, HelN1), die zu 86- 90% identisch zueinander sind. Sie spielen eine Rolle bei der neuronalen Zelldifferenzierung und Erhaltung des neuronalen Phänotyps [Szabo et al. 1991, Manley et al. 1995]. Sie werden im Nervensystem und auf Tumoren exprimiert- vor allem dem kleinzelligen Bronchialkarzinom und dem Neuroblastom [Dalmau et al. 1995]. Ausschließlich HuD Antigen wurde auf der Zelloberfläche von SCLC gefunden und das unabhängig von der Tatsache ob ein PNS vorlag oder nicht [Manley et al. 1995]. HuD ist Mitglied einer Familie von neuronalen RNA bindenden Proteinen. Die

Antikörper binden in der Immunhistochemie an neuronale Kerne und zeigen im Western Blot Reaktivitäten bei 38- 40 kD. Der Antikörper ist mit SCLC und paraneoplastischer Enzephalomyelitis assoziiert. Eine Polyneuropathie als Manifestation eines anti- Hu Syndroms wird bei 60- 80% der Patienten gefunden. Die subakute sensorische Neuronopathie Denny-Brown ist dabei die häufigste Untergruppe. Sie geht einher mit der Zerstörung der Zellkörper der sensorischen Neuronen im Hinterwurzelganglion, ist also formalpathogenetisch eine Neuronopathie.

Anti- Yo Antikörper richten sich gegen intrazelluläre Antigene (cdr2) in cerebellären Purkinjezellen, über die biologische Funktion der Antigene ist wenig bekannt. Man weiß, dass es DNA- bindende und modifizierende Proteine sind. Den Antikörper findet man bei Patienten mit gynäkologischen Neoplasien, insbesondere dem Ovarialkarzinom. Neurologisch werden die Patienten mit einer paraneoplastischen Kleinhirndegeneration auffällig. Im Western Blot erscheint eine Doppelbande bei 34kD und 62kD und in der Immunhistochemie färben sie das Zytoplasma der Purkinjezellen.

Anti- Ri Antikörper haben die Proteine NOVA-1 und -2 als antigenes Ziel. Dies sind RNA modifizierende Proteine, die sich möglicherweise an der Modifizierung der Glycinrezeptor- mRNA beteiligen. Anti-Ri-positive Patienten leiden meist an einem Mamma- Ca und als Paraneoplasien werden Opsoklonus-Myoklonus-Syndrome und zerebelläre Ataxie beobachtet. In der Immunhistochemie binden die Antikörper an neuronale Zellkerne des zentralen Nervensystems, aber nicht des peripheren Nervensystems. Im Western Blot zeigen sich zwei Banden: 55 und 80 kD [Anderson et al. 1988, Luque et al. 1991].

Anti- Amphiphysin Antikörper richten sich gegen ein intrazelluläres 128 kD Protein, das in synaptischen Vesikeln gefunden wurde. Ihm wird eine Rolle bei der Endocytose zugeschrieben. Sie wurden erstmals in Patienten mit paraneoplastischem Stiff-Man-Syndrom und Mamma- Ca gefunden, aber spätere Studien ergaben, dass sie bei weiteren Malignomen und PNS vorkommen, beispielsweise SCLC und Enzephalomyelitis [DeCamilli 1993, Antoine et al. 1999].

Anti- CV2/CRMP5 Antikörper reagieren mit cytoplasmatischen Proteinen in Oligodendrozyten. Diese Proteine werden während der Entwicklung downreguliert und sind im Erwachsenen nur noch in Subpopulationen der Oligodendrozyten zu finden. Als Protein der collapsin-response-mediator family ist es am axonalen Wachstum und „guidance“ beteiligt. Im Western Blot zeigt sich eine Bande bei 66kD. Der Antikörper kommt bei Patienten mit SCLC oder undifferenzierten neuroendokrinen Tumoren vor

[Antoine 2001]. Neurologisch leiden die Patienten häufig an Polyneuropathien oder Optikusneuritiden [Honnorat et al. 1996].

Anti- Ma Antikörper reagieren mit Proteinen, die nur im Gehirn-, Hoden- und Tumorgewebe exprimiert werden. Es gibt von dieser Gruppe fünf Proteine, am Besten untersucht sind Ma1 und Ma2, sie zeigen im Western Blot Banden bei 37 und 40kD. Der Antikörper ist assoziiert mit Keimzelltumoren und limbischer oder Hirnstammenzephalitis, seltener auch Kleinhirndegeneration. [Dalmau 1999, Voltz 1999, Rosenfeld 2001]

Tab. 1: Gut charakterisierte, paraneoplastische Autoantikörper (intrazelluläre Antigene)
Assoziation mit einem Tumor in > 95%

Antikörper	Paraneoplastisches Syndrom	Assoziierte Tumore
anti- Hu	PEM, limbische Enzephalitis, subakute sensorische Neuronopathie, subakute Kleinhirndegeneration, chronische gastrointestinale Pseudoobstruktion	SCLC
anti- Yo	Subakute Kleinhirndegeneration	Uterus-, Ovarial- und Mamma-Ca
anti- Ri	Hirnstamm- Enzephalitis, Opsoklonus- Myoklonus- Syndrom	Mamma- Ca, SCLC
anti- CV2	subakute sensorische Neuronopathie, subakute Kleinhirndegeneration, limbische Enzephalitis, PEM, Chorea, chronische gastrointestinale Pseudoobstruktion	SCLC, Thymome
anti- Ma (1&2)	Limbische/ Hirnstamm/ Diencephale Enzephalitis, subakute Kleinhirndegeneration	Hodentumore, Lungentumore, Mamma- Ca
anti- Amphiphysin	Stiff- Person- Syndrom	Mamma- Ca, SCLC

Während antineuronale Antikörper nur eine mäßige Sensitivität (50- 60%) in der Diagnose der PNS haben, ist ihr Spezifität mit 95- 98% sehr hoch [Moll et al. 1990, Blaes 2002]. Dies bedeutet, dass der Nachweis eines antineuronalen Autoantikörpers praktisch das Vorliegen einer malignen Grunderkrankung beweist: Die Autoantikörper sind nicht spezifisch für ein bestimmtes klinisches Syndrom, sondern deuten vielmehr auf eine bestimmte Tumorentität [Pittock et al. 2004]. Außerdem kann ein klinisches

Syndrom mit verschiedenen Antikörpern und verschiedenen Tumorentitäten assoziiert sein. In der Literatur ist eine Patientin beschrieben, die mehrere PNS mit Beteiligung des peripheren und zentralen Nervensystems entwickelte [Heidenreich et al. 1995].

Die pathogenetische Rolle der Autoantikörper für Erkrankungen der neuromuskulären Synapse ist wissenschaftlich etabliert. Neben dem LEMS gilt das auch für die Myasthenia gravis (Antikörper gegen postsynaptische Acetylcholin- Rezeptoren) und die Neuromyotomie (Antikörper gegen präsynaptische spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, VGKC). Eine direkte pathogene Wirkung der Autoantikörper besteht auch für einige der seltenen Autoimmun- Enzephalitiden, welche paraneoplastisch und als eigene Entität vorkommen. Die zugrunde liegenden Autoantikörper richten sich gegen neuronale Oberflächenstrukturen, meist Membranproteine, z.B: NMDA- Rezeptor Enzephalitis.

Bei den PNS des peripheren und zentralen Nervensystems dagegen ist die Rolle der Autoantikörper unklar und wird kontrovers diskutiert.

Bereits 1990 konnte die Arbeitsgruppe um Furneaux zeigen, dass im ZNS eine autochthone Autoantikörper- Produktion vorliegt [Furneaux et al. 1991]. Rauer konnte dies bestätigen [Rauer 2000] und hat einen sehr sensitiven ELISA mit rekombinantem HuD zum Nachweis dieser Antikörper aus intrathekaler Synthese hergestellt [Rauer 2001]. Weder durch aktive Immunisierung mit HuD- DNA oder Protein noch durch passiven Transfer von anti-Hu IgG ließ sich in Mäusen ein PNS hervorrufen [Carpentier 1998, Tanaka 1995]. Carpentier et al. konnten nach Immunisierung zwar hohe Antikörper- Titer induzieren und ein geringeres Tumorwachstum im Vergleich zur nicht- immunisierten Kontrollgruppe feststellen, aber es fand sich kein neurologisches Defizit. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von Dalmau bezüglich 15% der Patienten mit SCLC: Nicht jede Autoantikörperproduktion geht mit einer neurologischen Erkrankung einher. Bei SCLC-Patienten mit geringeren anti-Hu Titern wurde kein paraneoplastisches neurologisches Syndrom gefunden [Dalmau 1990]. Weiterhin haben anti-Hu-positive Patienten mit Tumorleiden eine signifikant bessere Überlebensrate als Tumorpatienten ohne antineuronale Antikörper. Das konnte für anti-Hu Antikörper in Patienten mit SCLC [Graus et al. 1997] und für antineuronale und antinukleäre Antikörper in Patienten mit nicht- kleinzelligem Bronchialcarcinom (non small cell lung carcinoma: NSCLC) gezeigt werden [Blaes et al. 2000]. Ersterer konnte

auch zeigen, dass niedrige anti- Hu Antikörper- Titer mit einem lokal begrenzten Wachstum des Tumors, einer (kompletten) Ansprechbarkeit der Chemotherapie und einer besseren Prognose korrelieren.

Die meisten PNS Antigene sind intrazellulär lokalisiert und es ist unwahrscheinlich, dass Antikörper sie direkt attackieren können. Antikörper können mit den MHC-Komplexen an der Zellmembran interagieren, aber diese nicht selbst passieren. Verschiedene Studien konnten inzwischen Hinweise auf einen zumindest T- Zell medierten Prozess in der Pathogenese des PNS liefern [Albert et al. 1998, Benyahia et al. 1999].

Bereits zu Beginn der neunziger Jahre wurden im Rahmen einer Studie Autopsien von verstorbenen Patienten mit SCLC und seropositiver paraneoplastischer Enzephalomyelitis (PEM) durchgeführt [Dalmau 1991]. Dabei fand man lymphoide und parenchymatöse Infiltrate und nebenbefundlich Gliose und neuronalen Zellverlust. Erstere Infiltrate waren gleichermaßen aus B- und T- Zellen zusammengesetzt, letztere hauptsächlich aus T- Zellen. Die Autoren vermuteten damals, dass die Neuronenschädigung nicht Antikörper-, sondern möglicherweise zellvermittelt sei. Einige Jahre später fand man heraus, dass das Serum von PEM Patienten toxisch ist- entweder indem es wachstumshemmend und/ oder cytolytisch auf Tumorzelllinien wirkte. Diese Wirkung ließ sich nicht auf die vorhandenen anti- Hu Antikörper im Serum zurückführen: Die Seren waren auch IgG- gereinigt noch toxisch und die reine IgG- Fraktion war es nicht. Dieser Effekt wurde für Hu- Antigen exprimierende und nicht- exprimierende Tumorzelllinien gleichermaßen gezeigt [Verschuuren 1997]. Weiterhin wurde die IgG- Subgruppe der Antikörper untersucht. Anti- Yo Antikörper gehörten ausschließlich der IgG1 Subgruppe an und die anti- Hu Antikörper waren zwar in allen Subgruppen vertreten, aber auch hauptsächlich unter den IgG1 zu finden. Diese sind in der Lage Komplement zu binden und es gibt Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Subklasse und B- oder T- Zell medierten Autoimmunmechanismen [Amyes 2001, Greenlee 2000, Jean 1994]. Die gleiche Arbeitsgruppe fand heraus, dass Lymphozyten auf Stimulation unterschiedlich reagierten: zum Einen zeigte sich eine gesteigerte Interferon γ Produktion, was zu einer TH1 Antwort passt und zum Anderen reagierten sie mit einer gesteigerten Produktion von Interleukin 4, was zu einer TH2- Antwort passt [Amyes 2001]. Eine HuD spezifische Proliferation von CD4+ T- Zellen mit gesteigerter Produktion an Interferon γ war bereits gezeigt worden [Benyahia et al. 1999]. Sie legt nahe, dass die spezifische

T- Zell- Antwort vom TH1- Typ ist. Bei Patienten mit anti- Yo positiver paraneoplastischer Degeneration und Ovarialkarzinomen konnten zytotoxische T-Lymphocyten gegen das Yo- Antigen nachgewiesen werden [Albert et al. 1998]. Für eine T- Zell Beteiligung an der Pathogenese der paraneoplastischen Syndrome spricht auch die MHC I Präsentation der Tumorzellen in Patienten mit PNS [Dalmau et al. 1995].

Die momentane Vorstellung der Pathogenese eines paraneoplastischen neurologischen Syndroms lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Am Anfang dieses Immunprozesses stehen möglicherweise apoptotische Vorgänge. Tumorzellen unterliegen der Apoptose, dadurch werden die intrazellulären Proteine dem Immunsystem wieder zugänglich. Die Tumorproteine werden daraufhin von dendritischen Zellen aufgenommen. Die dendritischen Zellen wandeln sich im regionären Lymphknoten von phagozytierenden zu antigen- präsentierenden Zellen um, d.h. sie können intrazelluläre Proteine der phagozytierten Tumorzellen auf ihrer Zelloberfläche zusammen mit MHC I präsentieren. Um CD8+- T- Killerzellen zu aktivieren bedarf es der Anwesenheit von CD4+ T- Helferzellen. Ohne Letztere kommt es zu einer Toleranz der T- Zellen und es kommt keine Immunantwort zustande. Aktivierte cytotoxische T- Zellen selbst zerstören wiederum die antigenträgenden Tumorzellen, indem sie mit dem Enzym Granzym Apoptose induzieren. Damit kann obige Kaskade wieder beginnen, die die Immunantwort somit unterhält. Diese ist demnach gekennzeichnet durch das Auftreten von PNS antigen- spezifischen CD8+ T Killerzellen im Blut von Patienten mit Tumorleiden, sie gelten als Haupteffektoren. Allerdings erkennen CD8+ zytotoxische T-Zellen die entsprechenden Autoantigene auch im Nervengewebe und verursachen damit das PNS.

1.5 Rolle der Autoantikörper bei der Diagnostik von PNS

Bis vor kurzem gab es keine einheitlichen Kriterien für die diagnostische Vorgehensweise bei paraneoplastischen neurologischen Syndromen. Aus diesem Grund schlossen sich 2004 einige Wissenschaftler zu einer europäischen Konsensusgruppe zusammen und schlugen neue Diagnosekriterien vor [Graus et al. 2004]. Mittlerweile sind diese weitgehend anerkannt und finden breite Anwendung [Leitlinien für PNS der

Deutschen Gesellschaft für Neurologie]. Sie unterscheiden dabei zwischen definitivem PNS und möglichem PNS und führen erstmals den Begriff des klassischen PNS ein. Darunter versteht man ein neurologisches Syndrom, dass relativ häufig mit einem Tumorgeschehen assoziiert ist. Beispiele hierfür finden sich im vorangegangenen Abschnitt. Die vorgeschlagenen Diagnosekriterien stützen sich auf drei Dinge: 1. dem Vorliegen eines Tumors 2. der Definition von klassischen Syndromen und 3. gut charakterisierten Antikörpern.

Initial stellt sich der Patient oftmals mit einer neurologischen Symptomatik beim Arzt vor. Diese erfordert eine gründliche Evaluation [Vedeler et al. 2006], die paraneoplastische Genese sollte- selbst wenn sie selten ist- bei allen neurologischen Leitsymptomen differenzialdiagnostisch immer in Betracht gezogen werden. Gewisse Merkmale können den Verdacht darauf lenken: der Beginn ist akuter und die Progredienz der klinischen Symptomatik und der elektrophysiologischen Befunde innerhalb von Wochen oder Monaten schneller. Schmerz ist ein typisches Symptom und es kommt auch zu ungewöhnlichen Symptomen (beispielsweise intensiver Juckreiz bei Mamma- Ca) [Antoine et al. 1999]. Falls der Verdacht einer paraneoplastischen Ätiologie besteht, muss diesem unbedingt nachgegangen und so gut wie möglich bestätigt oder ausgeschlossen werden. Die nächste diagnostische Maßnahme ist die Bestimmung von antineuronalen Autoantikörpern im Serum des Patienten. Die Konsensusgruppe unterscheidet gut charakterisierte (anti- Hu, -Yo, -CV2, -Ri, -Ma2 und -Amphiphysin) und teilweise charakterisierte onkoneuronale Antikörper. Erstere müssen gewisse Anforderungen erfüllen um als solche zu gelten: in ausreichend hoher Anzahl von Patienten und Kontrollen von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben und in der Immunhistochemie und Western Blot nachgewiesen worden sein usw. Je nachdem welches klinische Syndrom bei dem Patienten vorliegt, sollte nach ganz bestimmten Antikörpern gesucht werden. Bei paraneoplastischer Enzephalomyelitis wird der anti- Hu Antikörper in der Mehrheit der Patienten gefunden [Graus et al. 2001].

Die Bestimmung des Autoantikörper- Status des Patienten ist aus folgenden Gründen überaus wichtig: Zum Einen bestätigen die Antikörper den Verdacht eines PNS. Je nachdem welche Antikörper vorliegen, kann die Tumorsuche auf einige Entitäten fokussiert werden. Bronchialkarzinome sind mit > 90% der häufigste Tumor bei anti-Hu positiven Patienten und PNS [Blaes 2002].

Damit sind die antineuronalen Antikörper ganz entscheidend an der frühzeitigen Tumordiagnose beteiligt. Mit ihrer Hilfe gelingt die Erkennung des Tumors noch zu einem Zeitpunkt, zu dem der Tumor klinisch unauffällig, kleiner und evtl. auch einer Therapie zugänglicher ist. Als nächstes kann eine onkologische Therapie eingeleitet werden. Diese richtet sich zwar in erster Linie direkt gegen den Tumor, ist aber auch essentiell für die Stabilisierung der neurologischen Symptomatik, kann den neuronalen Verlust aufhalten und damit den Patienten vor einer zunehmenden neurologischen Beeinträchtigung und den damit verbundenen Folgen bis hin zum Tod bewahren [Graus et al. 2001].

Der dritte Schritt im Algorithmus zur Abklärung eines PNS stellt die Tumorsuche dar. Diese sollte gründlich und je nach Antikörperstatus fokussiert erfolgen. Der Diagnose eines klassischen PNS sollte unabhängig vom Antikörperstatus eine eingehende Tumorsuche folgen. Diese fordert die Konsensusgruppe auch dann fortzusetzen, wenn für das Syndrom kein typischer Tumor gefunden wurde um einen Zweittumor auszuschließen. Falls im ersten Untersuchungsgang gar kein Tumor gefunden wird, muss diese in regelmäßigen Abständen wiederholt werden und der Patient engmaschig kontrolliert werden. Es sind schon Fälle beschrieben, in denen erst mehrere Jahre nach Beginn der neurologischen Symptomatik ein Tumor gefunden wurde [Mathew et al. 2006]. Bisher gilt die Computertomographie (CT) als etabliertes Verfahren zur initialen Tumorsuche. Zwei Gruppen haben beschrieben, dass das Ganzkörper- FDG- PET dem CT bei seropositiven Patienten mit einem klassischen Syndrom und charakterisierten Antikörpern überlegen ist [Linke et al. 2004, Younes- Mhenni et al. 2004]. Erstere Gruppe zeigte, dass die Sensitivität der FDG- PET Untersuchung mit 90% sehr viel höher ist als die des CTs mit 30%, die Kombination aus beiden steigert die Sensitivität auf 100%. Die Gruppe um Younes-Mhenni schlägt daher vor, die kostenintensivere FDG- PET Untersuchung den Patienten mit gut charakterisierten Antikörpern vorzubehalten, bei denen mit konventioneller Bildgebung die Tumorsuche bisher ergebnislos verlaufen war [Younes-Mhenni et al. 2004]. Die aktuellen Leitlinien ordnen das FDG- PET auch in die Sekundär- und Tertiärdiagnostik. Nach Evaluation dieser diagnostischen Schritte kann man die abschließende Aussage treffen ob ein definitives oder mögliches PNS vorliegt (Abb. 1).

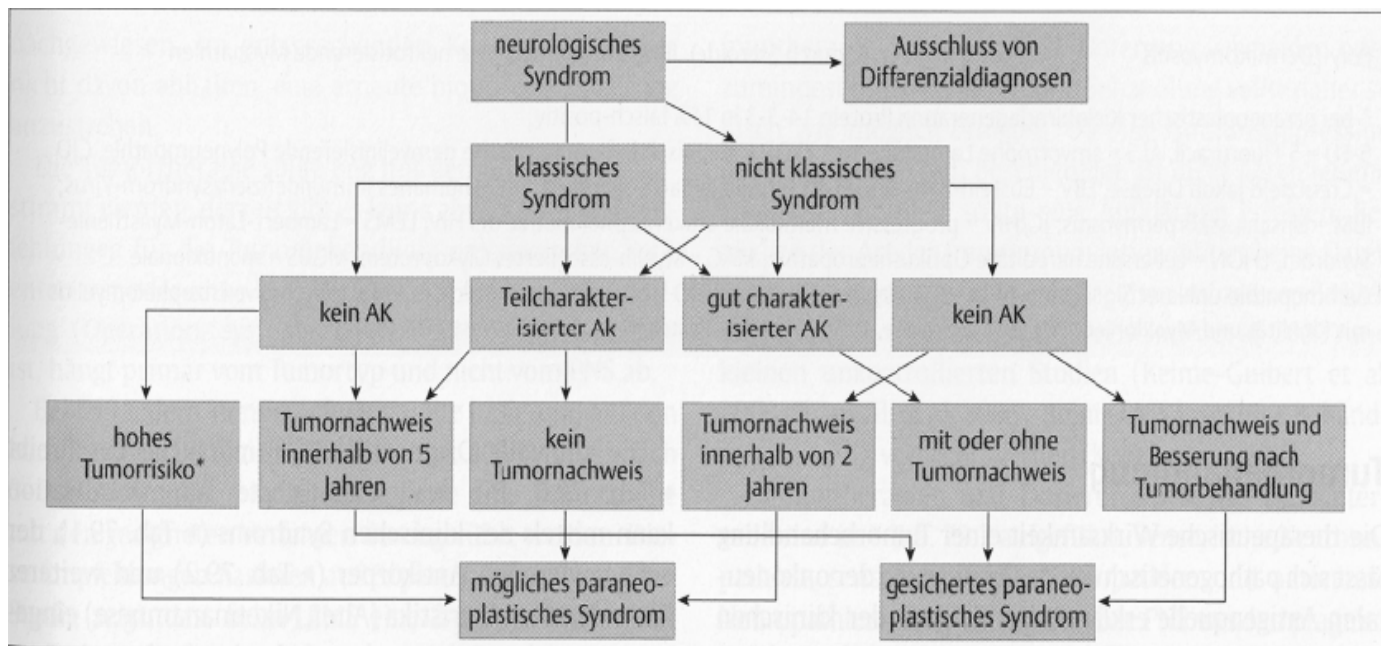


Abb. 1: Algorithmus zur Diagnostik bei Verdacht auf ein PNS
aus „S1- Leitlinie zu Paraneoplastische Neurologische Syndrome der Deutschen
Gesellschaft für Neurologie“, Stand September 2012

1.6 Autoimmundiagnostik

Neben den paraneoplastischen Syndromen spielt der Nachweis von Autoantikörpern auch in der Diagnostik der systemischen entzündlich- rheumatischen Erkrankungen eine entscheidende Rolle [Übersicht in Fritzler 1996]. Er ermöglicht die nosologische Zuordnung differenzialdiagnostisch vieldeutiger klinischer Symptome und in vielen Fällen auch eine prognostische Einschätzung [Kroot EJ et al. 2000, Vencovský J et al. 2003] Autoantikörper sind meist bereits zu Beginn der Erkrankung nachweisbar und persistieren oft im Krankheitsverlauf bzw. können diesen manchmal auch vorhersagen [Borg et al. 1990]. Insbesondere beim Ausschluss und in der Verlaufsbeobachtung eines systemischen Lupus erythematoses (SLE) stellt der Nachweis von Autoantikörpern eine wesentliche Komponente dar. Zwei der Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology sind serologische Merkmale: Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) und Nachweis von weiteren immunologischen Befunden wie anti- dsDNA-, anti- Sm- und anti- Phospholipid- Antikörper [Tan et al. 1982].

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) auf humanen Epitheliumzellen Typ 2 eines Larynxkarzinoms (HEp-2 Zellen) ist die Standardmethode für das Screening auf

Autoantikörper bei Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis [Jaskowski et al. 1996]. Inzwischen sind mehr als 40 Antigene unter dem Sammelbegriff ANA zusammengefasst. Initial gilt es zu klären, ob im Serum überhaupt ANAs vorliegen. In den meisten Labors gelten Titer ab 1:160 als positiv; Titer von 1:40 und 1:80 als grenzwertig. Das Bindungsmuster erlaubt im gleichen Schritt auch eine grobe Einteilung dieser ANAs: bei Lupus- Patienten mit anti-ds DNA- Antikörpern zeigt sich beispielsweise eine homogene Färbung des Zellkerns mit Anfärbung von Mitosen. Im nächsten Schritt erfolgt üblicherweise die weitere Differenzierung der ANAs im Immunoblot oder ELISA mit rekombinanten oder aufgereinigten Antigenen [De Keyser et al. 1990].

Die indirekte Immunfluoreszenz auf humanen Larynx-Epitheliumzellen besitzt mit >90% eine hohe Sensitivität für ANA [Kavanaugh et al. 2000, Ulvestad et al. 2000] und gilt deswegen als sehr gute Screening Methode für den Nachweis von ANA [Tan et al. 1997]. Eine Sensitivität von 100% kann beim Testen auf ANA nie erreicht werden, da nicht alle Lupus- Patienten zu jedem Zeitpunkt antinukleäre Antikörper aufweisen [Bohan 1979]. Die Spezifität des ANA Nachweises im IFT wiederum ist demgegenüber mit 49% gering [Bonilla et al. 2007], da antinukleäre Antikörper zum Einen auch bei Gesunden nachweisbar sind und zum Anderen auch bei anderen Erkrankungen als SLE auftreten [Übersicht in Kavanaugh et al. 2000]. Insgesamt ergibt sich damit ein hoher negativer Vorhersagewert und niedriger positiver Vorhersagewert für ANAs bezügl. des Ausschlusses von SLE. Letzterer lässt sich bei insgesamt niedrigen Prävalenzen von Autoimmunerkrankungen durch Vermeiden eines übermäßigen klinischen Gebrauches mittels präziser anamnestischer und klinischer Evaluation des Patienten steigern [Ulvestad et al. 2000]. Aus diesem Grund müssen Autoantikörper- Befunde immer im klinischen Kontext beurteilt werden. Unsachgemäße Verwendung von immunologischen Testresultaten kann zu falscher Diagnose, unnötiger Therapie und verschwendeten Gesundheitsressourcen führen.

Da IFT zeit- und arbeitsaufwändig ist und qualifiziertes Personal erfordert, wird immer wieder nach anderen einfacheren Methoden zum Screening auf ANA gesucht. Ein wichtiger Parameter für eine solche Methode sollte dabei ein hoher negativer Vorhersagewert sein [Kern et al. 2000]. In diesem Zusammenhang haben verschiedene Gruppen die Testeigenschaften verschiedener ELISAs untersucht. ELISAs wurden bisher hauptsächlich als Bestätigungstest und zur weiteren Differenzierung von positiven Befunden im IFT verwendet. Die Arbeitsgruppe um Sinclair publizierte eine

Studie, in der sie darlegen, dass der untersuchte ELISA den IFT als Screeningmethode für klinisch relevante ANAs ersetzen kann [Sinclair et al. 2007]. Andere Gruppen konnten zeigen, dass kommerziell erhältliche ELISAs (wie erwartet) unterschiedliche Sensitivitäten und Spezifitäten haben. Im Vergleich mit IFT reichen die Testeigenschaften von manchen an die Werte des IFTs heran, andere übertreffen sie sogar- diese könnten laut Autoren die Immunfluoreszenz als Screeningmethode ablösen. Manche untersuchten ELISAs dieser Studie liefern andererseits keine zufriedenstellenden Ergebnisse [Tonutti et al. 2004]. Andere Daten zeigen viele falsch- negative Ergebnisse bei der Verwendung von ELISA als initiale Screening- Methode auf ANA, welche im IFT erkannt wurden und auch von klinischer/ therapeutischer Konsequenz gewesen wären [Bayer et al. 1999]. Diese Autoren fordern konsequenterweise die indirekte Immunfluoreszenz als Screeningverfahren für ANA beizubehalten bis die Testeigenschaften der ELISAs verbessert werden.

Weitere Gruppen liefern differenzierte Ergebnisse bezüglich verschiedener untersuchter Autoantikörper [Eisfeller et al. 2005]. Zunehmend unterliegen die klassischen ELISAs auch Modifikationen und es werden neue Testverfahren mit im Vordergrund stehendem Potential zu Automatisierung entwickelt. Insbesondere bei diesen gilt es die Testeigenschaften neben den ökonomischen Vorteilen nicht außer Acht zu lassen [Nifli et al. 2006] und es werden Standardisierungen und klinische Validierungen gefordert, welche beispielsweise sicherstellen sollen, dass die bei den neuen Assays verwendeten Antikörper über alle klinisch- relevanten Epitope verfügen [Amos et al. 2005].

Wie in den vorangegangenen Abschnitten hinreichend erläutert und in dem Algorithmus dargestellt, hat die Bestimmung der antineuronalen Autoantikörper für die Diagnose eines PNS eine Schlüsselposition inne- ähnlich den ANAs bei SLE. Leider sind aber genau hier noch viele Punkte ungeklärt. Bereits 1995 gab es einen Workshop über Leitlinien zum Nachweis von onkoneuralen Antikörpern. Dieser lieferte wichtige Schritte hin zu einer Standardisierung der Nachweismethoden in der Autoantikörperdiagnostik [Moll et al. 1995]. Die Autoren konstatieren damals, dass man sich zwar auf die Immunhistochemie und den Western Blot als primäre Testsysteme zum Nachweis von onkoneuralen Antikörpern beruft, es dabei aber noch zu viele methodische Unterschiede gibt. Diese liegen insbesondere in den zahlreichen verschiedenen Geweben, der unterschiedlichen Aufarbeitung der Substrate und der unterschiedlichen Konzentration der Proben und Färbungen. Abschließend machten die

Autoren die Aussage, dass es keine Studien zur Sensitivität oder Spezifität der unterschiedlichen Testsysteme gibt. Leider sind seitdem keine nennenswerten Fortschritte in dieser Hinsicht gemacht worden. Die obige Konsensusgruppe muss 2004 immer noch einräumen, dass die neuroimmunologische Forschung einem rasanten Fortschritt unterworfen ist, es allerdings an standardisierten Methoden zum Nachweis der onkoneuronalen Antikörper mangelt [Graus et al. 2004]. Sie empfehlen nach wie vor die Verwendung von Immunhistochemie und Western Blot mit rekombinanten Proteinen und wissen um die Einschränkungen der Methoden. Überraschenderweise wurde die Diagnostik mit einer Kombination beider Methoden bisher nicht evaluiert. Die Verwendung unterschiedlicher Testsysteme erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse und dem Kliniker fällt es zunehmend schwer den differenzialdiagnostischen Wert der Antikörper zu beurteilen. Insbesondere mit zunehmendem Entdecken neuer antineuronaler Antikörper müssen Qualitätskontrollen entwickelt werden um Studienergebnisse vergleichbar zu machen und Sensitivität und Spezifität der Testsysteme untersucht werden.

1.7 Ziele und Fragestellung

Die vorliegende Arbeit evaluiert die Kombination der indirekten Immunfluoreszenz auf Primaten Kleinhirn, Großhirn, Darm sowie HEP-2 Zellen und Western Blot mit rekombinanten Proteinen und mit Antigen- Extrakten aus Primaten- Kleinhirn zum Nachweis von antineuronalen Autoantikörpern bei PNS. Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie hoch sind Sensitivität und Spezifität der verwendeten Testverfahren?
2. Wie unterscheiden sich die Sensitivität und Spezifität der Testverfahren bezüglich klassischer versus nicht- klassischer PNS und die Unterteilung der Kontrollgruppe?
3. Wie unterscheiden sich die Sensitivität und Spezifität der Testverfahren bezüglich einzelner antineuronaler Autoantikörper untereinander und im Vergleich zur Referenztestung?

2 Patienten und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Zur Durchführung der vorliegenden Studie liegt das positive Votum der Ethik-Kommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen vor. Es wurden insgesamt 131 Patienten und Kontrollprobanden eingeschlossen. Die Patienten konnten alle aus der neuroimmunologischen Datenbank der Neurologischen Klinik für die Teilnahme an der Studie gewonnen werden. Nach Aufklärung und Einverständnis wurde das Restserum und ggf. Liquor aus der Routinediagnostik für die Studie benutzt. Im Folgenden werden ihre epidemiologischen und klinischen Daten vorgestellt und im Anschluss daran werden die Methoden zur durchgeführten Autoantikörperdiagnostik erläutert. Die immunologischen Ergebnisse finden sich in dem vierten Kapitel der vorliegenden Arbeit.

Die untersuchten Patienten wurden in drei Gruppen eingeteilt: Adulte Paraneoplastische Neurologische Syndrome (PNS), other neurological diseases (OND) und gesunde Probanden als weitere Kontrollgruppe (Healthy Controls, HC) (Tab. 2)

Tab. 2: Alters- und Geschlechterverteilung aller Patienten

M: Mittelwert, StAbw: Standardabweichung, m: männlich, w: weiblich

Gruppe	n	Alter (M ± StAbw) [a]
PNS	67 (30m, 37w)	68.5 ± 12.7
OND	34 (18m, 16w)	67.7 ± 13.4
HC	30 (14m, 16w)	52.4 ± 9.4

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich der Alters- oder Geschlechterverteilung.

2.2 Definition der Patientengruppen

2.2.1 Adulte Paraneoplastische Neurologische Syndrome (PNS)

Diese Patienten hatten alle einen malignen Tumor und litten zusätzlich an einer Erkrankung des Nervensystems. Diese stand zwar in engem zeitlichem Zusammenhang mit dem Tumorleiden, konnte aber nicht auf den Tumor selbst oder seine Metastasen und auch nicht auf lokale, vaskuläre, metabolische oder therapeutische Ursachen zurückgeführt werden. Die Diagnose eines PNS wurde bei den Patienten dieser Gruppe gemäß den 2005 von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie veröffentlichten Leitlinien gestellt und entsprach damit auch den vom Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork empfohlenen Richtlinien [Graus et al. 2004].

Der überwiegende Teil der Patienten (41.8%) hatte einen Tumor der Lunge und zwar vornehmlich ein kleinzelliges Bronchialkarzinom bei 22 von 28 Patienten. Die Position der zweithäufigsten Tumorentität teilen sich Tumore des hämato- lymphatischen Systems mit Malignomen, deren Primarius nicht bekannt ist (Tab. 3)

Tab. 3: Tumorverteilung innerhalb der PNS- Gruppe

CUP: Carcinoma of unknown primary

Tumor	Häufigkeit [%]
Lunge*	28/67 (41.8)
CUP	07/67 (10.4)
Hämato- lymphatisches System	07/67 (10.4)
Ovar	06/67 (9.0)
Nierenzellkarzinom	04/67 (6.0)
Prostata	03/67 (4.5)
Mamma	03/67 (4.5)
Gastrointestinal- Trakt	03/67 (4.5)
Pankreas	02/67 (3.0)
Melanom	02/67 (3.0)
Liposarkom	01/67 (1.5)
Seminom	01/67 (1.5)

* 22/28 kleinzelliges Bronchialkarzinom

Das häufigste paraneoplastische neurologische Syndrom war die Polyneuropathie (PNP) mit 58.2%, gefolgt von der Kleinhirndegeneration mit 23.9%. Alle weiteren Syndrome waren mit weniger als 10% vertreten (Tab. 4).

Tab. 4: Formen der PNS innerhalb der PNS- Gruppe

Die Häufigkeiten betragen hier > 100 %, weil bei zwei Patienten jeweils zwei PNS vorlagen.

PNS	Häufigkeit [%]
Polyneuropathie	39/67 (58.2)
Kleinhirndegeneration	16/67 (23.9)
Limbische Enzephalitis	05/67 (7.5)
Lambert- Eaton Myasthenes Syndrom	04/67 (6.0)
Hirnstammenzephalitis	02/67 (3.0)
Myelitis	02/67 (3.0)
Opsoklonus- Myoklonus- Syndrom	01/67 (1.5)

In zwei Dritteln der Fälle (66.6%) handelte es sich bei der Polyneuropathie um die sensomotorische Form. Mit 12.8% folgte die sensible Form und die weiteren sieben hier gefundenen Formen des PNS traten nur bei 1 - 3 Patienten der 37 Patienten auf (Tab. 5).

Tab. 5: Formen der paraneoplastischen Polyneuropathie

CIDP: Chronisch- inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie

Polyneuropathie	Häufigkeit [%]
Sensomotorische Neuropathie	26/39 (66.6)
Sensible Neuropathie	05/39 (12.8)
Polyradikulitis Guillain- Barré	03/39 (7.7)
CIDP	02/39 (5.1)
Motorische Neuropathie	01/39 (2.6)
Axonale Neuropathie	01/39 (2.6)
Autonome Neuropathie	01/39 (2.6)

Innerhalb der PNS- Gruppe hatten 46.3% der Patienten (31/67) ein klassisches und 53.7% der Patienten (36/67) ein nicht-klassisches PNS [Graus et al. 2004]. Die paraneoplastische Kleinhirndegeneration (PCD) führte mit 51.6% die Gruppe der klassischen PNS an, ebenso die Polyneuropathie bei den nicht-klassischen PNS mit 72.2% der Fälle (Tab. 6, Tab. 7).

Bezüglich der derzeitigen Diagnosekriterien lassen sich die 67 PNS Patienten unterteilen in 55 % (37/67) mit definitivem/gesichertem PNS und 45% (30/67) mit möglichem PNS.

Tab. 6: Formen der klassischen PNS

Klassische PNS	Häufigkeit [%]
PCD	16/31 (51.6)
Limbische Enzephalitis	05/31 (16.1)
Sensible Polyneuropathie	05/31 (16.1)
Lambert- Eaton Myasthenes Syndrom	03/31 (9.7)
Opsoklonus- Myoklonus- Syndrom	01/31 (3.2)
Intestinale Pseudoobstruktion	01/31 (3.2)

Tab. 7: Formen der nicht- klassischen PNS

Nicht- klassische PNS	Häufigkeit [%]
Sensomotorische Polyneuropathie	26/36 (72.2)
Polyradikulitis Guillain- Barré	03/36 (8.3)
Hirnstammenzephalitis	02/36 (5.5)
CIDP	02/36 (5.5)
Motorische PNP	01/36 (2.8)
Axonale PNP	01/36 (2.8)
Myelitis	01/36 (2.8)

2.2.2 Gesunde Kontrollen (HC)

Hier handelte es sich um anonymisierte, vom Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Gießen zur Verfügung gestellte Seren von gesunden Blutspendern.

2.2.3 Other neurological diseases (OND)

Die Patienten dieser Gruppe litten allesamt an einer nicht-paraneoplastischen neurologischen Erkrankung. Dabei handelte es sich mehrheitlich (55.9%) um Polyneuropathien, darunter bildeten die nichtentzündlichen die Mehrheit mit 68.4%. Es folgten 21% der Patienten (4/19) mit Polyradikulitis Guillain- Barré (GBS) und die restlichen beiden Patienten (10.5%) litten an der chronisch- inflammatorisch demyelinisierenden Form der Polyneuropathie. Die Polyneuropathien waren klinisch und elektrophysiologisch gesichert worden und zusätzlich war eine paraneoplastische Genese ausgeschlossen worden. Als zweithäufigstes Krankheitsbild innerhalb dieser Gruppe war der Schlaganfall mit 23.6% vertreten (Tab. 8). Niemand aus dieser Patientengruppe litt an einer Tumorerkrankung.

Tab. 8: Klinisch- neurologische Befunde innerhalb der OND- Gruppe

Klinik	Häufigkeit [%]
Polyneuropathie*	19/34 (55.9)
Schlaganfall	08/34 (23.6)
Stiff Man Syndrom	02/34 (5.9)
Amyotrophe Lateralsklerose	01/34 (2.9)
Cervikale Myelopathie	01/34 (2.9)
Myasthenia gravis	01/34 (2.9)
Astrocytom	01/34 (2.9)
Limbische Enzephalitis	01/34 (2.9)

* 13/19 nicht- entzündliche Polyneuropathie

2.3 Autoantikörperdiagnostik

Moll et al. publizierten 1995 die auf der Konsensuskonferenz in Rotterdam, Niederlande beschlossenen „Guidelines for the detection of antineuronal antibodies“, in denen künftig antineuronale Autoantikörper mittels einer Kombination aus Immunfluoreszenz und Western Blot als Methoden der Wahl bestimmt werden sollten (Tab. 9). Auch die Deutsche Gesellschaft für Neurologie nahm dies in ihre Leitlinien für „Paraneoplastische Neurologische Syndrome“ auf und wir erhoben in der vorliegenden Studie weitere Daten hierzu. Wir verwendeten die indirekte Immunfluoreszenz (IFT) und zwei kommerziell erhältliche Testkits für Western Blot mit rekombinant hergestellten Antigenen von verschiedenen Firmen. Autoantikörper, die in der Immunfluoreszenz und im Western Blot eine eindeutige neuronale Spezifität zeigten, deren Antigen jedoch bisher nicht identifiziert wurde, wurden als atypische antineuronale Antikörper bezeichnet.

Tab. 9: Diagnosekriterien der einzelnen antineuronalen Antikörper

Antikörper	Immunfluoreszenzmuster	Western Blot
anti- Hu	Neuronale Nuklei des ZNS und PNS werden angefärbt, Nukleoli bleiben ausgespart, Cytoplasma wird schwach angefärbt	ein oder mehrere Banden im Bereich von 38-40 kD; rekombinantes Feld positiv
anti- Yo	Purkinjezellzytoplasma wird angefärbt, Nuklei bleiben ausgespart	Banden bei 34 und/ oder 62 kD im Cerebellum; rekombinantes Feld positiv
anti- Ri	neuronale Nuklei ausschließlich des ZNS werden angefärbt, Nukleoli bleiben ausgespart, Zytoplasma wird schwach angefärbt	Banden bei 55 und/ oder 80 kD im Cerebellum
anti- CV2	Cytoplasma von Neuronen, Oligodendrozyten und Retinazellen, N. opticus und Axone peripherer Nerven werden angefärbt	Banden bei 66 kD
anti- Ma	neuronale Nukleoli des ZNS, Hoden- und Tumorzellen werden angefärbt	Banden bei 37 und/ oder 40kD im Cerebellum
anti- Amphiphysin	intracelluläre synaptische Vesikel werden angefärbt	Banden bei 128 kD

2.3.1 Immunfluoreszenz

Mit dieser Methode lassen sich Antigene in Zellen und Geweben mit spezifischen Antikörpern lokalisieren. Der Antigen-Antikörper-Komplex kann anschließend durch verschiedene Marker sichtbar gemacht und damit im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Man unterscheidet die direkte von der indirekten Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz sind die Antikörper bereits an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt. Bei der indirekten Immunfluoreszenz hingegen wird nach Bindung des antikörperspezifischen Primärantikörpers in einem zweiten Schritt ein Fluorochrom-markierter Sekundärantikörper addiert. Damit es zu einer Bindung untereinander kommt, müssen diese beiden Antikörper auch immer entsprechende Bindungsstellen füreinander besitzen. Stammt zum Beispiel der erste Antikörper aus dem Kaninchen, ist der zweite, markierte Antikörper ein anti- Kaninchen- IgG (oder IgM), der aus einem anderen Tier (Schaf oder Ziege) gewonnen wurde. Der erste Antikörpermarker, der in der Fluoreszenzmikroskopie benutzt wurde, war Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Auch heute ist er noch weit verbreitet und wurde auch von uns verwendet. Wird das Gewebe unter dem Fluoreszenzmikroskop UV- Licht einer bestimmten Wellenlänge ausgesetzt (Anregung), emittiert FITC ein fluoreszierendes grünes Licht durch Filter der entsprechenden Wellenlänge. Die Anregungswellenlänge für FITC beträgt 495 nm und die Emissionswellenlänge liegt bei 515 nm. Diese Inkubationen mit den jeweiligen Antikörpern werden durch gründliche und vorsichtige Waschschriffe mit einem neutralen Puffer unterbrochen, die überschüssiges, nicht gebundenes Reagenz entfernen sollen. Als Resultat bildet sich ein farbiger, unlöslicher Niederschlag an der Stelle, an der das Antigen innerhalb des Gewebes oder der Zelle lokalisiert ist. Mit der direkten Immunfluoreszenz können zwei oder noch mehr Antigene gleichzeitig untersucht werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz können schwach exprimierte Antigene besser sichtbar gemacht werden, da an einen Primärantikörper gleich mehrere Moleküle des markierten Sekundärantikörpers binden können. Damit wird das Verhältnis von Signal zu Antigen stark vergrößert. Durch Fixierung kann die Zellmembran durchlässig gemacht werden, so dass auch intracytoplasmatische Antigene nachweisbar werden. So ist auch die Färbung von Zellen in Suspension, Gewebeschnitten oder Zytozentrifugenpräparaten möglich.

Indirekter Immunfluoreszenztest

Diese Methode führten wir mit dem Neurologie-Mosaik der Firma EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG (Lübeck, Deutschland) durch. Mit diesem kommerziell erhältlichen Testsystem erfolgte die in-vitro Bestimmung humaner Antikörper in Patientenproben; diese Bestimmung kann laut Herstellerangaben sowohl quantitativ als auch qualitativ erfolgen. Die gebrauchsfertigen Objektträger sind mit unfixierten Gefrierschnitten von Primatencerebrum, Primatencerebellum, Primatendarm und Hep-2 Zellen beschichtet.

Zunächst wurden die Patientenproben mit **Phosphate buffered Saline (PBS) Tween 0.2 %** auf 1/32 verdünnt. Liquorproben wurden wegen ihres geringeren Immunglobulingehalts nativ belassen. Im ersten Schritt wurden 25 µl der verdünnten Patientenproben auf die Testfelder pipettiert und mit den Gewebeschnitten der Objektträger für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde in jeder Testserie zusätzlich ein Testfeld mit PBS Tween 0.2 % anstelle der Serumprobe inkubiert. Seren mit bekanntem positivem Autoantikörperbefund (extern evaluiert) dienten als Positivkontrollen. Hiernach folgte der erste Waschschrift. Dafür wurden die Objektträger von den Reagenzträgern abgenommen und vorsichtig mit PBS Tween 0.2% abgespült. Zusätzlich wurden sie für 3-5 min in eine mit PBS Tween 0.2 % gefüllte Küvette auf einen Rotationsschüttler gestellt um die überschüssigen ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die nächste Inkubation erfolgte mit 20 µl des 1/75 in PBS/ Tween 0.2% verdünnten fluoreszierenden Sekundärantikörpers (polyclonal rabbit anti-human IgG/ FITC, Dako, Hamburg). Da FITC lichtempfindlich ist, erfolgte diese 30- minütige Inkubation im Dunkeln. Anschließend folgte obiger Waschschrift. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit einem Tropfen Mounting- Medium (pH8.4 phosphatgepuffertes Glycerol) und Deckgläsern fixiert und bis zur Auswertung unter einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop im Kühlschrank aufbewahrt (Abb. 2).

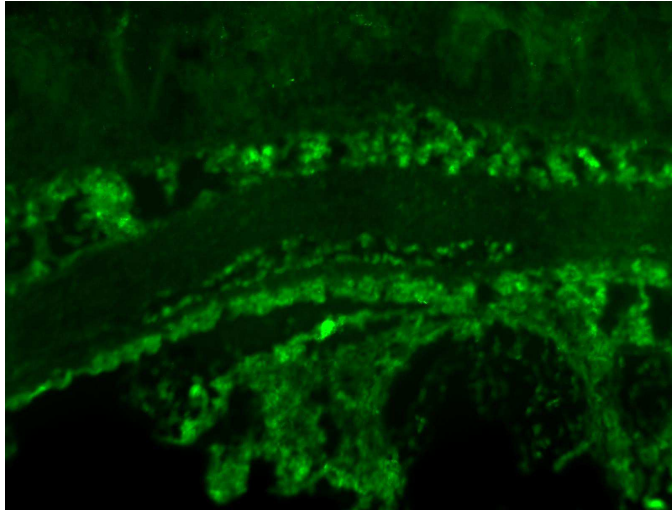


Abb. 2: Antineuronaler Antikörper (anti-Hu): Bindung von humanem Serum an Plexus myentericus im Primatendarm (Vergrößerung 1:200)

2.3.2 Western Blot

Die durchgeführten Western Blot Analysen dienten als Bestätigungstests positiver Resultate aus der indirekten Immunfluoreszenz. Dazu wurden zwei kommerziell erhältliche Testkits unterschiedlicher Unternehmen verwendet. Der Anti- Neuronale-Antigene- Euroimmun- Western Blot (Lübeck) kann laut Herstellerangaben in- vitro qualitativ humane Autoantikörper der Immunglobulinklasse IgG aus Serum oder Plasma gegen die Antigene Hu, Yo und Ri bestimmen. Der zweite Immunoblot wurde mit einem Testsystem des Unternehmens ravo (Freiburg) durchgeführt „Rekombinanter Immunoblot zum Nachweis der paraneoplastischen Autoantikörper anti- HuD, anti- Yo, anti- Ri, anti- CV2, anti- Amphiphysin und anti- Ma2“.

Beide Testkits enthielten alle notwendigen Reagenzien: beschichtete Nitrocellulosestreifen, Enzymkonjugat und Puffer um nur einige zu nennen. Die Blotstreifen der Firma Euroimmun sind mit elektrophoretisch aufgetrennten Antigen-Extrakten aus Primaten- Kleinhirn und die des Herstellers ravo mit rekombinanten Antigenen bereits vorgefertigt.

Ähnlich der indirekten Immunfluoreszenz gliedert sich die Durchführung des Western Blots in Inkubation des Patientenserums mit den Blotstreifen, einem Waschvorgang, einem weiteren Inkubationsschritt- diesmal mit dem Enzymkonjugat- dem zweiten

Waschvorgang und der abschließenden Substrat- Inkubation als Katalysator für die Farbreaktion. Sämtliche Schritte fanden bei Raumtemperatur statt. Die einzelnen Blotstreifen lagen während des Versuchs in voneinander getrennten Rinnen einer sogenannten Inkubationswanne, so dass Kontamination vermieden wird. In jeder durchgeführten Testreihe war jeweils eine Kontrolle vorhanden. Als Negativ- Kontrolle wurde statt mit Patientenserum nur mit Puffer inkubiert und als Positiv- Kontrolle diente ein Serum mit bekanntem positivem Autoantikörperbefund.

Western Blot mit dem Testkit der Firma EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG

Das Testkit enthält drei verschiedene Reagenzien: Universalpuffer in zehnfacher Konzentration, Enzymkonjugat (Alkalische-Phosphatase-markiertes Anti-Human-IgG aus der Ziege) ebenfalls in zehnfacher Konzentration und eine gebrauchsfertige Substrat- Lösung (NBT/BCIP = Nitroblautetrazoliumchlorid/ 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat). Der Universalpuffer wurde mit Aqua dest. auf die einfache Konzentration verdünnt und dieser gebrauchsfertige Puffer wurde verwendet um das Enzymkonjugat auf die einfache Konzentration zu verdünnen. Der gebrauchsfertige Puffer wurde im Weiteren fürs Verdünnen der Patientenproben auf das Verhältnis 1:51 für Serum respektive 1:10 für Liquor und bei allen Waschvorgängen pur verwendet.

Vor dem eigentlichen Beginn des Versuchs wurden die einzelnen Blotstreifen mit 1.5ml einfach verdünntem Universalpuffer pro Streifen und Rinne vorbehandelt. Die Vorbehandlung der Blotstreifen geschah auf einem sogenannten Wippschüttler um die optimale Umspülung der Streifen mit dem Reaganz zu gewährleisten und dauerte 15 min. Sämtliche folgenden Inkubationsschritte fanden ebenfalls auf diesem Wippschüttler statt. Der Puffer wurde dann mittels Pipette vor dem nächsten Schritt- der Inkubation der Proben mit den Antigenen der Blotstreifen- entfernt. Für die Inkubation wurden jeweils 1.5 ml der auf das Verhältnis von 1:51 verdünnten Patientenprobe (resp. 1:10 falls es sich um Liquor statt Serum

handelte) auf einen Streifen appliziert und für 60 min auf den Wippschüttler gestellt. An diese erste Inkubation schloss sich der erste Waschvorgang an: das Serum resp. der Liquor wurde zunächst abgesaugt, danach wurde dreimal mit je 1.5 ml Universalpuffer pro Rinne für jeweils 5 min auf dem Wippschüttler gewaschen. Es folgte die zweite

Inkubation für weitere 60 min mit 1.5 ml einfach konzentriertem Enzymkonjugat pro Blotstreifen, an die sich obiger Waschvorgang anschloss- mit jeweiligem vollständigem Abziehen der vorherigen Flüssigkeit aus den Inkubationsrinnen. Die dritte Inkubation, diesmal für nur 10 Minuten, erfolgte mit dem Substrat NBT/BCIP zum Visualisieren der stattgefundenen Reaktionen und wurde schlussendlich mit Aqua dest. beendet. Ähnlich dem Waschvorgang wurde dafür dreimal je 1.5 ml Aqua dest. pro Rinne pipettiert und die Inkubationswanne für 1 min auf den Wippschüttler gestellt.

Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden die einzelnen Blotstreifen mit einer Pinzette aus den Inkubationsrinnen entnommen, auf die entsprechenden Felder des Auswerteprotokolls platziert, mit Filterpapier abgetrocknet und mit der beiliegenden Klebefolie fixiert.

Eine korrekt durchgeführte Inkubation lässt sich an der intensiven Färbung der Kontrollbande erkennen. Diese befindet sich unter der Nummerierung auf jedem Streifen und muss auch bei den Negativ- und Positiv- Kontrollen erkennbar sein. Außerdem fand sich auf jedem Blotstreifen ein Membranchip, der mit rekombinant hergestelltem Hu- und Yo- Antigen beschichtet ist. Ein positiver Hu- Antikörperbefund zeichnete sich ergo durch eine sehr hohe Signalintensität einer 38 kD- Bande und der notwendigen Bande beim rekombinanten Hu- Antigen aus. Gleiches galt auch für eine positiven Antikörperbefund gegen das Yo- Antigen: hier musste neben der 62 kD- Bande und möglicherweise einer zusätzlichen bei 34kD die Bande beim rekombinanten Yo-Antigen obligat angezeigt werden. Einen Ri- Antikörper in der Patientenprobe festzustellen, erforderte diese zwei Banden: eine bei 80 kD und die zweite bei 55 kD. Die Auswertung der Blotstreifen erfolgte im direkten Vergleich mit der beiliegenden Auswerteschablone, die für diesen Zweck an die aufgeklebten Blotstreifen zu halten ist.

Western Blot mit dem Testkit der Firma ravo Diagnostika

Der Test folgte oben beschriebenem Prinzip. Die Testdurchführung wurde allerdings während der Erhebung der vorliegenden Studie in genau einem Punkt von Seiten des Unternehmens geändert: Die Serumverdünnung im ersten Inkubationsschritt wurde zunächst für 1:200 empfohlen und in den folgenden Chargen auf 1:2000 gesteigert. Ansonsten blieb die nachfolgende Vorgehensweise die gleiche.

Die Testvorbereitung begann auch hier mit der Herstellung des gebrauchsfertigen Waschpuffers aus dem Waschpufferkonzentrat. Das Konzentrat wurde mit Aqua dest. auf das Verhältnis 1:20 verdünnt und die Seren wurden mit Waschpuffer auf das Verhältnis 1:200 respektive 1:2000 verdünnt. Die eigentliche Testdurchführung begann mit der Probeninkubation von 2 ml respektive 2.1 ml verdünntem Serum mit den Blotstreifen für 60 min auf dem Wippschüttler. Es folgte fünfmaliges Waschen mit je 2 ml Puffer für einige Minuten. Als Nächstes ließ man die Streifen mit dem Konjugat reagieren. Hierfür wurden 2 ml des mit alkalischer Phosphatase markierten IgGs pro Streifen pipettiert und für 30 min inkubiert. Anschließend folgte oben beschriebener Waschschrift und danach wurden 2 ml des gebrauchsfertigen Substrats BCIP/ NBT auf die Streifen pipettiert und für 25 min inkubiert. Diese Reaktion wurde mit Aqua dest. gestoppt und der Versuch damit beendet. Die Streifen wurden mit sauberem Filterpapier getrocknet und ausgewertet. Auch hier galt, dass die an jedem Streifen als Reaktionskontrolle aufgetragene Bande zur Überprüfung des Testkits positiv ausfallen musste. Die Auswertung erfolgte immer im direkten Vergleich von Patientenstreifen mit dem entsprechenden Kontroll- Scan des Testkits.

2.3.3 Referenztestung

Bei der Referenztestung wurde der derzeitige Auswertestandard für antineuronale Antikörper des Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork [Graus et al. 2004] zugrunde gelegt. Sie wurde extern durchgeführt. Dabei wurden Seren als positiv gewertet, bei denen sich in der indirekten Immunfluoreszenz und einem Bestätigungsverfahren mit allen relevanten Antigenen ein antineuronaler Antikörper nachweisen ließ. Der anti- SOX1 Antikörper wurde dabei von einem weiteren externen Labor nachgetestet, da die von uns verwendeten Tests das rekombinante Autoantigen nicht enthielten

3 Statistik

Die statistischen Berechnungen für die vorliegende Arbeit führten wir mit dem kommerziell erhältlichen Computerprogramm GraphPad Prism Version 4.02, 17 Mai 2004 der GraphPad Prism Inc., Kalifornien, USA durch. Häufigkeitsunterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des Fisher's exact tests auf ihre Signifikanz überprüft. Häufigkeitsunterschiede zwischen zwei Gruppen mit mehr als zwei Variablen wurden mit dem Chi- Quadrat Test berechnet. Die ANOVA- Analyse wurde zum Vergleich der Altersunterschiede herangezogen. In allen Berechnungen gilt ein $p < 0.05$ als signifikant.

Die Sensitivität [= $a / (a + c)$] gibt die Wahrscheinlichkeit an, einen tatsächlich positiven Sachverhalt durch ein positives Testergebnis zu erkennen (Tab. 10). Für die einzelnen angewendeten Testverfahren ist die Sensitivität damit der Anteil der PNS- Patienten, deren antineuronalen Antikörper auch erkannt wurden.

Die Spezifität [= $d / (b + d)$] gibt die Wahrscheinlichkeit an, einen tatsächlich negativen Sachverhalt durch ein negatives Testergebnis zu bestätigen (Tab. 10). Für die einzelnen angewendeten Testverfahren ist die Spezifität damit der Anteil an Patienten aus den Kontrollen, bei denen keine antineuronalen Antikörper festgestellt werden konnten.

Tab. 10: Kontingenztafel

	PNS	Kontrollen
Antikörper- positiv	a	b
Antikörper- negativ	c	d

4 Resultate

Alle 131 Patienten wurden hinsichtlich des Vorkommens antineuronaler Antikörper untersucht. Dieser Parameter wurde mit zwei verschiedenen Testverfahren untersucht, wobei das zweite Verfahren mit zwei verschiedenen Tests durchgeführt wurde. Die immunologischen Ergebnisse werden getrennt nach den angewendeten Tests dargestellt und miteinander verglichen.

4.1 Indirekte Immunfluoreszenz

In der indirekten Immunfluoreszenz wurden bei 26.7% (35/131) der Patienten antineuronale Antikörper nachgewiesen, die übrigen 73.3% (96/131) waren antineuronal negativ. Darunter wurden bei 55.7% (73/131) dieser antineuronal negativen Patienten gar keine Fluoreszenzmuster unter dem Fluoreszenzmikroskop gesehen. Während bei den restlichen 17.6% (23/131) dieser Patienten die Fluoreszenzmuster Antikörpern gegen andere (nicht-neuronale) Strukturen (z.B. Myelin oder Granularis) zugeordnet werden konnten.

Mit 82.8% (29/35) sind die meisten der antineuronalen Antikörper innerhalb der PNS-Gruppe nachgewiesen worden, die übrigen sechs positiven Befunde fanden sich in den Seren der OND- Patienten, die Seren der gesunden Kontrollgruppe sind alle negativ getestet worden.

Anti- Hu- Antikörper sind mit elf Seren am häufigsten vertreten unter den antineuronalen Antikörpern. Mit nur einem positiven Serum weniger (10/35) folgen die anti- glialen nukleären Antikörper. Antikörper gegen Purkinjezellzytoplasma sind in sieben und atypische antineuronale Antikörper in sechs Fällen nachgewiesen worden, davon einmal innerhalb der OND- Gruppe. Der anti- Ri- Antikörper ist nur in einem einzigen Patientenserum nachgewiesen worden. Das Serum ist allerdings im Referenztest als anti- Ri negativ getestet worden.

Für die indirekte Immunfluoreszenz ergibt sich für den Vergleich der PNS- Gruppe mit der gesamten Kontrollgruppe und beiden Kontrollgruppen einzeln eine gleich bleibende Sensitivität von 43.3%. Die Spezifität im Vergleich zwischen PNS- Gruppe und allen Kontrollen beträgt 90.6%. Sie variiert von 100% im Vergleich zwischen PNS- Gruppe

und der gesunden Kontrollgruppe bis hin zu 82.4% im Vergleich der PNS- Gruppe mit der OND- Gruppe ($p < 0.05$, Abb. 3, Tab. 11).

Tab. 11: Spezifität und Sensitivität des IFT für die gesamte PNS- Gruppe (a-d)

	a)		b)	
	PNS	Kontrollen	PNS	OND
antineuronal +	29	6	29	6
antineuronal -	38	58	38	28
	Sensitivität = 43.3%		Sensitivität = 43.3%	
	Spezifität = 90.6%		Spezifität = 82.4%	

	c)		d)		
	PNS	HC	PNS	OND	HC
antineuronal +	29	0	29	6	6
antineuronal -	38	30	38	28	30
	Sensitivität = 43.3%				
	Spezifität = 100%				

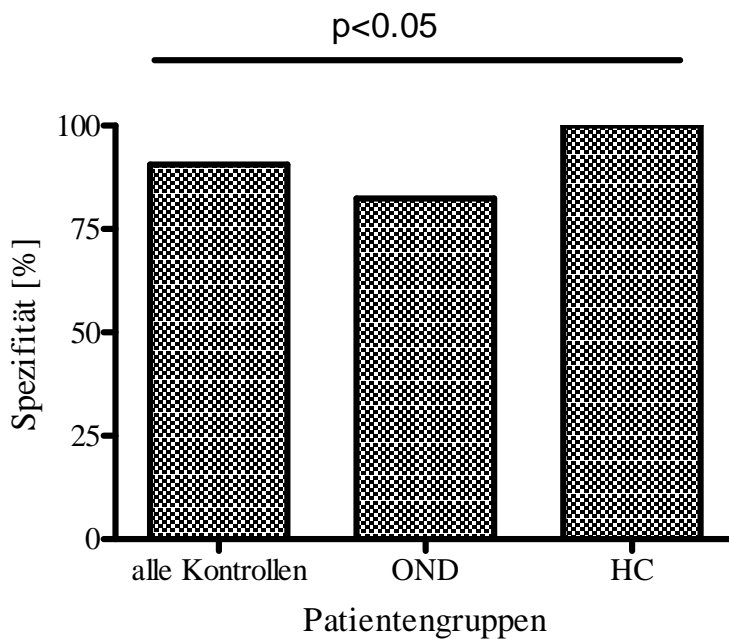


Abb. 3: Unterschiedliche Spezifität des IFT für die PNS- Gruppe im Vergleich zwischen der gesamten Kontrollgruppe und beiden Kontrollgruppen einzeln

Im nächsten Schritt wurde die PNS- Gruppe in klassische und nicht- klassische Syndrome aufgeteilt und getrennt voneinander mit der gesamten Kontrollgruppe und beiden Kontrollgruppen einzeln verglichen.

Damit steigt für die klassischen PNS die Sensitivität des IFT auf 58%, während die Werte für die Spezifitäten den vorgenannten entsprechen ($p < 0.005$, Abb. 4, Tab. 12).

Tab. 12: Spezifität und Sensitivität des IFT für die klassische PNS- Gruppe (a-d)

	a)	b)
antineuronal +	klass. PNS	klass. PNS
	18	18
antineuronal -	Kontrollen	OND
	6	6
	Sensitivität = 58%	Sensitivität = 58%
	Spezifität = 90.6%	Spezifität = 82.4%
	c)	d)
antineuronal +	klass. PNS	klass. PNS
	18	18
antineuronal -	HC	OND
	0	6
	Sensitivität = 58%	Sensitivität = 58%
	Spezifität = 100%	Spezifität = 82.4%
		HC
		0
		30

Für die nicht- klassischen PNS fällt die Sensitivität des IFT auf 30.6% und die Werte für die einzelnen Spezifitäten entsprechen vorgenannten ($p < 0.05$, Abb. 5, Tab. 13a,c,d).

Die Auswertung des IFT bei nicht- klassischen PNS gegen OND ist statistisch nicht signifikant ($p = 0.260$, Tab. 13b) und damit ist die alleinige Anwendung des IFT bei nicht- klassischen PNS gegen OND als nicht ausreichend zu betrachten.

Tab. 13: Spezifität und Sensitivität des IFT für die nicht- klassische PNS- Gruppe (a-d)

	a)	b)
antineuronal +	nicht- klass. PNS	nicht- klass. PNS
	11	11
antineuronal -	Kontrollen	OND
	6	6
	Sensitivität = 30.6%	Sensitivität = 30.6%
	Spezifität = 90.6%	Spezifität = 90.6%
	c)	d)
antineuronal +	nicht- klass. PNS	nicht- klass. PNS
	11	11
antineuronal -	HC	OND
	0	0
	Sensitivität = 30.6%	Sensitivität = 30.6%
	Spezifität = 100%	Spezifität = 90.6%
		HC
		6
		28

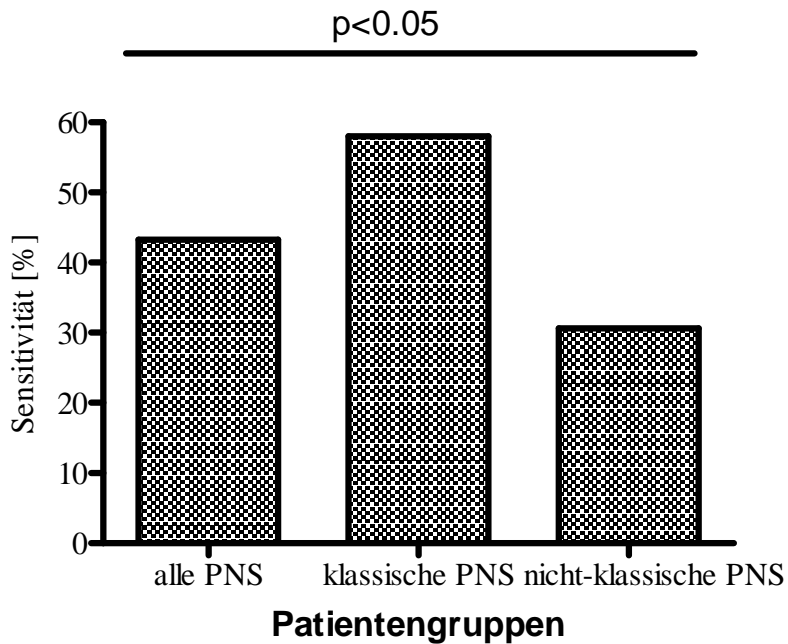


Abb. 4: Unterschiedliche Sensitivität des IFT für die gesamte PNS- Gruppe und die klassische und nicht- klassische PNS- Gruppe

4.1.1 Die einzelnen antineuronalen Antikörper im IFT

Anti-Hu Antikörper

Der anti- Hu Antikörper war mit elf positiven Seren der am häufigsten nachgewiesene antineuronale Antikörper. Davon fanden sich alle elf positiven Befunde innerhalb der PNS- Gruppe und kein einziger unter den Kontrollen. Neun der Seren gehörten zu Patienten der klassischen PNS- Gruppe und die anderen beiden der nicht- klassischen PNS- Gruppe.

Anti-gliale nukleäre Antikörper (AGNA)

AGNA- Antikörper waren mit zehn positiven Seren am zweithäufigsten nachgewiesen worden. Sie verteilen sich hälftig auf die PNS- Gruppe (zwei in der klassischen und drei in der nicht- klassischen PNS- Gruppe) und die OND- Gruppe mit den restlichen fünf positiven Seren. Damit trägt der Nachweis dieses Antikörpers am meisten zur Reduktion der Spezifität der indirekten Immunfluoreszenz bei.

Anti- Purkinjellcytoplasma Antikörper

Der anti- Purkinjellcytoplasma Antikörper war mit sieben positiven Seren der am dritthäufigsten nachgewiesene antineuronale Autoantikörper. Vier der sieben Seren gehörten zu Patienten der klassischen PNS- Gruppe, zwei zur nicht- klassischen PNS- Gruppe und ein positiver Nachweis wurde innerhalb der OND- Gruppe geführt. Die Purkinjellcytoplasma-färbung im IFT ist nicht Yo- spezifisch.

Antineuronal atypische Antikörper

Antineuronal atypische Antikörper wurden innerhalb der PNS- Gruppe bei sechs Patienten nachgewiesen, davon gehörten zwei in die klassische PNS- Gruppe und vier in die nicht- klassische PNS- Gruppe.

Anti- Ri Antikörper

Der anti- Ri Antikörper ist nur einmal innerhalb der klassischen PNS- Gruppe nachgewiesen worden. Das Serum ist allerdings in der Referenztestung als anti- Ri negativ gewertet worden.

4.2 Western Blot von Euroimmun

Mit dem Western Blot der Firma Euroimmun wurden bei 10.7% (14/131) der Patienten antineuronale Antikörper nachgewiesen, die übrigen 89.3% waren antineuronal negativ. Darunter zeigten 73.3% der Seren (96/131) gar keine Reaktivitäten und die restlichen 16% zeigten unspezifische Banden (21/131), d.h. Reaktivitäten in verschiedenen kD- Bereichen, die zum jetzigen Zeitpunkt keinem bekannten antineuronalen Antikörper zugeordnet werden konnten. Alle antineuronal positiven Seren gehörten zu Patienten der PNS- Gruppe. Es wurden keinerlei positive Befunde der Kontrollprobanden gefunden. Anti- Hu Antikörper sind unter den antineuronalen Antikörper mit 78.5% am häufigsten (11/14) vertreten. Weiterhin ist der anti- Yo Antikörper bei drei Patienten nachgewiesen worden, der anti- Ri Antikörper hingegen ist in keinem Serum nachgewiesen worden.

Im Vergleich der PNS- Gruppe mit den Kontrollen ergibt sich für den Western Blot von Euroimmun eine Sensitivität von 20% und eine Spezifität von 100%. Da sich innerhalb der Kontrollgruppen keine positiven Befunde fanden, beträgt die Spezifität durchgehend 100% ($p < 0.005$, Abb. 5, Tab.14).

Tab. 14 Spezifität und Sensitivität des Western Blots von Euroimmun für die gesamte PNS-Gruppe (a-d)

	a)		b)	
	PNS	Kontrollen	PNS	OND
antineuronal +	14	0	14	0
antineuronal -	53	64	53	34

Sensitivität = 20%
Spezifität = 100%

	c)		d)		
	PNS	HC	PNS	OND	HC
antineuronal +	14	0	14	0	0
antineuronal -	53	30	53	34	30

Die positiven antineuronalen Befunde bei klassischen PNS für sich betrachtet ergeben eine Sensitivität des Western Blots von 35.5% ($p < 0.0005$, Abb. 5, Tab. 15), während sie für die nicht-klassischen PNS bei 8.3% liegt ($p < 0.05$, Abb. 5, Tab. 16).

Tab. 15: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von Euroimmun für die klassische PNS-Gruppe (a-d)

	a)		b)	
	klass. PNS	Kontrollen	klass. PNS	OND
antineuronal +	11	0	11	0
antineuronal -	20	64	20	34

Sensitivität = 35.5 %
Spezifität = 100%

	c)		d)		
	klass. PNS	HC	klass. PNS	OND	HC
antineuronal +	11	0	11	0	0
antineuronal -	20	30	20	34	30

Tab. 16: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von Euroimmun für die nicht- klassische PNS- Gruppe

	nicht- klass. PNS	Kontrollen
antineuronal +	3	0
antineuronal -	33	64

Sensitivität = 8.3% und Spezifität = 100%

Die Aufteilung der Kontrollgruppe in die OND- Gruppe und gesunde Kontrollen und Berechnung der Spezifität und Sensitivität des Western Blots von Euroimmun mit dem Chi Quadrat- Test ergibt aufgrund der niedrigen Patientenzahlen n in diesen Gruppen keine statistisch signifikanten Werte (Tab. 17) und ist somit nicht anwendbar.

Tab. 17: Western Blot von Euroimmun für die nicht- klassische PNS und einzelne Kontrollen

	nicht- klass. PNS	OND	HC
antineuronal +	3	0	0
antineuronal -	33	34	30

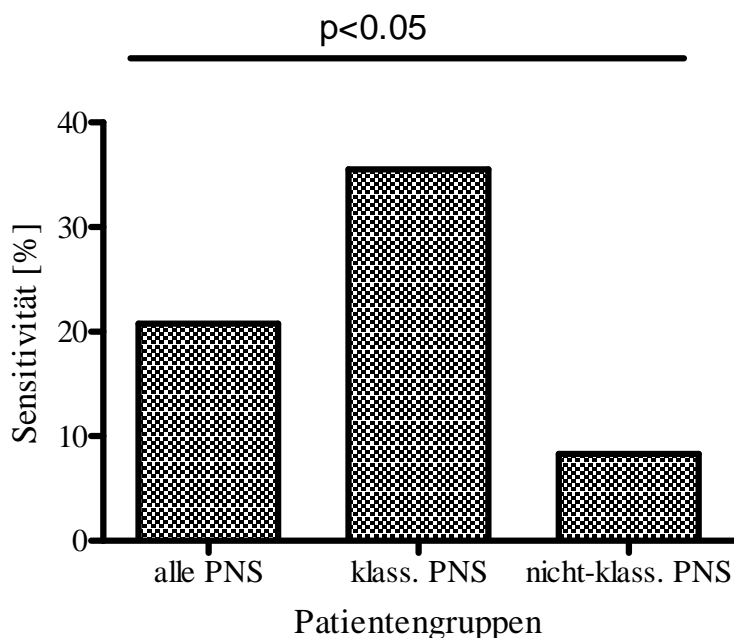


Abb. 5: Unterschiedliche Sensitivität des Western Blots von Euroimmun für die gesamte PNS- Gruppe und die klassische und nicht- klassische PNS- Gruppe

4.2.1 Die einzelnen antineuronalen Antikörper im Western Blot von Euroimmun

Dieser Test wies mit anti- Hu und anti- Yo Antikörpern nur zwei der mit diesem Test laut Herstellerangaben nachweisbaren drei antineuronalen Antikörper nach. Anti- Ri Antikörper wurden mit diesem Western Blot in keinem Patientenserum gefunden. Alle nachgewiesenen antineuronalen Antikörper gehörten zu Patientenseren der PNS-Gruppe.

Anti- Hu Antikörper

Der anti- Hu Antikörper wurde bei 11 von 76 PNS- Patienten gefunden. Neun der elf Befunde gehörten zu Patienten der klassischen PNS- Gruppe und die restlichen zwei wurden innerhalb der nicht- klassischen PNS- Gruppe nachgewiesen.

Anti- Yo Antikörper

Der anti- Yo Antikörper wurde bei 3 von 67 Patienten der PNS- Gruppe gefunden, davon zweimal innerhalb der klassischen und einmal innerhalb der nicht- klassischen PNS- Gruppe.

4.3 Western Blot von ravo

Mit dem Western Blot der Firma ravo wurden bei 16% (21/131) aller untersuchten Patienten antineuronale Antikörper nachgewiesen, die übrigen 84% (110/131) waren antineuronal negativ. Unter den positiven Seren waren auch zwei, bei denen der Western Blot jeweils zwei antineuronale Antikörper erkannte. Alle antineuronal positiven Seren gehörten zu Patienten der PNS- Gruppe. Es wurden keinerlei positive Befunde der Kontrollprobanden gefunden.

Anti- Hu Antikörper waren unter den nachgewiesenen antineuronalen Antikörpern mit 47.8% (11/23) am häufigsten vertreten. Anti- Yo Antikörper sind in fünf Seren und anti- CV2 Antikörper in vier Seren nachgewiesen worden. Bei zwei Patientenseren hat der Western Blot den anti- Ri Antikörper und in einem weiteren Fall einen anti- Amphiphysin Antikörper nachgewiesen. Laut Herstellerangaben kann mit diesem

Western Blot auch anti- Ma2 Antikörper bestimmt werden- dieser wurde unter den hier untersuchten 131 Patienten nicht gefunden.

Im Vergleich der PNS- Gruppe mit den Kontrollen ergibt sich für den Western Blot von ravo eine Sensitivität von 31.3% und eine Spezifität von 100% ($p < 0.001$, Tab. 18, Abb. 6). Da sich innerhalb der Kontrollgruppen keine positiven Befunde fanden, liegt die Spezifität durchgehend bei allen statistischen Berechnungen bei 100%.

Tab. 18: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von ravo für die PNS- Gruppe (a-d)

	a)		b)	
	PNS	Kontrollen	PNS	OND
antineuronal +	21	0	21	0
antineuronal -	46	64	46	34
	Sensitivität = 31.3 %			
	Spezifität = 100%			

	c)		d)		
	PNS	HC	PNS	OND	HC
antineuronal +	21	0	21	0	0
antineuronal -	46	34	46	34	30

Die antineuronal positiven Befunde innerhalb der klassischen PNS- Gruppe für sich betrachtet ergeben eine Sensitivität des Western Blots von ravo von 48.8% ($p < 0.001$, Abb. 6, Tab. 19), während sie für die nicht- klassischen PNS bei 16.7% liegt ($p < 0.005$, Abb. 6, Tab. 20).

Tab. 19: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von ravo für die klassische PNS- Gruppe (a-d)

	a)		b)	
	klass. PNS	Kontrollen	klass. PNS	OND
antineuronal +	15	0	15	0
antineuronal -	16	64	16	34
	Sensitivität = 48.4%			
	Spezifität = 100%			

	c)		d)		
	klass. PNS	HC	klass. PNS	OND	HC
antineuronal +	15	0	15	0	0
antineuronal -	16	30	16	34	30

Tab. 20: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von ravo für die nicht- klassische PNS- Gruppe

	a)		b)	
	nicht- klass. PNS	Kontrollen	nicht- klass. PNS	OND
antineuronal +	6	0	6	0
antineuronal -	30	64	30	34

Sensitivität = 16.7%
Spezifität = 100%

	c)		d)		
	nicht- klass. PNS	HC	nicht-klass. PNS	OND	HC
antineuronal +	6	0	6	0	0
antineuronal -	30	30	30	34	30

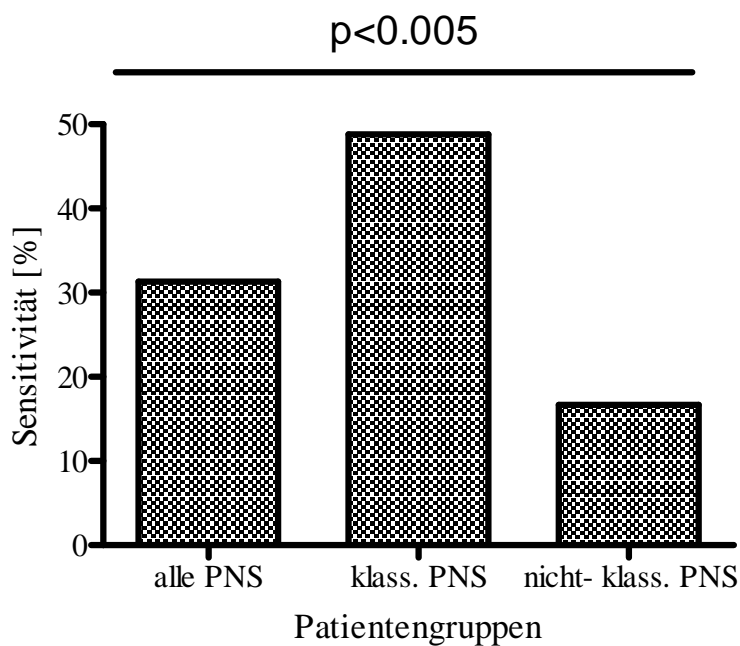


Abb. 6: Unterschiedliche Sensitivität des Western Blots von ravo für die gesamte PNS- Gruppen und die klassische und nicht- klassische PNS- Gruppe

4.3.1 Die einzelnen antineuronalen Antikörper im Western Blot von ravo

Von sechs laut Herstellerangaben mit diesem Testkit nachweisbaren antineuronalen Antikörpern wurden mit diesem Test innerhalb unseres Patientenkollektivs fünf nachgewiesen. Es handelt sich dabei in absteigender Häufigkeit um anti- Hu, anti- CV2, anti- Yo, anti- Ri und anti- Amphiphysin Antikörper. Anti- Ma2 Antikörper sind in keinem Patientenserum nachgewiesen worden. Alle antineuronalen Antikörper sind innerhalb der PNS- Gruppe nachgewiesen worden. In zwei Patientenseren fanden sich jeweils zwei antineuronale Antikörper nebeneinander: einmal anti-Hu und anti-Amphiphysin Antikörper und im zweiten Fall um anti- Hu und anti- Ri Antikörper.

Anti- Hu Antikörper

Anti- Hu Antikörper wurden bei 11 von 76 PNS- Patienten gefunden. Neun der elf Befunde gehörten zu Patienten der klassischen PNS- Gruppe und die restlichen zwei wurden innerhalb der nicht- klassischen PNS- Gruppe nachgewiesen.

Anti- CV2 Antikörper

Anti- CV2 Antikörper wurden bei 5 von 76 PNS- Patienten gefunden. Drei der fünf Befunde gehörten zu Patienten der klassischen PNS- Gruppe und die restlichen zwei wurden innerhalb der nicht- klassischen PNS- Gruppe nachgewiesen.

Anti- Yo Antikörper

Anti- Yo Antikörper wurden bei 4 von 76 PNS- Patienten gefunden. Jeweils zwei der Seren gehörten zu Patienten der klassischen resp. nicht- klassischen PNS- Gruppe.

Anti- Ri Antikörper

Der anti- Ri Antikörper wurde bei zwei Patienten der klassischen PNS- Gruppe nachgewiesen.

Anti- Amphiphysin

Der anti- Amphiphysin Antikörper wurde bei einem Patienten der klassischen PNS- Gruppe nachgewiesen.

4.4 Referenztestung nach Leitlinie

Bei der Referenztestung wurde der derzeitige Auswertestandard für antineuronale Antikörper des Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork [Graus et al. 2004] zugrunde gelegt. Dabei wurden Seren als positiv gewertet, bei denen sich in der indirekten Immunfluoreszenz und einem Bestätigungsverfahren ein antineuronaler Antikörper nachweisen ließ. Der anti- SOX1 Antikörper wurde dabei von einem externen Labor nachgetestet, da die von uns verwendeten Tests das rekombinante Autoantigen nicht enthielten.

Mittels Referenztestung sind in der Gruppe der Paraneoplasien 40.3% der Seren (27/67) als positiv gewertet worden. Unter den gesunden Kontrollen fanden sich keine positiven Seren und innerhalb der OND- Gruppe wurden 5.9% der Seren (2/34) als positiv gewertet.

Anti- Hu Antikörper sind unter den getesteten Seren am häufigsten vertreten (11/27), gefolgt von atypischen antineuronalen Antikörpern mit fünf Seren. Mit jeweils vier positiv gewerteten Seren in der Referenztestung folgen anti- CV2- Antikörper, anti- Yo und anti- Synaptophysin Antikörper.

Die Sensitivität der Referenztestung beträgt bezogen auf die gesamte PNS- Gruppe 40.3%. Die Spezifität beträgt bezogen auf die gesamte Kontrollgruppe 96.9%. Sie variiert zwischen 100% bezogen auf die gesunden Kontrollen und 94.1% im Vergleich zur OND- Gruppe ($p < 0.005$, Tab. 21, Abb. 7).

Tab. 21: Sensitivität und Spezifität der Referenztestung für die gesamte PNS- Gruppe (a-d)

	a)		b)	
	PNS	Kontrollen	PNS	OND
Referenztest +	27	2	27	2
Referenztest -	40	62	40	32
	Sensitivität = 40.3%		Sensitivität = 40.3%	
	Spezifität = 96.9%		Spezifität = 94.1%	

	c)		d)		
	PNS	HC	PNS	OND	HC
Referenztest +	27	0	27	2	0
Referenztest -	40	30	40	32	30
	Sensitivität = 40.3%		Sensitivität = 40.3%		
	Spezifität = 100%		Spezifität = 100%		

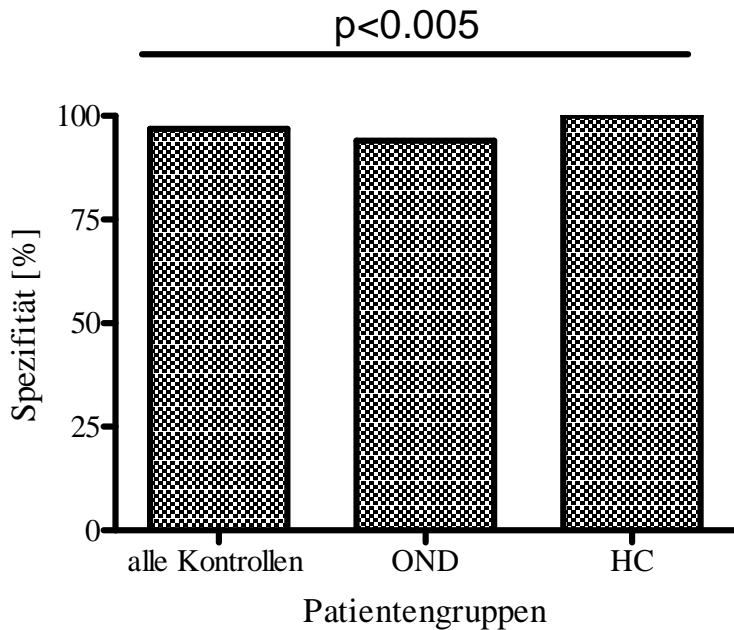


Abb. 7: Unterschiedliche Spezifität der Referenztestung für die PNS- Gruppe im Vergleich zwischen der gesamten Kontrollgruppe und beiden Kontrollgruppen einzeln

Innerhalb der klassischen PNS- Gruppe sind mit 54.8% (17/31) die meisten Seren im Referenztest als positiv gewertet worden.

Die Sensitivität der Referenztestung beträgt bezogen auf die klassische PNS- Gruppe 54.8%. Die Spezifität variiert entsprechend der Vergleichsgruppe innerhalb der Kontrollen zwischen 100% und 94.1% ($p < 0.0001$, Tab. 22, Abb. 7).

Anti- Hu Antikörper sind unter den getesteten Seren am häufigsten vertreten (9/17). Danach folgen anti- SOX1 Antikörper mit drei positiven Seren. Mit jeweils zwei positiv gewerteten Seren folgen anti- Yo und anti- CV2 Antikörper und einmalig wurden antineuronal atypische Antikörper nachgewiesen. Anti- Synaptophysin Antikörper sind nicht in den positiv gewerteten Seren aus der klassischen PNS- Gruppe vertreten.

Tab. 22: Sensitivität und Spezifität der Referenztestung für die klassische PNS- Gruppe (a-d)

	a)	b)
	klass. PNS	klass. PNS
Referenztest +	17	17
Referenztest -	14	14
	Kontrollen	OND
	2	2
	62	32
	Sensitivität = 54.8%	Sensitivität = 54.8%
	Spezifität = 96.9%	Spezifität = 94.1%
	c)	d)
	klass. PNS	klass. PNS
Referenztest +	17	17
Referenztest -	14	14
	HC	OND
	0	2
	30	32
	Sensitivität = 54.8%	Sensitivität = 54.8%
	Spezifität = 100%	Spezifität = 94.1%
		HC
		0
		30

Innerhalb der nicht- klassischen PNS- Gruppe sind 27.7% der Seren (10/36) im Referenztest als positiv gewertet worden. Die Sensitivität der Referenztestung bezogen auf die nicht- klassische PNS- Gruppe beträgt 27.8%. Die Spezifität entspricht je nach Vergleichsgruppe den vorgenannten Werten ($p < 0.005$, Tab. 23, Abb. 7).

Unter den positiv gewerteten Seren sind die antineuronalen Antikörper nahezu gleichermaßen nachgewiesen worden: jeweils zweimal anti- Hu Antikörper, anti- Yo Antikörper, anti- CV2 Antikörper und antineuronal atypische Antikörper. Jeweils einmal ist ein anti- Synaptophysin und ein anti- SOX1 Antikörper nachgewiesen worden.

Tab. 23: Sensitivität und Spezifität der Referenztestung für die nicht- klass. PNS- Gruppe (a-d)

	a)	b)
	nicht- klass. PNS	nicht- klass. PNS
Referenztest +	10	10
Referenztest -	26	26
	Kontrollen	OND
	2	2
	62	32
	Sensitivität = 27.8%	Sensitivität = 27.8%
	Spezifität = 96.9%	Spezifität = 94.1%
	c)	d)
	nicht- klass. PNS	nicht- klass. PNS
Referenztest +	10	10
Referenztest -	26	26
	HC	OND
	0	2
	30	32
	Sensitivität = 27.8%	Sensitivität = 27.8%
	Spezifität = 100%	Spezifität = 94.1%
		HC
		0
		30

Die Sensitivität der Referenztestung beträgt 40.3% für die gesamte PNS- Gruppe. Sie steigt auf 54.8% für die klassische PNS- Gruppe und fällt auf 27.8% für die nicht-klassische PNS- Gruppe (Abb. 8).

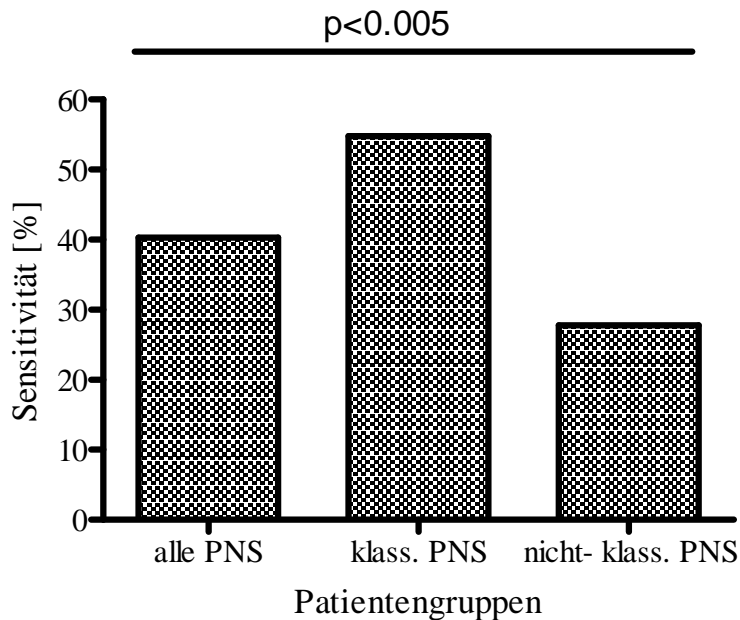


Abb. 8: Unterschiedliche Sensitivität der Referenztestung für die gesamte PNS- Gruppe und die klassische und nicht- klassische PNS- Gruppe

4.4.1 Die einzelnen antineuronalen Antikörper in der Referenztestung

anti- Hu Antikörper

Der anti- Hu Antikörper war mit elf positiven Seren der am häufigsten nachgewiesene antineuronale Antikörper. Davon fanden sich alle elf positiven Befunde innerhalb der PNS- Gruppe und kein einziger unter den Kontrollen. Neun der Seren gehörten zu Patienten der klassischen PNS- Gruppe und die anderen beiden der nicht- klassischen PNS- Gruppe.

antineuronal atypische Antikörper

Antineuronal atypische Antikörper sind insgesamt viermal nachgewiesen worden. Drei der Seren gehörten zu Patienten der PNS- Gruppe (zweimal zur klassischen und einmal zur nicht- klassischen Gruppe). Ein positiver Nachweis wurde innerhalb der OND- Gruppe geführt.

anti- Yo und anti- CV2 Antikörper

Autoantikörper zu diesen Antigenen wurden jeweils viermal nachgewiesen. Alle positiven Seren gehörten zu Patienten der PNS- Gruppe: jeweils zwei der Seren zur nicht- klassischen Gruppe und zwei zur klassischen Gruppe.

anti- SOX 1 Antikörper

Anti- SOX 1 Antikörper sind insgesamt fünfmal nachgewiesen worden. Drei der positiven Seren gehörten zu Patienten der klassischen PNS- Gruppe. Jeweils ein Serum fiel in die nicht- klassische PNS- Gruppe und eines in die OND- Gruppe.

4.5 Vergleich der antineuronal positiven Befunde zwischen den verschiedenen Testverfahren

Es gibt genau drei antineuronale Antikörper, die von allen Tests nachgewiesen wurden: es handelt sich dabei um anti- Hu, anti- Ri und anti- Yo/ Purkinjenzellzytoplasma Antikörper. Im Folgenden wird dargestellt, ob mit den verschiedenen Tests die Seropositivität bei denselben Patienten nachgewiesen worden sind.

anti- Hu Antikörper

Antikörper gegen das Hu- Antigen wurden von allen drei Tests in denselben elf Patientenserum gefunden. In der Referenztestung sind alle diese Seren als anti- Hu positiv gewertet worden. Es lag folglich eine vollständige Übereinstimmung zwischen den drei Tests und der Referenztestung für diesen antineuronalen Antikörper vor.

anti- Yo/ Purkinjenzellcytoplasma Antikörper

Antikörper gegen das Yo- Antigen sind von den verschiedenen Tests unterschiedlich oft nachgewiesen worden. Der Western Blot von Euroimmun wies drei positive Befunde nach, dieselben Seren waren auch im IFT und im Western Blot von ravo positiv getestet worden und in der Referenztestung als positiv gewertet worden. Mittels Referenztestung zeigte sich ein weiterer positiver Befund, dieser war nur von der indirekten Immunfluoreszenz und vom Western Blot von ravo als solcher erkannt worden.

Die Purkinjenzellcytoplasmafärbung im IFT ist nicht Yo- spezifisch. Mittels Immunfluoreszenz wurden zusätzlich zu den drei obigen Befunden noch drei weitere

anti- Purkinjezellcytoplasma- Antikörper gefunden, alle drei waren in beiden Western Blots negativ. In der Referenztestung wurden zwei dieser Seren als antineuronal atypisch positiv gewertet und einmal als antineuronal negativ.

Die Ergebnisse der Tests stimmen hinsichtlich des anti- Yo Antikörpers also nur teilweise überein.

anti- Ri Antikörper

Der Western Blot von Euroimmun hat im Gegensatz zu den beiden anderen Tests in keinem Serum den anti- Ri Antikörper nachgewiesen. Der Western Blot von ravo zeigte zwei positive Befunde an und in der indirekten Immunfluoreszenz war ein positiver Befund nachgewiesen worden- es handelte sich dabei allerdings um drei verschiedene Patientenseren. Keines dieser drei Seren wurde von dem Referenztest positiv auf anti- Ri Antikörper getestet. Es gibt keinerlei Übereinstimmung für die Ergebnisse der drei Tests bezüglich des Nachweises von anti- Ri Antikörpern.

antineuronal atypische Antikörper

Bei diesen Antikörpern handelt es sich definitionsgemäß um Antikörper, die in der Immunfluoreszenz nachgewiesen worden sind, aber in den kommerziell hergestellten Western Blots keinem spezifischen Antikörper zugewiesen werden können. In der vorliegenden Testreihe sind antineuronal atypische Antikörper in der indirekten Immunfluoreszenz insgesamt sechs Mal nachgewiesen worden. In diesen Seren ist mittels Western Blot der Firma ravo genau einmal ein Antikörper nachgewiesen worden, und zwar anti- CV2 Antikörper, welcher auch in der Referenztestung als positiv diesbezüglich gewertet wurde.

Die restlichen fünf positiven Seren zeigten keinerlei Reaktivitäten im ravo Blot.

Anders verhält es sich mit dem Western Blot der Firma Euroimmun: Hier zeigten sich in drei der sechs im IFT als antineuronal atypische Antikörper getesteten Seren Reaktivitäten in unterschiedlichen kD- Bereich, diese waren allerdings nicht positiv bei der Testung der rekombinanten Antigene Hu, Yo und Ri. Eines dieser Seren war in der Referenztestung als antineuronal atypisch positiv gewertet worden.

In der Referenztestung waren zwei der im IFT positiven und in beiden Western Blots negativen Seren als negativ gewertet worden. Bei zwei weiteren Seren mit dieser Konstellation an Resultaten zeigte sich einmal ein anti- Synaptophysin- Antikörper und einmal eine positive Wertung für einen für antineuronal atypischen Antikörper.

antigliale nukleäre Antikörper

Dieser Antikörper ist vom Western Blot von Euroimmun insgesamt zehnmal nachgewiesen worden. Fünfmal innerhalb der OND- und fünfmal innerhalb der PNS-Gruppe. In der Referenztestung zeigten sich bei diesen Seren drei positive anti- SOX 1 Antikörper Befunde der PNS- Gruppe und ein weiterer innerhalb der OND- Gruppe.

4.6 Vergleich der unterschiedlichen Testverfahren

Mittels indirekter Immunfluoreszenz sind in dem vorliegenden Patientenkollektiv die meisten antineuronalen Antikörper nachgewiesen worden, gefolgt vom Western Blot der Firma ravo und mittels Western Blot der Firma Euroimmun ließen sich die wenigsten antineuronal positiven Seren nachweisen.

4.6.1 Vergleich Immunfluoreszenz und Western Blot von Euroimmun

Mittels IFT sind mit 35 von 131 Seren mehr als doppelt so viele positive Seren wie mittels Western Blot (14/131) nachgewiesen worden. Die Sensitivität der Immunfluoreszenz ist dementsprechend mehr als doppelt so hoch (43.3% resp. 20.8%). Auch bei Auswertung der PNS- Untergruppen ist die Sensitivität des Western Blots geringer. Die Sensitivität der Immunfluoreszenz bezogen auf die klassische PNS-Gruppe beträgt 58% resp. 35.5% von Euroimmun und errechnet sich für die nicht-klassische PNS- Gruppe auf 30.6% für die IFT resp. 8.3% des Western Blots von Euroimmun.

Wird die Spezifität der Testverfahren untersucht, erreicht der Western Blot höhere Werte: Mittels Western Blot ist kein einziger positiver Nachweis innerhalb der Kontrollgruppe geführt worden, dies entspricht einer Spezifität von 100%. Mittels Immunfluoreszenz sind sechs antineuronal positive Befunde innerhalb der OND-Gruppe (5x AGNA und einmal anti- Purkinjenzellcytoplasma) gefunden worden. Die Spezifität der Immunfluoreszenz bezogen auf die gesamte Kontrollgruppe beträgt 90.6% und sinkt auf 82.4% bezogen auf die OND- Gruppe.

4.6.2 Vergleich Immunfluoreszenz und Western Blot von ravo

Mittels Western Blot sind 21 von 131 Seren als positiv getestet worden, es errechnet sich daraus eine Sensitivität von 31.3%, diese liegt unter der Sensitivität der Immunfluoreszenz. Auch bezogen auf die PNS- Untergruppen unterliegt der Western Blot: für die klassische PNS- Gruppe zeigt sich eine Sensitivität des Western Blots von 48.8%, während der IFT 58% erzielt. Für die nicht- klassische PNS- Gruppe errechnen sich Werte von 16.7% für den Western Blot von ravo, dies ist nahezu nur halb so hoch wie die Sensitivität der Immunfluoreszenz mit 30.6%.

Die Spezifität des Western Blots liegt bei 100%, da kein positiver Nachweis innerhalb der Kontrollgruppe geführt wurde.

4.6.3 Vergleich Western Blot von Euroimmun und Western Blot von ravo

Die Sensitivität des Western Blots von Euroimmun ist mit 20.8% um ein Drittel niedriger als die Sensitivität des Western Blots von ravo, welche bei 31.3% liegt. Dies ist auch bei der Analyse der PNS- Untergruppen der Fall: klassische PNS 35.5% resp. 48.8% von ravo und nicht- klassische PNS 8.3% resp. 16.7% bei ravo.

Die Spezifitäten der beiden Testkits sind identisch mit 100%.

4.7 Vergleich der Referenztestung mit einzelnen Testverfahren

4.7.1 Vergleich der Referenztestung mit der indirekten Immunfluoreszenz

Mittels Referenztestung sind 22.1% aller Seren (29/131) als antineuronal positiv gewertet worden. Zwei dieser Seren gehören zu Patienten der OND- Gruppe. Aus diesen Daten errechnet sich eine Sensitivität der Referenztestung von 40.3% im Vergleich zur gesamten PNS- Gruppe. Bezogen auf die jeweiligen Untergruppen steigt die Sensitivität auf 54.8% für die klassische PNS- Gruppe und sinkt auf 27.8% für die nicht- klassische PNS- Gruppe. Die Spezifität der Referenztestung variiert je nachdem mit welcher Kontrollgruppe verglichen wird von 94.1% für die OND- Gruppe zu 100% für die gesunden Kontrollen. Für die gesamte Kontrollgruppe errechnet sich für die Referenztestung eine Spezifität von 96.9%.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz sind 26.7% aller Seren (35/131) als antineuronal positiv getestet worden. Sechs dieser Seren gehören zu Patienten der OND- Gruppe. Aus diesen Daten errechnet sich eine Sensitivität der indirekten Immunfluoreszenz von 43.3% im Vergleich zur gesamten PNS- Gruppe. Bezogen auf die jeweiligen Untergruppen steigt die Sensitivität auf 58% für die klassische PNS- Gruppe und sinkt auf 30.6 % für die nicht- klassische PNS- Gruppe.

Die Spezifität der indirekten Immunfluoreszenz variiert je nachdem mit welcher Kontrollgruppe verglichen wird von 82.4% für die OND- Gruppe zu 100% für die gesunden Kontrollen. Für die gesamte Kontrollgruppe errechnet sich für die indirekte Immunfluoreszenz eine Spezifität von 90.6% (Abb. 9, Abb. 10).

Die indirekte Immunfluoreszenz hat für die Sensitivität stets höhere Werte erzielt als die Referenztestung. Dies trifft sowohl für die gesamte PNS- Gruppe zu als auch für die beiden Untergruppen klassische und nicht- klassische PNS einzeln betrachtet. Die Unterschiede betragen 3%. Beide Tests haben antineuronal positive Seren innerhalb der OND- Gruppe nachgewiesen, die Spezifität bezogen auf alle Kontrollen liegt unter 100% und ist für die indirekte Immunfluoreszenz niedriger als für die Referenztestung, da im ersteren Test anteilig mehr antineuronal positive Seren in der OND- Gruppe nachgewiesen wurden. Bezogen auf die gesunden Kontrollen wird jeweils 100% Spezifität erzielt.

4.7.2 Vergleich der Referenztestung mit dem Western Blot von Euroimmun

Mittels Western Blot von Euroimmun sind 10.7% aller Seren (14/131) als antineuronal positiv getestet worden. Alle Seren gehören zu Patienten der PNS- Gruppe. Aus diesen Daten errechnet sich eine Sensitivität des Western Blots von 20.8% im Vergleich zur gesamten PNS- Gruppe. Bezogen auf die jeweiligen Untergruppen steigt die Sensitivität auf 35.5% für die klassische PNS- Gruppe und sinkt auf 8.3% für die nicht- klassische PNS- Gruppe. Die Spezifität des Western Blots liegt stets bei 100%.

Der Western Blot von Euroimmun hat für die Sensitivität deutlich niedrigere Werte erzielt als die Referenztestung. Bezogen auf die gesamte PNS- Gruppe war die Sensitivität des Western Blots nur halb so hoch wie für die Referenztestung (20.8% vs. 40.3%). Dieser große Unterschied findet sich in der Untergruppe der nicht- klassischen PNS wieder: hier beträgt die Sensitivität des Western Blots weniger als ein Drittel der Sensitivität der Referenztestung (8.3% vs. 27.8%). Die Sensitivität bezogen auf die klassische PNS ist auch niedriger als die der Referenztestung, hier ist der Unterschied nicht ganz so groß (35.5% vs. 54.8%). Die Spezifität des Western Blots erreicht 100% und ist damit höher als die Spezifität der Referenztestung mit 96.9%.

4.7.3 Vergleich der Referenztestung mit dem Western Blot von ravo

Mittels Western Blot von ravo 16% aller Seren (21/131) als antineuronal positiv getestet worden. Alle Seren gehören zu Patienten der PNS- Gruppe. Aus diesen Daten errechnet sich eine Sensitivität des Western Blots von 31.3% im Vergleich zur gesamten PNS- Gruppe. Bezogen auf die jeweiligen Untergruppen steigt die Sensitivität auf 48.8% für die klassische PNS- Gruppe und sinkt auf 16.7% für die nicht- klassische PNS- Gruppe. Die Spezifität des Western Blots liegt stets bei 100%.

Der Western Blot von ravo hat für die Sensitivität bezogen auf die gesamte PNS- Gruppe niedrigere Werte erzielt als die Referenztestung mit ihren 40.3%. Dies gilt auch für die Untergruppen klassische (48.8% vs. 54.8%) und nicht-klassische PNS (16.7% vs. 27.8%). Die Spezifität des Western Blots erreicht 100% und ist damit höher als die Spezifität der Referenztestung mit 96.9%.

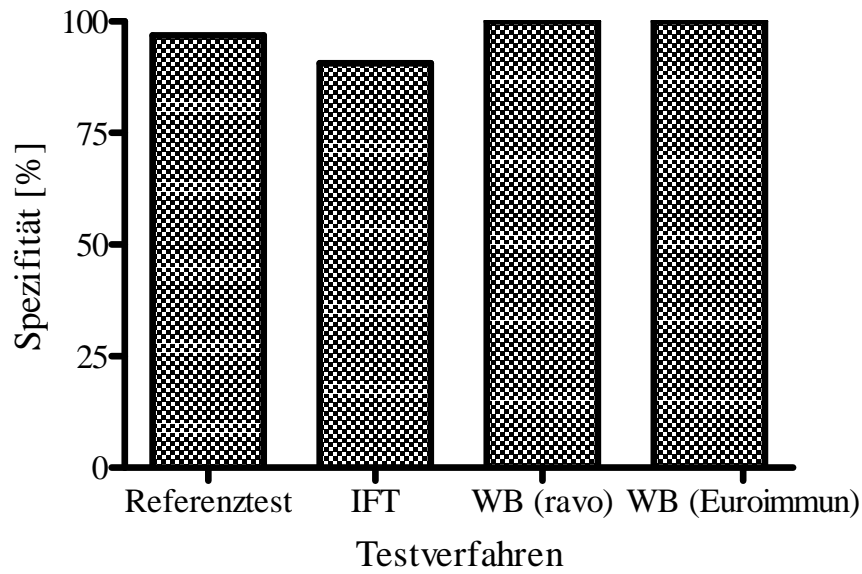


Abb. 9: Spezifität der einzelnen Testverfahren bezogen auf die gesamte Kontrollgruppe

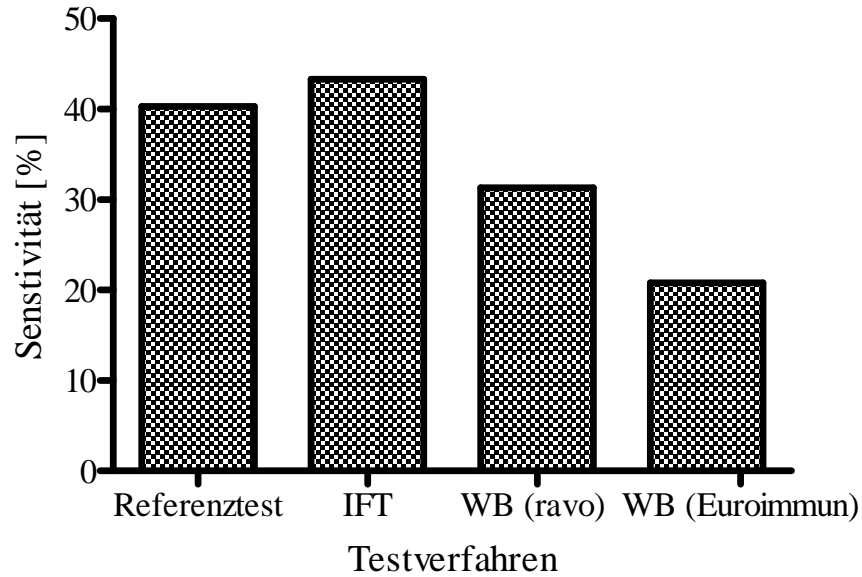


Abb. 10: Sensitivität der einzelnen Testverfahren bezogen auf die gesamte PNS- Gruppe

5 Diskussion

Antineuronale Antikörper haben eine mäßige Sensitivität (50-60%) und eine hohe Spezifität (95-98%) in der Diagnostik eines paraneoplastischen neurologischen Syndroms [Moll et al. 1990, Blaes 2002]. Bereits 1995 gab es eine Konsensuskonferenz zur Detektion antineuronaler Antikörper. Die indirekte Immunfluoreszenz und der Western Blot wurden als primäre Testsysteme für die Suche von antineuronalen Antikörpern bei paraneoplastischen neurologischen Syndromen deklariert. Damals beklagten die Autoren den Mangel an Studien zur Sensitivität oder Spezifität der unterschiedlichen Testsysteme [Moll et al. 1995]. Seit 2004 gibt es Diagnosekriterien und die Autoren müssen weiterhin einräumen, dass die Studienlage zu standardisierten Methoden für den Nachweis der onkoneuronalen Antikörper unverändert dürftig ist [Graus et al. 2004]. Sie empfehlen weiterhin die Verwendung von Immunhistochemie und Western Blot mit rekombinanten Proteinen und wissen um die Einschränkungen der Methoden. Überraschenderweise wurde die Diagnostik mit einer Kombination beider Methoden seitdem kaum untersucht.

Die vorliegende Arbeit evaluierte daher die Kombination der indirekten Immunfluoreszenz auf Primatenkleinhirn, Primatengroßhirn, Primatendarm und HEp-2 Zellen und Western Blot mit rekombinanten Proteinen und mit Antigen-Extrakten aus Primaten-Kleinhirn zum Nachweis von antineuronalen Autoantikörpern bei PNS.

Bei den Einzelverfahren hat die indirekte Immunfluoreszenz im Vergleich zu den beiden Western Blot Kits für den Nachweis von antineuronalen Antikörpern mit 43.3 % die höchste Sensitivität erzielt, d.h. die Methode hat innerhalb der Patientengruppe der Paraneoplasien die meisten antineuronalen Autoantikörper nachgewiesen. Der Unterschied zu den anderen beiden Verfahren ist beachtlich, mittels Immunfluoreszenz sind mehr doppelt so viele seropositive Patienten (35) gefunden worden wie mit dem Western Blot Testkit des Herstellers Euroimmun (14). Im Vergleich zum Western Blot des Herstellers ravo (21) ist ein Drittel mehr nachgewiesen worden.

Die höchste Sensitivität lässt sich innerhalb der gesamten PNS-Gruppe (43.3%) sowie den beiden Untergruppen aus klassischen (58%) und nicht klassischen Paraneoplasien (30.6%) errechnen. Unter den nachgewiesenen antineuronalen Autoantikörpern finden sich gleichermaßen welche, die in die Kategorie 'gut charakterisiert' oder 'teilweise

charakterisiert' fallen [Leitlinien zu Paraneoplastischen Neurologischen Syndromen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie].

Damit konnten wir in der vorliegenden Studie zeigen, dass die indirekte Immunfluoreszenz als Verfahren mit der höchsten Sensitivität sehr gut zum initialen Screenen auf antineuronale Autoantikörper bei Verdacht auf eine paraneoplastische Ätiologie eines neurologischen Syndroms geeignet ist. Mit diesen Daten unterstützen wir die bereits 1995 auf einem Workshop geforderte Vorgehensweise [Moll et al. 1995]. Diese Leitlinien sind bisher allerdings kaum mit validen Studienergebnissen belegt worden [Graus et al. 2004].

Ein Screeningverfahren sollte aus mindestens zwei Gründen eine hohe Sensitivität aufweisen: Zum Einen ist es aus diagnostischen Gründen wichtig. In Abb. 1 wird die Schlüsselposition der Autoantikörperdiagnostik ersichtlich. Eine hohe Sensitivität ist dabei erforderlich um so viele seropositive Patienten wie möglich innerhalb des jeweiligen Patientenkollektivs zu finden. Das ist insbesondere im ersten Schritt wichtig, weil sonst die Differenzialdiagnose einer paraneoplastischen Ätiologie nicht gestellt wird, die weitere Evaluation dahingehend nicht erfolgt und es zu (vielen zu dem Zeitpunkt noch) unerkannten Fällen von Malignomen führen kann.

Ein Beispiel hierfür haben wir innerhalb unseres eigenen Patientenkollektivs gefunden: die initiale Vorstellung der 60-jährigen Patientin erfolgte zur Abklärung einer Polyneuropathie und bei der Aufarbeitung derselben konnte mittels Immunfluoreszenz ein Purkinjellplasma- Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden. In den Bestätigungstests mittels Western Blot konnte weder bei ravo noch bei Euroimmun eine Bande nachgewiesen werden, der Purkinjellantikörper war auch nicht spezifisch für den anti- Yo Antikörper. Die Polyneuropathie wurde dementsprechend nicht als paraneoplastisch eingestuft. Mehr als drei Jahre später wird bei der Patientin ein Schilddrüsen-Karzinom diagnostiziert, an welchem sie operiert wird. Retrospektiv muss die Polyneuropathie damit als nicht-klassisches paraneoplastisches Syndrom gewertet werden. Diese Einordnung ist nur mittels indirekter Immunfluoreszenz gelungen, und nicht mit den Verfahren des Western Blots, beide haben sich als nicht sensitiv genug erwiesen, da das zugrundeliegende Antigen eben nicht bekannt ist. Die Diagnose des Schilddrüsen-Karzinoms erfolgte nach Abschluss der Datenerhebung, der Fall kann somit nur als Anmerkung dienen und findet sich nicht in der Statistik wieder.

Zum anderen ist die Verwendung eines sehr sensitiven Testverfahrens zum Screenen aus wissenschaftlichen Gründen wichtig um neue antineuronale Autoantikörper zu

finden. Hierfür eignet sich die indirekte Immunfluoreszenz sehr gut: durch den parallelen Einsatz von verschiedenen Substraten von Primatengeweben (z.B. Darm, Großhirn, Kleinhirn) und von humanen Larynxepitheliumzellen entsteht eine reiche Quelle von möglichen onkoneuralen Antigenen. Die neu gefundenen antineuronalen Antikörper würden gemäß den Kriterien für die Einteilung in 'gut charakterisiert' und 'teilweise charakterisiert' in letztere Gruppe fallen und damit möglicherweise zur Diagnose eines nicht-klassischen PNS führen. Auch für diese Untergruppe der nicht-klassischen Paraneoplasien hat die indirekte Immunfluoreszenz die höchste Sensitivität erzielt.

Aber selbst wenn im IFT kein onkoneuraler Autoantikörper nachgewiesen worden ist, kann der klinisch tätige Arzt daraus weitere diagnostische Schritte ableiten. Bei fast einem Viertel der Seren (24%) unseres Patientenkollektivs (23/96), die antineuronal negativ getestet worden sind, haben wir Antikörper gegen andere Strukturen nachgewiesen, darunter vorwiegend ANA positive Seren. Der IFT auf HEp-2-Zellen erfasst nahezu alle Spezifitäten der ANA. Mit dem IFT werden der Antikörper-Titer und das Immunfluoreszenz-Muster bestimmt. Das Immunfluoreszenz-Muster liefert erste orientierende Hinweise auf die Lokalisation des Zielantigens und auf die zu Grunde liegende Autoimmunerkrankung. ANA sind kennzeichnend für die Krankheitsgruppe der Kollagenosen (z.B. SLE, medikamenteninduzierter LE, Sharp-Syndrom, CREST-Syndrom, Dermatomyositis, Polymyositis, Sklerodermie, rheumatoide Arthritis) aber auch für verschiedene organspezifische Autoimmunerkrankungen (z. B. chronisch aktive Autoimmunhepatitis).

Die höhere Antigendichte im Vergleich zu den beiden Western Blot Kits wirkt sich in diesem Zusammenhang als Vorteil aus: für die Diagnostik unklarer Autoimmunphänomene ist die indirekte Immunfluoreszenz besser geeignet, da die Suche nicht auf einige wenige Autoantikörper limitiert ist, wie das beim Western Blot der Fall ist. Beim Hersteller ravo kommt diese Tatsache noch mehr zum Tragen, da hier ausschließlich rekombinante Antigene verwendet werden.

Dies kann neben der wissenschaftlichen auch eine klare klinische Bedeutung haben [Tschernatsch et al. 2005]. Die Arbeitsgruppe konnte eine klinisch abgrenzbare Subgruppe (vorwiegend sensorische Polyneuropathie, nie mit Lungen- Ca assoziiert, häufiger mit Mamma- Ca assoziiert und ohne ZNS- Beteiligung) auch immunologisch näher charakterisieren: bei den Patienten konnten keine antineuronalen Autoantikörper nachgewiesen werden, sie waren jedoch alle ANA positiv getestet worden. Sie

zeichneten sich durch andere zugrunde liegende Tumore und einen günstigeren Verlauf aus (als die ANA negativ getesteten Patienten). Diese Befunde sind ausschließlich im IFT erhoben worden und wären nur beim Testen mit einem speziellen Western Blot Kit für ANAs aufgefallen.

Die Spezifität der indirekten Immunfluoreszenz in der vorliegenden Studie liegt bei 90.6%. Bei der Berechnung dieses statistischen Wertes spielt der Nachweis von antineuronal positiven Seren innerhalb der Kontrollgruppen die entscheidende Rolle. Mittels IFT ist innerhalb der OND- Gruppe fünfmal der antigliale nukleäre Autoantikörper und einmal ein anti-Purkinjecellcytoplasma- Antikörper nachgewiesen worden. Andere Autoantikörper sind nicht nachgewiesen worden. Mittels Western Blot sind in keiner der beiden Kontrollgruppen seropositive Befunde erhoben worden. Der Western Blot erzielte demnach mit 100% stets eine höhere Spezifität als die Immunfluoreszenz. Betrachtet man allerdings nur die drei respektive sechs Autoantikörper, die mittels der beiden Kits im Western Blot laut Herstellerangaben nachweisbar sind (anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, anti-Ma, anti-Amphiphysin und anti-CV2 Antikörper), lägen eigentlich gleiche Spezifitäten vor, denn im IFT sind keine dieser Autoantikörper in den beiden Kontrollgruppen nachgewiesen worden. Diese Ergebnisse sind damit ein Beispiel für die enge Verknüpfung zwischen Spezifität und Sensitivität: die Immunfluoreszenz hat die höhere Sensitivität erzielt und die Spezifität ist niedriger ausgefallen als bei den beiden Western Blot Kits. Bei der Referenztestung verhält es sich ähnlich: Die Sensitivität ist niedriger als die Sensitivität der Immunfluoreszenz, aber die Spezifität ist höher als die der Immunfluoreszenz. Diese Werte für die Referenztestung entstehen dadurch, dass in ihren Berechnungen auch die Testcharakteristika der beiden Western Blots berücksichtigt sind. Diese erzielten jeweils niedrigere Sensitivitäten und höhere Spezifitäten als die Immunfluoreszenz.

Betrachtet man diese sechs antineuronal positiven Befunde innerhalb der OND- Gruppe in der Immunfluoreszenz im Einzelnen, stellen wir fest, dass zwei davon im Referenztest ebenfalls als positiv gewertet wurden. Ein Serum zeigte im IFT einen antigliale nukleären Antikörper, dieses wurde in der Referenztestung als anti- SOX1 positiv gewertet. Ein anti- Purkinjecellcytoplasma positives Serum wurde im Referenztest als antineuronal atypisch gewertet und auch im Western Blot von Euroimmun zeigten sich unspezifische Bindungen in verschiedenen kD- Bereichen. Diese beiden Fälle zeigen, dass diese seropositiven Befunde innerhalb der OND- Kontrollgruppe zwar die Spezifität der Immunfluoreszenz senken, aber gleichzeitig

wichtige Informationen liefern für die Evaluation eines neurologischen Syndroms hinsichtlich einer paraneoplastischen Ätiologie. Diesen seropositiven Befund wird der anfordernde Arzt in seiner Wahl des Beobachtungszeitraumes und bildgebender Verfahren für das mögliche Auftreten eines Malignoms berücksichtigen. Ein entsprechendes Beispiel haben wir oben bereits mit der an einem Schilddrüsen-Karzinom erkrankten Patientin aufgeführt.

Aufgrund der jeweiligen Testcharakteristika sollte die genaue Reihenfolge und Priorisierung bei der Anwendung der einzelnen Testverfahren wohlüberlegt sein. Die einzelnen Befunde haben eine Fehlerquote, die bei der weiteren Vorgehensweise berücksichtigt werden muss. Die Spezifität hängt wie oben bereits dargestellt sehr von der Auswahl der Kontrollgruppen ab. Es gibt Arbeitsgruppen, die ausschließlich gesunde Blutspender als Kontrollgruppe favorisieren um die Testeffizienz zu steigern [Ulvestad et al. 2000]. Zum einen lassen sich damit zwar Testcharakteristika besser miteinander vergleichen und der Studienaufbau ist zugegebenermaßen einfacher. Dies würde allerdings nicht dem klinischen Alltag entsprechen. Hier geht es ja vorwiegend darum, Patienten mit neurologischen Symptomen hinsichtlich einer paraneoplastischen Ätiologie zu evaluieren. Bei gesunden Personen ohne Malignom und ohne neurologische Defizite besteht keine Notwendigkeit Tests auf das Vorliegen von paraneoplastischen neurologischen Autoantikörpern durchzuführen.

In unserer Arbeit konnten wir zudem zeigen, dass gerade das Testen gegen Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen die Spezifität des IFT senkt. Innerhalb der OND-Gruppe fanden sich mittels IFT sechs positive Befunde. Mittels Western Blot fanden sich keine seropositiven Befunde. Betrachteten wir für den IFT den Vergleich zwischen nicht- klassischen PNS und OND konnten keine statistisch signifikanten Daten erhoben werden. Hier darf der IFT nicht als einziges Testverfahren angewendet werden, sondern der Vergleich zwischen nicht- klassischen PNS und OND und erfordert ein zweites Testsystem.

Die indirekte Immunfluoreszenz ist ein etabliertes Verfahren und stellt in der Autoantikörperdiagnostik der Rheumatologie die häufigste Methode zur initialen Evaluation dar. Als Substrat wurde früher häufig Nagetiergewebe benutzt, mittlerweile hat sich HEp2- als Substrat durchgesetzt und gilt als Goldstandard [Jaskowski et al. 1996]. HEp2 ist sensitiver für den Nachweis von ANA und des weiteren exprimieren Nagetiere kein Ro (SS-A) Antigen [Forslid et al. 1994]. Ähnliches gilt für die paraneoplastischen neurologischen Syndrome, die meisten Arbeitsgruppen benutzen die

humanen Larynxepitheliumzellen als Substrat: diese sind auf einer Glasfläche fixiert und ermöglichen damit die Abgrenzung der zellulären von subzellulär gelegenen Strukturen. Es wird empfohlen die Fixierung mit Aceton vornehmen zu lassen, weil die Verwendung von Ethanol oder Methanol das Ro (SS-A) Antigen aus ihrer Bindung lösen kann [Kavanaugh et al. 2000].

Weitere Aspekte, die es bei der Verwendung der indirekten Immunfluoreszenz zu berücksichtigen gilt, hängen vor Allem mit dem Merkmal der Semiquantität zusammen. Die Auswertung erfordert qualifiziertes Personal und ist zeitaufwändig, obwohl die Methode per se aufgrund der Materialkosten als günstig einzustufen ist. Die Ergebnisse variieren je nach Lichteinfluss/ Tageszeit während der mikroskopischen Auswertung, können durch die Hintergrundaktivität verfälscht werden, und es ist nicht möglich sie zu konservieren bei nur begrenzter Leuchtkraft der Immunfluoreszenz [Kern et al. 2000]. Aufgrund der semiquantitativen Auswertung ist die indirekte Immunfluoreszenz nur bedingt der Automatisierung zugänglich. Eine deutsche Arbeitsgruppe in Leipzig hat sich mit dieser Herausforderung befasst und eine möglicherweise vielversprechende Computersoftware entwickelt: Repräsentative Muster werden von einem Operator mit einer Digitalkamera aufgenommen und an den Computer übermittelt. Mithilfe einer geeigneten Software lassen sich daraus charakteristische Merkmale dieses Musters ermitteln und im System speichern. Das System kann dann nach vorheriger Klassifikation die wichtigsten Muster zwischen positiven und negativen Serien unterscheiden. Das konzipierte Computerprogramm soll nach Angaben der Arbeitsgruppe als Vorstufe beim Untersuchen der gefärbten Gewebe fungieren und danach soll eine differenzierte Auswertung durch qualifiziertes Personal erfolgen [Sack et al. 2003].

Unabhängig von diesen verfahrensspezifischen Merkmalen mangelt es auch an einem klaren Protokoll zur Aufbereitung der Gewebe, Verdünnung der Proben und weiteren Aspekten. Es resultieren daraus methodische Unterschiede zwischen den Studien, deren Einfluss auf die Resultate und die diagnostische Genauigkeit des untersuchten Verfahrens schwer bis kaum zu beurteilen sind.

Die Arbeitsgruppe um Kern hat in einer Studie diese Unterschiede bei der Verwendung der indirekten Immunfluoreszenz untersucht [Kern et al. 2000]. Dabei wurden antinukleäre Autoantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen, einmal mit HEp-2- Zellen als Substrat und einmal mit Rattenleber und das jeweils in zwei unterschiedlichen Laboren und unterschiedlichen Mitarbeitern am Mikroskop. Die

generelle Übereinstimmung der Beurteilung der ANA-Muster betrug (nur) 50% und lag bei etwa 70% wenn man ausschließlich zwischen seropositiven und seronegativen Befunden unterschied. Wenn man die Auswertung der ANA- Muster auf dem gleichen Substrat (hier auf HEp-2) verglich, kam man zu einer Übereinstimmung von 86.5%. In diesen Werten spiegelt sich die Semiquantität wider.

Auf dem letzten Workshop zum Thema des Nachweises von paraneoplastischen antineuronalen Autoantikörpern ist beschlossen worden, dass die initiale Suche nach neuen Autoantigenen eigentlich mit humanem cerebralem Gewebe erfolgen sollte [Moll et al. 1995]. Mit der Frage nach dem richtigen Substrat beschäftigten sich bereits mehrere Arbeitsgruppen. Eine italienische Arbeitsgruppe verglich mehrere immunhistochemische Methoden und fand heraus, dass die IFT mit gefrorenen Nagetier- Cerebellum- Schnitten als Substrat die höchste Sensitivität erzielte. Gleichzeitig zeigten sie Nachteile der anderen Verfahren: unter anderem konnte der anti- GAD- Antikörper nur mittels Avidin- Biotin- Immunperoxidase Methode nachgewiesen werden [Nano et al. 2003].

In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir ein Neurologie Mosaik der Firma Euroimmun für die indirekte Immunfluoreszenz. Hier wird eine Kombination aus verschiedenen Substraten parallel eingesetzt: Primatenklein und -großhirn, Primatennerven, Primatenrückenmark, -pons und -temporallappen, des weiteren Leber, Darm und Pankreas des Affen. Im gleichen Testansatz werden auch HEp2-Zellen mit Patientenserum inkubiert. Diese Kombination an Substraten ermöglicht eine Abgrenzung der vorliegenden Antikörper. Liegen Antikörper gegen die Antigene Hu und Ri vor, zeigen nahezu alle Neuronenkerne des Kleinhirns und Großhirns eine granuläre Fluoreszenz. Mit dem Darmsubstrat lässt sich zwischen diesen beiden Antikörpern differenzieren: Anti- Hu- Antikörper reagieren im Darm mit den Zellkernen des Plexus myentericus, anti- Ri- Antikörper dagegen nicht. Durch den Einsatz von Primatenkleinhirn und Primatenleber oder HEp2- Zellen kann eine sichere Abgrenzung von Antikörpern mit neuronaler Spezifität zu anderen Autoantikörpern, insbesondere zu ANA im gleichen Testansatz erfolgen. Fluoreszieren die Kerne oder das Cytoplasma aller Zellen eines Reaktionsfeldes, so enthält die Probe Autoantikörper gegen Zellkerne, Mitochondrien oder andere Zellbestandteile.

In einer weiteren Studie ließ sich der Antikörper gegen Amphiphysin mit verschiedenen Substraten in zwei Immunfluoreszenzen unterschiedlich gut nachweisen. Als Vergleich diente ein Immunoblot, mit welchem neun seropositive Befunde erhoben worden waren.

Mittels IFT auf humanem Cerebellum ließ sich der Antikörper in der üblichen Serumverdünnung nicht nachweisen, dies gelang erst bei höherer Serumkonzentration in acht von neun Fällen. Bei der Verwendung von Ratten Cerebellum und der Avidin-Biotin-Immunoperoxidase Methode zeigte sich eins von neun Seren positiv. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die optimale immunhistochemische Methode sich von Autoantikörper zu Autoantikörper unterscheidet und ggf. auch von den üblichen Untersuchungsprotokollen abgewichen werden muss [Saiz et al. 1999]. Allerdings entwickelte kein einziger dieser seropositiven Patienten die entsprechende Klinik eines Stiff- Man- Syndroms und es lag auch keine statistische Korrelation zu den jeweiligen Tumoren oder dem PNS vor. Dies kann mit der niedrigen Konzentration der nachgewiesenen Autoantikörper zusammenhängen. Bereits beim anti- Hu- Antikörper ist gezeigt worden, dass niedrige Autoantikörper- Titer wahrscheinlich kein PNS bedeuten [Dalmau et al. 1992].

Gleiches gilt für den Nachweis von antinukleären Antikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz. ANA mit geringen Titern, welche polyreaktiv sind und der IgM-Klasse angehören, kommen vor Allem bei nicht an SLE erkrankten Patienten vor [Tan et al. 1997]. Die indirekte Immunfluoreszenz auf humanen Larynx- Epitheliumzellen besitzt mit >90% eine hohe Sensitivität für ANA [Kavanaugh et al. 2000, Ulvestad et al. 2000] und gilt deswegen als sehr gute Screening- Methode für den Nachweis von ANA [Tan et al. 1997]. Eine Sensitivität von 100% kann beim Testen auf ANA nie erreicht werden, da nicht alle an systemischem Lupus erythematoses erkrankten Patienten antinukleäre Antikörper aufweisen. Die Spezifität des ANA Nachweises im IFT ist wiederum mit 49% gering [Bonilla et al. 2007], da antinukleäre Antikörper zum Einen bei Gesunden nachweisbar sind und zum Anderen auch bei anderen Erkrankungen als SLE auftreten [Übersicht in Kavanaugh et al. 2000]. Nach Ermitteln der hohen Prävalenz von ANA unter der gesunden Bevölkerung musste der Cut- off in der Immunfluoreszenz zur Trennung zwischen seropositiv und seronegativ geändert werden: von initial 1:40 ist er auf 1:160 angehoben worden. Damit wollte man die klinisch nicht relevanten positiven Befunde ausschließen und hatte hierfür entsprechende Daten in vorhergehenden Studien erhoben.

Ähnliches Vorgehen wählte eine italienische Arbeitsgruppe [Tampoia et al. 2010]. Sie hat die Genauigkeit von Labortests für den Nachweis von antineuronalen Antikörpern untersucht. Verglichen wurden jeweils die Testeigenschaften und Spezifitäten und Sensitivitäten der indirekten Immunfluoreszenz auf gefrorenen Schnitten von

Primatenkleinhirn mit einem Western Blot Kit und einem Line Blot Kit. Bezüglich der Immunfluoreszenz wurden verschiedene Verdünnungen untersucht und schlussendlich 1:100 gewählt, weil hier der beste Ausgleich zwischen Spezifität und Sensitivität vorlag. Mittels Western Blot ließen sich Autoantikörper gegen die Antigene Hu, Ri und Yo nachweisen. Die Blotstreifen waren vorgefertigt mit aufbereiteten Antigen-Extrakten aus Primatencerebellum und zusätzlich mit rekombinanten Antigenen. Der Line Blot ermöglichte den Nachweis von IgG Antikörpern gegen sechs Antigene (Amphiphysin, Ma2/Ta, Ri, Yo, Hu und CV2). Die Autoren errechnen nach Auswertung ihrer Versuchsreihe mit insgesamt 142 Patienten (38 Patienten mit PNS und 104 Kontrollpatienten) die höchste Sensitivität und Spezifität für den Line Blot. Sie schlussfolgern daraus, dass der Line Blot die Methode der Wahl sein sollte für das Suchen von paraneoplastischen antineuronalen Autoantikörpern. Diese Aussage kann aufgrund der festgelegten Antigene und damit limitierten Anzahl derselben auf dem Line Blot nicht unterstützt werden, sie vernachlässigt das Problem der bisher unerkannten onkoneuronalen Antigene. Desweiteren zeigten sich Unstimmigkeiten bezüglich der Western Blot Resultate. Nicht alle positiven Befunde zeigten gleichermaßen Reaktivitäten mit den rekombinanten und extrahierten Antigenen, wie eigentlich für einen positiven Befund gefordert ist. Die Autoren kommentieren dies leider nicht weiter in ihrer Arbeit.

Die Arbeitsgruppe um Ulvestad wählte bei einer ähnlichen Fragestellung einen anderen Ansatz und legte dazu ihre umfangreichen Überlegungen dar. Sie untersuchten die Testgenauigkeit und -eigenschaften von unterschiedlichen Testsystemen hinsichtlich des ANA- Nachweises und der damit verbundenen Vorhersagbarkeit eines SLE oder Sjögren- Syndroms und verglichen diese miteinander. Verwendet wurden eine indirekte Immunfluoreszenz und indirekte Immunperoxidase mit jeweils HEP2-Zellen und Mausnierengewebe sowie zwei ELISAs. Hierzu wurde initial ein cut-off-level mit hoher diagnostischer Spezifität gewählt. Im nächsten Schritt wurden die Tests miteinander verglichen und die Sensitivität bei diesem cut-off evaluiert. Daran schlossen sich die weiteren Berechnungen von Sensitivität und Spezifität bei geänderten cut-off-levels an. Absinken des cut-offs führte zu einem Anstieg des positiven Vorhersagewertes. Die Autoren konnten daran zeigen wie eng diese beiden statistischen Parameter miteinander verknüpft sind. Außerdem präsentieren sie die ROC Methode (Receiver Operating Characteristics) als Möglichkeit fundierte statistische Vergleiche

zwischen Testverfahren und das unabhängig von Vorwahrscheinlichkeiten und decision bias zu führen [Ulvestad et al. 2000]. Der IFT mit HEp2- Zellen zeigte die höchste Sensitivität für die Vorhersage eines SLE.

Beim Vergleich der beiden Western Blot Kits sind in der vorliegenden Studie große Unterschiede gefunden worden. Die jeweils berechneten Spezifitäten liegen bei allen durchgeführten Vergleichen bei 100%, d.h. in keinem untersuchten Serum der Kontrollgruppe war von einem der beiden Western Blot Kits ein antineuronal positiver Nachweis geführt worden. Differenzen zeigen sich bedingt durch die unterschiedliche Anzahl an positiv gestesteten Seren der einzelnen Patientengruppen bei der Sensitivität. Der Western Blot des Herstellers Euroimmun erzielte durchweg eine niedrigere Sensitivität als der Western Blot der Firma ravo. In der Gruppe der Paraneoplasien haben wir mittels Western Blot der Firma Euroimmun insgesamt 14 von 67 positive Seren gefunden (daraus berechnete Sensitivität 20.8%), wohingegen mittels ravo 21 positive Seren gefunden wurden mit einer Sensitivität von 31.3%. Die Sensitivität steigt bei beiden Kits wenn es um die Differenzierung in klassische Paraneoplasien auf 35.5% bei Euroimmun respektive 48.4% bei ravo und sinkt wenn man ausschließlich die Seren der nicht- klassischen Paraneoplasien betrachtet auf 8.3% respektive 16.7%. Damit konnten wir in dieser Studie erstmals zeigen, dass der Western Blot des Herstellers ravo für den Nachweis von antineuronalen Autoantikörpern sensitiver ist als der Western Blot des Herstellers Euroimmun.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch untersucht welcher Autoantikörper wie oft nachgewiesen wurde und damit zur Steigerung der Sensitivität des jeweiligen Western Blots beiträgt. Beide Western Blots haben dieselben elf anti- Hu positiven Seren gefunden, dies wurde auch in der Referenztestung bestätigt. Der anti- Ri Antikörper wurde vom Western Blot des Herstellers Euroimmun kein einziges Mal nachgewiesen, vom Western Blot des Herstellers ravo insgesamt zweimal, allerdings zeigte sich keine positive Wertung in der Referenztestung. Der anti- Yo Antikörper wurde von beiden Western Blot Kits in denselben Seren nachgewiesen und von der Referenztestung als positiv gewertet, hinzu kommt ein weiterer Befund, welcher nur vom Western Blot des Herstellers ravo als solcher erkannt wurde. Die weiteren seropositiven Befunde des Western Blots des Herstellers ravo betreffen anti- CV2 und anti- Amphiphysin Antikörper. Mit genau diesen Befunden erzielt ravo für sein Testkit eine höhere Sensitivität als Euroimmun. Der Western Blot von Euroimmun weist zwar

hochspezifisch anti- Hu und anti- Yo Antikörper nach, aber findet zum Einen nicht alle seropositiven Befunde diesbezüglich und zum Anderen sind obige bei ravo zusätzlich vorhandenen Autoantigene nicht im Testkit enthalten.

Die verwendeten Substrate unterscheiden sich auch: bei ravo handelt es sich ausschließlich um rekombinante Antigene, während bei Euroimmun neben eben diesen auch zusätzlich Vollantigen (natives Primatencerebellum) zum Einsatz kommt.

Betrachtet man allerdings die Herstellerangaben, sind noch weitere Aspekte zu berücksichtigen. Euroimmun verspricht eine hohe Spezifität und bietet die qualitative Bestimmung der drei häufigsten humanen antineuronalen Autoantikörper der Immunglobulinklasse IgG gegen die Autoantigene Hu, Yo und Ri an. Der Hersteller möchte seinen Test als Bestätigungstest für positive Resultate aus der indirekten Immunfluoreszenz verstanden wissen. Außerdem ist das Substrat ein Vollantigen aus Primatencerebellum und bietet demnach, über die obigen bekannten Autoantigene hinaus, ein Spektrum bisher unbekannter potentieller Autoantigene. Bei drei von sechs Seren, bei denen in der indirekten Immunfluoreszenz antineuronale atypische Autoantikörper nachgewiesen worden waren, zeigten sich im Western Blot der Firma Euroimmun Reaktivitäten, die keinem der bisher bekannten Antigene zugeordnet werden konnten. Bei ravo waren in diesen drei Fällen keine Reaktivitäten sichtbar. In einem dieser sechs Fälle ließ sich mittels Western Blot der Firma ravo ein anti-CV2 Autoantikörper detektieren, während bei Euroimmun keine Bande und auch keine unspezifischen Reaktivitäten im Western Blot erschienen. In der Referenztestung war dieses Serum als anti- CV2 positiv gewertet worden.

Betrachtet man die im Western Blot von Euroimmun als unspezifisch deklarierten Befunde, so zeigt sich auch hier mehrheitlich eine negative Bewertung dieser Seren in der Referenztestung. Innerhalb der OND- Gruppe wurden vier Seren mit unspezifischen Färbungen nachgewiesen, nur eines davon wurde als antineuronal atypisch in der Referenztestung gewertet. Innerhalb der PNS Gruppe waren von 14 unspezifischen Befunden nur sechs als positiv im Referenztest gewertet worden (dreimal antineuronal atypisch positiv, zweimal anti-CV2 positiv, einmal anti- Synaptophysin positiv).

In der vorliegenden Studie konnte der Western Blot von Euroimmun die eigenen Vorgaben nur teilweise erfüllen. Als möglicher Bestätigungstest hat er weniger als die Hälfte der im Immunfluoreszenz seropositiven Befunde erkannt (35 seropositive

Befunde im IFT vs. 14 seropositive Befunde im Western Blot). Bezogen auf die PNS-Gruppe mit 29 seropositiven Befunden spielen die antiglialen nukleären Antikörper (5 von 29) und die antineuronal atypischen Befunde (6 von 29) die Hauptrolle bei der Diskrepanz zwischen Immunfluoreszenz und fehlendem Nachweis im Western Blot von Euroimmun. Von diesen elf seropositiven Befunden wurden sechs in der Referenztestung als antineuronal positiv gewertet, aber nur bei drei von ihnen zeigten sich unspezifische Banden im Western Blot von Euroimmun. Von den fünf AGNA positiven Befunden in der Immunfluoreszenz zeigte sich im Western Blot von Euroimmun keine einzige (unspezifische) Bande, drei dieser Seren wurden in der Referenztestung als anti- SOX1 positiv gewertet. Von den sechs antineuronal atypischen Befunden in der Immunfluoreszenz wurden im Western Blot von Euroimmun drei unspezifische Banden gefunden und drei negative Befunde erhoben. In der Referenztestung wurden vier dieser sechs Seren als antineuronal positiv gewertet und zwei als antineuronal negativ eingestuft. Auch im Vergleich mit der indirekten Immunfluoreszenz muss der Hersteller Euroimmun sein Western Blot Testkit verbessern und zwar dahingehend, dass mehr antineuronale Antigene herausgearbeitet werden, die Sensitivität entsprechend steigt und damit möglicherweise die Werte der Immunfluoreszenz erreichen.

Der Western Blot von ravo stellt nach Herstellerangaben hingegen eine Alternative zur indirekten Immunfluoreszenz dar. Dies ist nach unseren Untersuchungen in einem großen und repräsentativen Patientenkollektiv nicht der Fall. Mittels indirekter Immunfluoreszenz ist immer eine höhere Sensitivität erzielt worden (43.3% vs. 31.3%). Der Western Blot von ravo ermöglicht den Nachweis von sechs antineuronalen Autoantikörpern, davon konnten wir in unserem Patientenkollektiv nur fünf nachweisen. Es wurde kein anti-Ma2 positives Serum gefunden. Mit der Immunfluoreszenz sind innerhalb der PNS- Gruppe 29 seropositive Befunde erhoben worden resp. 21 seropositive Befunde mittels Western Blot von ravo. Ähnlich dem Vergleich zwischen den seropositiven Befunden in der Immunfluoreszenz und dem Western Blot des Herstellers Euroimmun spielen auch hier die AGNA- und antineuronal atypischen Antikörper die Hauptrolle. Von fünf AGNA positiven Befunden im IFT, fand sich im Western Blot kein positiver Befund, drei davon wurden als anti-SOX1 positiv im Referenztest gewertet. Von den sechs antineuronal atypischen Befunden erkannte der Western Blot korrekterweise einmal den anti-CV2- Antikörper

und zwei negative Befunde, welche genauso auch von der Referenztestung gewertet wurden. Die drei im Western Blot negativen Befunde wurden in der Referenztestung zweimal als antineuronal atypisch positiv gewertet und einmal als anti- Synaptophysin positiv. Auch für den Hersteller ravo gilt es die Sensitivität des Western Blots zu steigern, hier müssen weitere rekombinante Autoantigene (z.B. antineuronal atypisch oder anti-SOX 1) etabliert werden um seinen eigenen Ansprüchen als Alternative zur Immunfluoreszenz gerecht zu werden.

Abschließend muss man demnach festhalten, dass bei der Verwendung der beiden Western Blots zwar hochspezifische Autoantikörpernachweise geführt werden, diese beiden Verfahren aber bezüglich der Sensitivität noch verbesserungsfähig sind. Bei beiden liegt mit 100% die höchstmögliche Spezifität vor, hingegen ist die erzielte Sensitivität eher als befriedigend einzustufen. Für den klinischen Alltag bedeutet das, dass zwar ein sehr guter Nachweis geführt wird, dieser aber innerhalb des getesteten Patientenkollektivs nicht alle seropositiven Befunde beinhaltet. Mit diesen Western Blot Befunden für sich genommen ließe sich kein fundierter diagnostischer Befund ableiten, man könnte unseres Erachtens lediglich von Hinweisen sprechen.

Für die Firma Euroimmun wird es im nächsten Schritt darum gehen müssen innerhalb des nativen Primatencerebellums als Vollantigen- Substrat noch weitere Autoantigene herauszuarbeiten und die entsprechenden rekombinanten Autoantigene als Kontrollen auf dem Blotstreifen zu etablieren. Dies sollte nach Möglichkeit nicht die Spezifität beeinträchtigen, d.h. in diesem Fall senken.

Der Hersteller ravo bietet bereits sechs rekombinante Autoantigene auf dem Blotstreifen an. Nicht jeder potentielle Nachweis konnte innerhalb des vorliegenden Patientenkollektivs geführt werden. Ob das an der möglicherweise zu niedrigen Prävalenz der Antikörper selbst lag oder die Sensitivität nicht ausreichend hoch war zum Nachweis derselben wird sich nicht klären lassen. Nichtsdestotrotz muss der Test an Sensitivität gegenüber allen Autoantikörpern verbessert werden um seinen eigenen Ansprüchen bezüglich des Ersatzes der indirekten Immunfluoreszenz als erstes diagnostisches Verfahren zur Evaluation von antineuronalen Autoantikörpern gerecht zu werden. Die Bedeutung einer hohen Sensitivität für ein Screeningverfahren ist bereits in den vorangegangenen Abschnitten erläutert worden.

In der vorliegenden Studie haben wir neben der Betrachtung der einzelnen Verfahren auch die Kombination derselben untersucht. Die indirekte Immunfluoreszenz erzielte mit 43.3 % die höchste Sensitivität und sollte deshalb weiterhin als Screeningverfahren verwendet werden. Als Bestätigungstest haben wir die Testcharakteristika der beiden Western Blot Kits untersucht und nach der Kombination mit der höchsten diagnostischen Genauigkeit gesucht. Die beste Sensitivität bei hoher Spezifität ergibt sich aus der Kombination indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot des Herstellers ravo.

Mit dieser Aussage leistet die Arbeit einen wichtigen Beitrag in der Diskussion um die Wertigkeit verschiedener Testverfahren in der Autoimmundiagnostik. 1995 auf dem Workshop über Leitlinien zum Nachweis onkoneuraler Autoantikörper [Moll et al. 1995] ist die Vorgehensweise festgelegt worden: Indirekter Immunfluoreszenz als Screening- Untersuchung und Western Blot als Bestätigungstest im nächsten Schritt. Daten für die Spezifität und Sensitivität zu den beiden Methoden lagen zu diesem Zeitpunkt nicht vor. Die Autoren fordern bereits damals einen solchen Studienaufbau wie aktuell in der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden ist. In der Zwischenzeit ist zwar die Notwendigkeit dessen bekräftigt worden [Graus et al. 2004], aber lediglich eine valide Studie zu einem Aspekt dieses Themas durchgeführt worden. Die Arbeitsgruppe um Sillevis- Smitt publizierte eine Arbeit, in der sie darlegen, dass die Verwendung von nur einer Methode nicht ausreichend sei und weist auf die entsprechenden Fehlerquellen hin [Sillevis- Smitt et al. 1996].

Bei der Referenztestung wurde der derzeitige Auswertestandard für antineuronale Antikörper des Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork [Graus et al. 2004] zugrundegelegt. Dabei wurden Seren als positiv gewertet, bei denen sich in der indirekten Immunfluoreszenz und einem Bestätigungsverfahren ein antineuronaler Antikörper nachweisen ließ. In dem vorliegenden Patientenkollektiv erzielte die Referenztestung eine Sensitivität von 40.3% und eine Spezifität von 96.9%. Diese Werte spiegeln die Testeigenschaften der Immunfluoreszenz und des Western Blots wider. Die Sensitivität ist bedingt durch die fehlende Bestätigung im Western Blot geringer als die der Immunfluoreszenz und die Spezifität ist höher als die der Immunfluoreszenz bedingt durch den fehlenden seropositiven Nachweis in den Kontrollgruppen mittels Western Blot.

In den vergangenen Jahren wurden trotz der fehlenden Daten über die Testgenauigkeit der Immunfluoreszenz und des Western Blots zunehmend andere Methoden in der Autoimmundiagnostik verwendet. Als Beispiel hierfür lässt sich der ELISA anführen. Der ELISA ist eine immunometrische Methode, die eine quantitative Aussage über die Antikörper- Konzentration trifft und Resultate in optical densities und nicht in Titern liefert. Er ist objektiv und weniger zeitaufwändig, gleichzeitig aber teurer als die indirekte Immunfluoreszenz. Die Spezifität eines ELISA hängt entscheidend von der Qualität des gewählten Antigens ab, man unterscheidet native von rekombinanten Antigenen. Dabei können deutliche Unterschiede entstehen wie eine italienische Arbeitsgruppe anhand des Nachweises von ANAs konstatierte. Die Testeigenschaften einiger der untersuchten ELISAs reichen an die Werte für Spezifität und Sensitivität der Immunfluoreszenz heran, andere wiederum liefern nicht einmal zufrieden stellende Ergebnisse [Tonutti et al. 2004]. Die Arbeitsgruppe um Sinclair publizierte andererseits eine Studie, in der sie darlegen, dass der untersuchte ELISA den IFT als Screeningmethode für klinisch relevante ANAs ersetzen kann [Sinclair et al. 2007]. Dieser Auffassung schließt sich Gonzalez- Buitrago nur teilweise an. In seiner Arbeit erzielen die verwendeten ANA ELISAs eine gute Sensitivität und hohen negativen Vorhersagewert und daraus schlussfolgert er, dass sie verwendet werden können um positive SLE- Fälle auszuschließen. Bei niedrigem positivem Vorhersagewert muss das positive Ergebnis noch mit IFT bestätigt werden um ein endgültiges Ergebnis festzulegen. Anti- dsDNA ELISA haben eine niedrige diagnostische Spezifität, d.h. sie detektieren Autoantikörper mit hoher und niedriger Avidität, letztere haben allerdings kaum klinische Relevanz. Die Autoren fordern deshalb eine Bestätigung des Resultates mittels IFT oder Farr- Assay (beide Methoden weisen ausschließlich Antikörper mit hoher Avidität nach) wenn ELISAs zum Screenen auf SLE benutzt werden [Gonzalez- Buitrago et Gonzalez 2006]. Diese Aussage steht in Widerspruch zu Sinclairs Aussage (s.o.). Die Rolle des ELISAs innerhalb der Autoimmundiagnostik ist demnach nicht klar definiert. Dies liegt größtenteils an der mangelnden Standardisierung der einzelnen Testkits, es gibt auch hier keine Vereinbarung/ Leitlinie für die einheitliche Herstellung derselben. Dies spiegelt sich wider in den kontroversen Resultaten obiger Studien, jede Arbeitsgruppe verwendet einen anderen ELISA und kommt dementsprechend zu anderen Ergebnissen im direkten Vergleich mit der indirekten Immunfluoreszenz und selbst der IFT wird sich ebenso von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe unterscheiden. Konkret handelt es sich dabei um Unterschiede bei der Aufbereitung und Auswahl der

Antigene und der fehlende Nachweis, dass alle Epitope vorhanden sind und sich nicht gegenseitig sterisch behindern. Chapman konnte zeigen, dass nicht jedes Antigen gleichermaßen zur Steigerung von Sensitivität und Spezifität des ELISAs beiträgt [Chapman et al. 2007].

Schlussendlich bleibt zu hoffen, dass bei der großen und zunehmend wachsenden Anzahl an potentiellen Methoden in der Autoimmundiagnostik wieder mehr Aufmerksamkeit auf die Vergleichbarkeit der Methoden untereinander gerichtet wird um damit die serologische Autoantikörpersuche dem klinisch tätigen Arzt als wichtiges diagnostisches Kriterium zu erhalten. Mit dieser Arbeit haben wir hierfür einen wichtigen Beitrag geleistet und erstmalig valide Resultate zum Vergleich von indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot von ravo und Euroimmun geliefert.

6 Zusammenfassung

Einleitung: Paraneoplastische Neurologische Syndrome (PNS) sind Erkrankungen, die in enger zeitlicher Assoziation mit einem Tumor auftreten, die jedoch nicht auf einer lokalen Wirkung des Tumors oder seiner Metastasen beruhen. PNS werden nach den Diagnosekriterien einer Expertengruppe in gesicherte und mögliche paraneoplastische Syndrome eingeteilt. Bei 80% der Patienten mit gesichertem PNS lassen sich hochspezifische Antikörper nachweisen. Deren Bestimmung soll laut einer Expertengruppe auf zwei unabhängigen Testverfahren (Immunoblot und Immunhistochemie) beruhen. Diese Verfahren sind bisher allerdings kaum hinsichtlich ihrer Spezifität oder Sensitivität untersucht worden und auch die Kombination derselben ist nicht evaluiert worden. Die vorliegende Arbeit untersucht die Spezifität und Sensitivität der indirekten Immunfluoreszenz und von zwei Western Blot Kits unterschiedlicher Hersteller und evaluiert die Kombination der Verfahren.

Methoden: Das Patientenkollektiv bestand aus 67 Patienten mit PNS und 64 Kontrollpatienten, davon 30 gesunde Kontrollen und 34 Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen ohne Tumorleiden. Zur Autoantikörperdiagnostik wurden die indirekte Immunfluoreszenz und Western Blot von zwei verschiedenen Herstellern verwendet. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde mit dem Neurologie Mosaik der Firma Euroimmun durchgeführt. Die gebrauchsfertigen Objektträger sind mit unfixierten Gefrierschnitten von Primatencerebrum, Primatencerebellum, Primatendarm und HEp-2 Zellen beschichtet. Der Western Blot der Firma Euroimmun ermöglicht den Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG gegen die Antigene Hu, Yo und Ri. Der Western Blot des Herstellers ravo kann als rekombinanter Immunoblot den Nachweis der paraneoplastischen Autoantikörper anti- HuD, anti- Yo, anti- Ri, anti- CV2, anti- Amphiphysin und anti- Ma2 führen.

Resultate: Die indirekte Immunfluoreszenz erzielte mit 43.3% die höchste Sensitivität bezogen auf die gesamte PNS- Gruppe. Auch bei der Auswertung der Untergruppen klassische und nicht- klassische PNS zeigten sich mit der Immunfluoreszenz stets höhere Werte für die Sensitivität als mit den beiden Western Blot Kits. Die Spezifität der Western Blot Kits lag durchgehend bei 100%, während die Spezifität der Immunfluoreszenz bezogen auf die gesamte Kontrollgruppe 90.6% betrug und auf 82.4% sank bezogen auf die Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen.

Diskussion: Erstmals wurden valide Daten zur Spezifität und Sensitivität von indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot erhoben. Sie belegen damit die in den Leitlinien geforderte Vorgehensweise für den Nachweis von antineuronalen Autoantikörpern. Die indirekte Immunfluoreszenz als Verfahren mit der höchsten Sensitivität ist sehr gut zum initialen Screenen auf antineuronale Autoantikörper bei Verdacht auf eine paraneoplastische Ätiologie eines neurologischen Syndroms geeignet. Bei der Verwendung der beiden Western Blots werden zwar hochspezifische Autoantikörpernachweise geführt, diese beiden Verfahren sind aber bezüglich der Sensitivität noch verbesserungsfähig. Die beste Sensitivität bei hoher Spezifität ergibt sich nach unseren Daten aus der Kombination indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot des Herstellers ravo.

7 Summary

Introduction: Paraneoplastic neurological syndromes (PNS) are remote effects of cancer that are not caused by invasion of the tumour or its metastases. Antineuronal antibodies are highly specific for a paraneoplastic etiology. Thus, detection of them is very helpful in diagnosing an otherwise unexplained and often rapidly progressive neurological syndrome as paraneoplastic. Sensitivity varies depending on the antibody. Based on the clinical syndrome, the type of antibody and the presence or absence of cancer, patients are classified as having a „definite“ or „possible“ PNS. Recently, criteria for detection of the antibodies have been published: immunohistochemistry and immunoblotting on recombinant proteins for confirmation of the specificity have been chosen as the methods of choice. These methods are well established in autoimmunologic diagnostics, but have not been evaluated concerning their sensitivity and specificity yet.

The aim of this work was to analyze the sensitivity and specificity of the indirect immunofluorescence and western blot kits from two different manufacturers.

Methods: 131 patients have been included to that study: 67 patients with paraneoplastic neurological syndrome, 30 healthy subjects and 34 patients with other neurological diseases (OND) without a tumour. Antineuronal antibodies were tested using indirect immunofluorescence on primate cerebellum, primate cerebrum, primate intestine and HEp-2 cells and western blot. The applied western blot kits were from different manufacturers. One (manufactured by Euroimmun) was providing antigen extracts from primate cerebellum and additionally recombinant protein bands. Thus, enabling the detection of antineuronal antibodies against the antigens Hu, Yo and Ri. The other western blot (manufactured by ravo) was a recombinant immunoblot offering the detection of antineuronal antibodies against anti- HuD, anti- Yo, anti- Ri, anti- CV2, anti- Amphiphysin and anti- Ma2.

Results: The diagnostic sensitivity of the indirect immunofluorescence, the western blot from Euroimmun, the western blot from ravo was 43.3%, 20.8% and 31.3% respectively. Concerning the subgroups of classical and non- classical PNS the indirect immunofluorescence also achieved the highest sensitivity among the three tests. Analyzing the diagnostic specificity both western blots achieved 100% throughout all groups. Due to positive results in the OND group the specificity of the indirect immunofluorescence varies between 82.4% and 100%.

Conclusion: Paraneoplastic neurological syndromes are very rare disorders. Antineuronal antibodies are very helpful in diagnosing the PNS and focussing the search for the underlying tumour. The guidelines concerning the diagnostic criteria require immunofluorescence and immunoblot for the detection of antineuronal antibodies. In our study we evaluated the diagnostic accuracy of one indirect immunofluorescence assay and two western blot kits. Our results show the highest sensitivity for the indirect immunofluorescence and the highest specificity for both tested western blots equally. The best sensitivity and a specificity of 100% was obtained with the combination of immunofluorescence and western blot from ravo. With this data we evaluated the suggested test systems and thus support the guidelines.

8 Abkürzungsverzeichnis

AChR: Acetylcholinrezeptor

ACTH: adrenocorticotropes Hormon

AGNA: anti-gliale nukleäre Antikörper

ANA: antinukleäre Autoantikörper

ANNA: anti-neuronal nukleäre Antikörper

CIDP: chronisch- inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie

CUP: Carcinoma of unknown primary (engl. für Malignom bei unbekanntem Primarius)

FITC: Fluoresceinisothiocyanat

GAD: Glutamat Decarboxylase

GBS: Guillain-Barré-Syndrom

HC: healthy controls

HEp-2 Zellen: humane Epitheliumzellen Typ 2 eines Larynxkarzinoms

IFT: indirekter Immunfluoreszenztest

LEMS: Lambert- Eaton Myasthenes Syndrom

NBT/BCIP: Nitroblautetrazoliumchlorid/ 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat

NSCLC: non small cell lung carcinoma (engl. für nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom)

OND: other neurological diseases

PBS: Phosphate buffered Saline

PCA 1: Purkinjezellantikörper Typ 1

PEM: Paraneoplastische Enzephalomyelitis

PNP: Polyneuropathie

PNS: Paraneoplastisches Neurologisches Syndrom

ROC: Receiver Operating Characteristic

SCLC: small cell lung carcinoma (engl. für kleinzelliges Bronchialkarzinom)

SLE: systemischer Lupus erythematoses

VGCC: voltage gated calcium channels (engl. für spannungsabhängige Calciumkanäle)

VGKC: voltage gated kalium channels (engl. für spannungsabhängige Kaliumkanäle)

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Gut charakterisierte, paraneoplastische Autoantikörper	11
Tab. 2: Alters- und Geschlechterverteilung aller Patienten	21
Tab. 3: Tumorverteilung innerhalb der PNS- Gruppe.....	22
Tab. 4: Formen der PNS innerhalb der PNS- Gruppe.....	23
Tab. 5: Formen der paraneoplastischen Polyneuropathie	23
Tab. 6: Formen der klassischen PNS	24
Tab. 7: Formen der nicht- klassischen PNS	24
Tab. 8: Klinisch- neurologische Befunde innerhalb der OND- Gruppe	25
Tab. 9: Diagnosekriterien der einzelnen antineuronalen Antikörper	26
Tab. 10: Kontingenztafel.....	33
Tab. 11: Spezifität und Sensitivität des IFT für die gesamte PNS- Gruppe	35
Tab. 12: Spezifität und Sensitivität des IFT für die klassische PNS- Gruppe	36
Tab. 13: Spezifität und Sensitivität des IFT für die nicht- klassische PNS- Gruppe	36
Tab. 14 Spezifität und Sensitivität des Western Blots von Euroimmun für die gesamte PNS- Gruppe	39
Tab. 15: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von Euroimmun für die klassische PNS- Gruppe	39
Tab. 16: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von Euroimmun für die nicht- klassische PNS- Gruppe.....	40
Tab. 17: Western Blot von Euroimmun für die nicht- klassische PNS und einzelne Kontrollen	40
Tab. 18: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von ravo für die PNS- Gruppe..	42
Tab. 19: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von ravo für die klassische PNS- Gruppe.....	42
Tab. 20: Spezifität und Sensitivität des Western Blots von ravo für die nicht- klassische PNS- Gruppe	43
Tab. 21: Sensitivität und Spezifität der Referenztestung für die gesamte PNS- Gruppe	45
Tab. 22: Sensitivität und Spezifität der Referenztestung für die klassische PNS- Gruppe	47
Tab. 23: Sensitivität und Spezifität der Referenztestung für die nicht- klass. PNS- Gruppe.....	47

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Algorithmus zur Diagnostik bei Verdacht auf ein PNS	17
Abb. 2: Antineuronaler Antikörper (anti-Hu): Bindung von humanem Serum an Plexus myentericus im Primatendarm (Vergrößerung 1:200).....	29
Abb. 3: Unterschiedliche Spezifität des IFT für die PNS- Gruppe im Vergleich zwischen der gesamten Kontrollgruppe und beiden Kontrollgruppen einzeln .	35
Abb. 4: Unterschiedliche Sensitivität des IFT für die gesamte PNS- Gruppe und die klassische und nicht- klassische PNS- Gruppe	37
Abb. 5: Unterschiedliche Sensitivität des Western Blots von Euroimmun für die gesamte PNS- Gruppe und die klassische und nicht- klassische PNS- Gruppe .	40
Abb. 6: Unterschiedliche Sensitivität des Western Blots von ravo für die gesamte PNS- Gruppen und die klassische und nicht- klassische PNS- Gruppe	43
Abb. 7: Unterschiedliche Spezifität der Referenztestung für die PNS- Gruppe im Vergleich zwischen der gesamten Kontrollgruppe und beiden Kontrollgruppen einzeln	46
Abb. 8: Unterschiedliche Sensitivität der Referenztestung für die gesamte PNS- Gruppe und die klassische und nicht- klassische PNS- Gruppe	48
Abb. 9: Spezifität der einzelnen Testverfahren bezogen auf die gesamte Kontrollgruppe	55
Abb. 10: Sensitivität der einzelnen Testverfahren bezogen auf die gesamte PNS- Gruppe.....	55

11 Literaturverzeichnis

- Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell R. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med.* 1998; 4: 1321-4.
- Amos MD, Bridges AJ. Standards for autoantibody testing; Addressing future needs for autoimmune disease and cancer diagnosis. *Cancer Biomark.* 2005; 1: 221-7.
- Amyes E, Curnow J, Stark Z, Corlett L, Sutton I, Vincent A. Restricted IgG1 subclass of anti-Yo antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroimmunol.* 2001; 114: 259-64.
- Anderson NE, Posner JB, Sidtis JJ, Moeller JR, Strother SC, Dhawan V, Rottenberg DA. The metabolic anatomy of paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol.* 1988; 23: 533-40.
- Antoine JC, Absi L, Honnorat J, Boulesteix JM, de Brouker T, Butler M, De Camilli P, Michel D. Anti-Amphiphysin antibodies are associated with various paraneoplastic neurological syndromes and tumors. *Arch Neurol.* 1999; 56: 172-7
- Antoine JC, Mosnier JF, Absie L, Convers P, Honnorat J, Michel D. Carcinoma associated peripheral neuropathies in patients with and without anti-onconeural antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 7-14
- Antoine JC, Honnorat J, Camdessanché J-P, Magistris M, Absi L, Mosnier J-F, Petiot P, Kopp N, Michel D. Paraneoplastic anti-CV2 antibodies react with peripheral nerve and are associated with a mixed axonal and demyelinating peripheral neuropathy. *Ann Neurol.* 2001; 49: 214-221
- Bayer PM, Bauerfeind S, Bienvenu J, Fabien N, Frei PC, Gilburd B, Heide KG, Hoier-Madsen M, Meroni PL, Monier JC, Monneret G, Panzeri P, Shoenfeld Y, Spertini F, Wiik A. Multicenter evaluation study on a new HEp2 ANA screening enzyme immune assay. *J Autoimmun.* 1999; 13: 89-93.
- Benyahia B, Liblau R, Merle-Béral H, Tourani J-M, Dalmau J, Delattre J-Y. Cell-Mediated Autoimmunity in Paraneoplastic Neurological Syndromes with Anti-Hu Antibodies. *Ann Neurol.* 1999; 45: 162-167
- Blaes F, Klotz M, Huwer H, Straub U, Kalweit G, Schimrigk K, Schäfers HJ. Antineuronal and antinuclear autoantibodies are of prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac Surg.* 2000; 69: 254-8

- Blaes F. Immunotherapeutic approaches to paraneoplastic neurological disorders. *Expert Opin Investig Drugs*. 2002; 9: 727-33
- Blaes F, Klotz M, Funke D, Strittmatter M, Kraus J, Kaps M. Disturbance in the serum IgG subclass distribution in patients with anti- Hu positive paraneoplastic neurological syndromes. *Eur J Neurol*. 2002; 9: 369-72
- Bohan A. Seronegative systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 1979; 6: 534-40.
- Bonilla E, Francis L, Allam F, Ogrinc M, Neupane H, Phillips PE, Perl A. Immunofluorescent microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Immunol*. 2007; 124: 18-21.
- ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum*. 1990; 33: 634-43.
- Chapman CJ, Murray A, McElveen JE, Sahin U, Luxemburger U, Türeci Ö, Wiewrodt R, Barnes AC, Robertson JF. Autoantibodies in lung cancer: possibilities for early detection and subsequent cure *Thorax* 2007; 0: 1-6
- Carpentier AF, Rosenfeld MR, Delattre JY, Whalen RG, Posner JB, Dalmau J. DNA vaccination with HuD inhibits growth of a neuroblastoma in mice. *Clin Cancer Res*. 1998; 4: 2819-24.
- Dalmau J, Furneaux HM, M.K. Rosenblum MK, Graus F, Posner JB. Detection of the anti-Hu antigen in specific regions of the nervous system and tumor from patients with paraneoplastic encephalomyelitis/ sensory neuronopathy. *Neurology* 1991; 41: 1757-1764
- Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu--associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine (Baltimore)*. 1992; 71: 59-72.
- Dalmau J, Furneaux H, Cordon- Cardo C, Posner JB. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/ sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissue. *Am J Pathol* 1992; 141: 881-6
- Dalmau J, Graus F, Cheung NK, Rosenblum MK, Ho A, Canete 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

- Dalmau J, Gultekin HS, Posner JB. Paraneoplastic neurologic syndromes: pathogenesis and physiopathology. *Brain Pathol.* 1999; 9: 275-84
- Dalmau J, Posner JB. Paraneoplastic syndromes. *Arch Neurol.* 1999; 56: 405-8
- De Angelis LM, Posner JB. In: *Neurologic Complications of Cancer*, 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2009: p 447-510
- De Keyser F, Verbruggen G, Veys EM, Nimmegeers J, Schatteman L, Goethals K, Vandebossche M. "Microgel diffusion blotting" for sensitive detection of antibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Chem.* 1990; 36: 337-9.
- DeCamilli P, Thomas A, Cofield R, Folli F, Lichte B, Piccolo G, Meinck HM, Austoni M, Fassetta G, Bottazzo G, Bates G, Carlidge N, Solimena M, Kilimann MW et al. The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128kD autoantigen of Stiff- Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med.* 1993; 178: 2219-23
- Domański J. Paraneoplastic endocrine syndromes. *Wiad Lek.* 1989; 42: 956-9.
- Eidfeller P, Sticherling M, Scholz D, Hennig K, Lüttich T, Motz M, Kromminga A. Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 2005; 1050: 327- 339
- Forslid J, Heigl Z, Jonsson J, Scheynius A. The prevalence of antinuclear antibodies in healthy young persons and adults, comparing rat liver tissue sections with HEp-2 cells as antigen substrate. *Clin Exp Rheumatol* 1994; 12: 137-41.
- Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep.* 1996; 23: 133-45
- Furneaux HF, Reich L, Posner JB. Autoantibody synthesis in the central nervous system of patients with paraneoplastic syndromes. *Neurology.* 1990; 40: 1085-91.
- Giometto B, Grisold W, Vitaliani R, Graus F, Honnorat J, Bertolini G, PNS Euronetwork. Paraneoplastic neurologic syndrome in the PNS Euronetwork database: a European study from 20 centres. *Arch Neurol* 2010; 67: 330-335
- González- Buitrago JM, González C. Present and future of the autoimmunity laboratory. *Clinica Chimica Acta* 2006; 365: 50-57
- Graus F, Dalmau J, Reñé R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Viñolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, Mason WP, Rosell R, Posner JB, Real FX. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol.* 1997; 15: 2866-72

- Graus F, Keime-Guibert F, Reñe R, Benyahia B, Ribalta T, Ascaso C, Escaramis G, Delattre JY. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis: analysis of 200 patients. *Brain*. 2001; 124: 1138-48
- Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Smitt PS, Vedeler C, Verschuuren JJ, Vincent A, Voltz R for the Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2004; 75: 1135-40
- Greenlee JE Cytotoxic T cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol*. 2000; 47: 4-5
- Heidenreich F, Schober R, Brinck U, Hartung HP. Multiple paraneoplastic syndromes in a patient with antibodies to neuronal nucleoproteins (anti-Hu). *J Neurol*. 1995; 242: 210-6
- Henson DE. Heterogeneity in tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 1982; 106: 597-8
- Honnorat J, Antoine JC, Derrington E, Aguera M, Belin MF. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66 kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1996; 61: 270-8
- Jaskowski TD, Schroder C, Martins TB, Mouritsen CL, Litwin CM, Hill HR. Screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay. *Am J Clin Pathol*. 1996; 105: 468-73
- Jean WC, Dalmau J, Ho A, Posner JB. Analysis of the IgG subclass distribution and inflammatory infiltrates in patients with anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology*. 1994; 44: 140-7.
- Johnson PC, Rolak LA, Hamilton RH, Laguna JF. Paraneoplastic vasculitis of nerve: a remote effect of cancer. *Ann Neurol*. 1979; 5: 437-44
- Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124: 71-81
- Keime-Guibert F, Graus F, Broët P, Reñe R, Molinuevo JL, Ascaso C, Delattre JY. Clinical outcome of patients with anti-Hu-associated encephalomyelitis after treatment of the tumor. *Neurology*. 1999; 53: 1719-23
- Kern P, Kron M, Hiesche K. Measurement of antinuclear antibodies: assessment of different test systems. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2000; 7: 72-8.

- Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, van de Putte LB, van Rijswijk MH, van Venrooij WJ. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 1831-5
- Lang B, Newsom-Davis J, Wray D, Vincent A, Murray N. Autoimmune aetiology for myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome. *Lancet.* 1981; 2: 224-6.
- Lindstrom JM, Engel AG, Seybold ME, Lennon VA, Lambert EH. Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis. II. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats with anti-acetylcholine receptor antibodies. *J Exp Med.* 1976; 144: 739-53.
- Linke R, Schroeder M, Helmberger T, Voltz R. Antibody-positive paraneoplastic neurologic syndromes: value of CT and PET for tumor diagnosis. *Neurology.* 2004; 63: 282-6
- Luque FA, Furneaux HM, Ferziger R, Rosenblum MK, Wray SH, Schold SC Jr, Glantz MJ, Jaeckle KA, Biran H, Lesser M, et al. Anti-Ri: an antibody associated with paraneoplastic opsoclonus and breast cancer. *Ann Neurol.* 1991; 29: 241-51
- Manley GT, Smitt PS, Dalmau J, Posner JB. Hu antigens: reactivity with Hu antibodies, tumor expression, and major immunogenic sites. *Ann Neurol.* 1995; 38: 102-10
- Moll JW, Henzen-Logmans SC, Splinter TA, van der Burg ME, Vecht CJ. Diagnostic value of anti-neuronal antibodies for paraneoplastic disorders of the nervous system. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1990; 53: 940-3
- Moll JW, Antoine JC, Brashear HR, Delattre J, Drlicek M, Dropcho EJ, Giometto B, Graus F, Greenlee J, Honnorat J, et al. Guidelines on the detection of paraneoplastic anti-neuronal-specific antibodies: report from the Workshop to the Fourth Meeting of the International Society of Neuro-Immunology on paraneoplastic neurological disease, held October 22-23, 1994, in Rotterdam, The Netherlands. *Neurology.* 1995; 45: 1937-41
- Monstad SE, Vedeler CA. An immunoprecipitation assay for the detection of onconeural antibodies. *Acta Neurol Scand Suppl.* 2006; 183: 71-2
- Nano R, Balegno S, Vaccarone R, Corato M, Ceroni M. Detection of paraneoplastic anti-neuronal-specific antibodies: comparison of different immunohistochemical techniques. *Anticancer Res* 2003; 23: 2377-81.

- Nifli AP, Notas G, Mamoulaki M, Niniraki M, Ampartzaki V, Theodoropoulos PA, Kopnitsky MJ, Castanas E. Comparison of a multiplex, bead-based fluorescent assay and immunofluorescence methods for the detection of ANA and ANCA autoantibodies in human serum. *J Immunol Methods*. 2006; 311: 189-97
- O'Neill JH, Murray NM, Newsom-Davis J. The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases. *Brain*. 1988; 111: 577-96.
- Pittock SJ, Kryzer TJ, Lennon VA. Paraneoplastic antibodies coexist and predict cancer, not neurological syndrome. *Ann Neurol*. 2004; 56: 715-9
- Rauer S, Kaiser R. Demonstration of anti-HuD specific oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid from patients with paraneoplastic neurological syndromes. Qualitative evidence of anti-HuD specific IgG-synthesis in the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 2000; 111: 241-4
- Rauer S, Kaiser R. Enzyme linked immunosorbent assay using recombinant HuD-autoantigen for serodiagnosis of paraneoplastic neurological syndromes. *Acta Neurol Scand*. 2001; 103: 248-54
- Rombach E, Stetler DA, Brown JC. Rabbits produce SLE-like anti-RNA polymerase I and anti-DNA autoantibodies in responses to immunization with either human or murine SLE anti-DNA antibodies. *Autoimmunity*. 1992; 13: 291-302.
- Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J. Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol*. 2001; 50: 339-48
- Sack U, Knoechner S, Warschkau H, Pigla U, Emmrich F, Kamprad M. Computer-assisted classification of HEp-2 immunofluorescence patterns in autoimmune diagnostics. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 298-304.
- Saiz A, Dalmau J, Butler MH, Chen Q, Delattre JY, De Camilli P, Graus F. Anti-amphiphysin I antibodies in patients with paraneoplastic neurological disorders associated with SCLC. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1999; 66: 214-217
- Shah DN, Piacentini MA, Burnier MN, McLean IW, Nussenblatt RB, Chan CC. Inflammatory cellular kinetics in sympathetic ophthalmia: A study of 29 traumatized (exciting) eyes. *Ocul Immunol Inflamm* 1993; 1: 255-262.
- Sinclair D, Saas M, Williams D, Hart M, Goswami R. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies?--The routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs. *Clin Lab*. 2007; 53: 183-91

- Sillevs Smitt P, Manley G, Moll JW, Dalmau J, Posner JB. Pitfalls in the diagnosis of autoantibodies associated with paraneoplastic neurological disease. *Neurology* 1996; 46: 1739-41
- Szabo A, Dalmau J, LG, Rosenfeld M, Wong E, Henson J, Posner JB, Furneaux HM. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell*. 1991; 67: 325-33
- Tampoia M, Zucano A, Antico A, Giometto B, Bonaguri C, Alessio MG, Radice A, Platzgummer S, Bizzaro N. Diagnostic accuracy of different immunological methods for the detection of antineuronal antibodies in paraneoplastic neurological syndromes. *Immunol Invest* 2010; 39: 186-95.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
- Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, Gordon T, Hardin JA, Kalden JR, Lahita RG, Maini RN, McDougal JS, Rothfield NF, Smeenk RJ, Takasaki Y, Wiik A, Wilson MR, Koziol JA. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum*. 1997; 40: 1601-11
- 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. 2. Passive transfer of murine mononuclear cells activated with recombinant Yo protein to paraneoplastic cerebellar degeneration lymphocytes in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Neurol Neurosurg*. 1995; 97: 95-100 and 101-105.
- Titulaer MJ, Klooster R, Potman M, Sabater L, Graus F, Hegeman IM, Thijssen PE, Wirtz PW, Twijnstra A, Sillevs- Smitt P, van der Maarel SM, Verschuuren J. SOX antibodies in small-cell lung cancer and Lambert- Eaton myasthenic syndrome: frequency and relation with survival. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4260-4267
- Titulaer MJ, Soffiatti R, Dalmau J, Gilhus NE, Giometto B, Graus F, Grisold W, Honnorat J, Sillevs Smitt PA, Tanasescu R, Vedeler CA, Voltz R, Verschuuren JJ, European Federation of Neurological Societies. Screening for tumours in paraneoplastic neurologic syndromes: report of an EFSN Task Force. *Eur J Neurol* 2010; 18: 19-e3
- Tonutti E, Bassetti D, Piazza A, Visentini D, Poletto M, Bassetto F, Caciagli P, Villalta D, Tozzoli R, Bizzaro N. Diagnostic accuracy of ELISA methods as an

alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity*. 2004; 37: 171-6.

- 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: 1702-6

- Ulvestad E, Kanestrøm A, Madland TM, Thomassen E, Haga HJ, Vollset SE. Evaluation of diagnostic tests for antinuclear antibodies in rheumatological practice. *Scand J Immunol*. 2000; 52: 309-15

- Vedeler CA, Antoine JC, Giometto B, Graus F, Grisold W, Hart IK, Honnorat J, Sillevs Smitt PA, Verschuuren JJ, Voltz R; Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork. Management of paraneoplastic neurological syndromes: report of an EFNS Task Force. *Eur J Neurol*. 2006; 13: 682-90

- Vencovský J, Macháček S, Sedová L, Kafková J, Gatterová J, Pesáková V, Růzicková S. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62: 427-30

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

- Villalta D, Tozzoli R, Tonutti E, Bizzaro N. The Laboratory approach to the diagnosis of autoimmune diseases: Is it time to change? *Autoimmun rev* 2007; 6: 359-365

- Voltz R, Gultekin SH, Rosenfeld MR, Gerstner E, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. A serologic marker of paraneoplastic limbic and brain-stem encephalitis in patients with testicular cancer. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1788-95

- Wilkinson PC, Zeromski J. Immunofluorescent detection of antibodies against neurones in sensory carcinomatous neuropathy. *Brain*. 1965; 88: 529-83

- Younes-Mhenni S, Janier MF, Cinotti L, Antoine JC, Tronc F, Cottin V, Ternamian PJ, Trouillas P, Honnorat J. FDG-PET improves tumour detection in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *Brain*. 2004; 127: 2331-8

12 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

13 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.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. F. Blaes für die Überlassung des Themas und die gewährte engagierte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen, die bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen: den MTAs des Neurochemischen Labors der Neurologischen Klinik für ihre Geduld und Unterstützung und ebenso den MTAs des Immunologischen Labors der Kerckhoff- Klinik für ihre Geduld und Unterstützung.

Insbesondere danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich all die Jahre hindurch unterstützt haben.