

Autoantikörperdiagnostik in der Neurologie mittels nativer und rekombinanter Antigensubstrate

In den vergangenen 10 Jahren wurden zahlreiche neue Autoantikörper bei neurologischen und neuromuskulären Autoimmunerkrankungen identifiziert (Tab. 1). Als Indikatoren für das Risiko und die Art eines möglicherweise assoziierten Tumors spielen die Antikörper eine Schlüsselrolle in der Aufdeckung paraneoplastischer Syndrome [16]. Eine rasche, präzise Antikörperdiagnostik ermöglicht eine frühzeitige Therapie und ist daher oft entscheidend für die Prognose.

Das diagnostische Potenzial von Autoantikörpern bei neuromuskulären Erkrankungen wurde bereits in den 1970er Jahren erkannt, als pathogene Antikörper gegen Acetylcholinrezeptoren (AChR) beschrieben wurden, die mit Myasthenia gravis assoziiert sind [14]. Später entdeckte man Antikörper gegen intrazelluläre (nukleäre und zytoplasmatische) onkoneuronale Antigene (Hu, Yo, Ri, CV2, Ma1, Ma2, Amphiphysin, Recoverin) bei Patienten mit klassischen paraneoplastischen neurologischen Syndromen [19]. Diese Antikörper gelten als sichere Tumormarker [7, 16]. Die allgemein schlechte Prognose steht im Zusammenhang mit irreversiblen neurodegenerativen Prozessen, die zytotoxischen T-Zell-Mechanismen zugeschrieben werden [2].

Mehr und mehr sind verschiedene Syndrome mit Autoantikörpern gegen neurale Oberflächenantigene (Rezeptoren, Kanalproteine und assoziierte Proteine) in den Vordergrund gerückt, die

erst im Verlauf der vergangenen 10 Jahre als Zielantigene der Autoimmunität identifiziert wurden. Sie können mit oder ohne Tumor in Erscheinung treten. Darunter finden sich Formen von Autoimmunenzephalitis mit Antikörpern gegen Glutamatrezeptoren (Typen NMDA und AMPA, [4, 10]), γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren Typ B (GA-

BA β R, [12]) und Kaliumkanal-(VGKC)-assoziierte Proteine (LGII, CASPR2, [8]). Die Antikörper sind teilweise an den pathophysiologischen Prozessen direkt beteiligt, ihre Konzentration verringert sich in der Regel bei adäquater immunsuppressiver Therapie, wobei die Symptome häufig weitgehend bis vollständig abklingen [2, 4, 11].

Tab. 1 Neurologische und neuromuskuläre Syndrome, assoziierte Autoantikörper und Tumoren (Mod. nach [1, 3, 5, 11, 13, 16, 17])

Klinisches Syndrom	Diagnostisch relevante Antikörper gegen intrazelluläre Antigene	Diagnostisch relevante Antikörper gegen Oberflächenantigene	Häufig assoziierte Tumoren
Autoimmunenzephalitis/Enzephalomyelitis	Hu, CV2, Ma1, Ma2, Amphiphysin, ANNA-3, PCA-2, GAD	NMDAR, AMPAR, mGluR5, GABA β R, VGKC (LGII, CASPR2), DPPX	Teratome (Ovar, Testis), SCLC, Thymom, Mamma-Ca, Prostata-Ca, Neuroblastom
Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom	SOX1	VGCC	SCLC
Myasthenia gravis	Titin	AChR, MuSK	Thymom
Neuromyotonie		VGKC (CASPR2)	Thymom
Neuromyelitis optica		AQP4	Selten paraneoplastisch
Opsoklonus-Myoklonus	Ri, Hu		Neuroblastom, Mamma-Ca, SCLC
Pandysautonomie	Hu, Peripherin	gAChR (α 3)	SCLC, Thymom, Lymphom, Mamma-Ca, Prostata-Ca, Blasen-Ca, Rektum-Ca
Retinopathie	Recoverin		SCLC, Endometrium-Ca
Sensible/sensomotorische Neuropathie	Hu, CV2, Amphiphysin, Ma1, Ma2, ANNA-3, SOX1	MAG, Ganglioside	SCLC, Mamma-Ca, Ovarialteratom, Thymom
Stiff-Person-Syndrom (*progressive Enzephalomyelitis mit Rigidität und Myoklonien)	Amphiphysin, GAD	*GLRA1	Mamma-Ca, SCLC
Zerebelläres Syndrom	Hu, CV2, Ri, Ma1, Ma2, ANNA-3, Amphiphysin, Yo, PCA-2, Zic4, SOX1, GAD	VGCC, mGluR1, CASPR2, DNER(Tr)	SCLC, Thymom, Teratome (Ovar, Testis), Hodgkin's Lymphom, Mamma-Ca

Ca Karzinom, SCLC^csmall cell lung cancer^c.

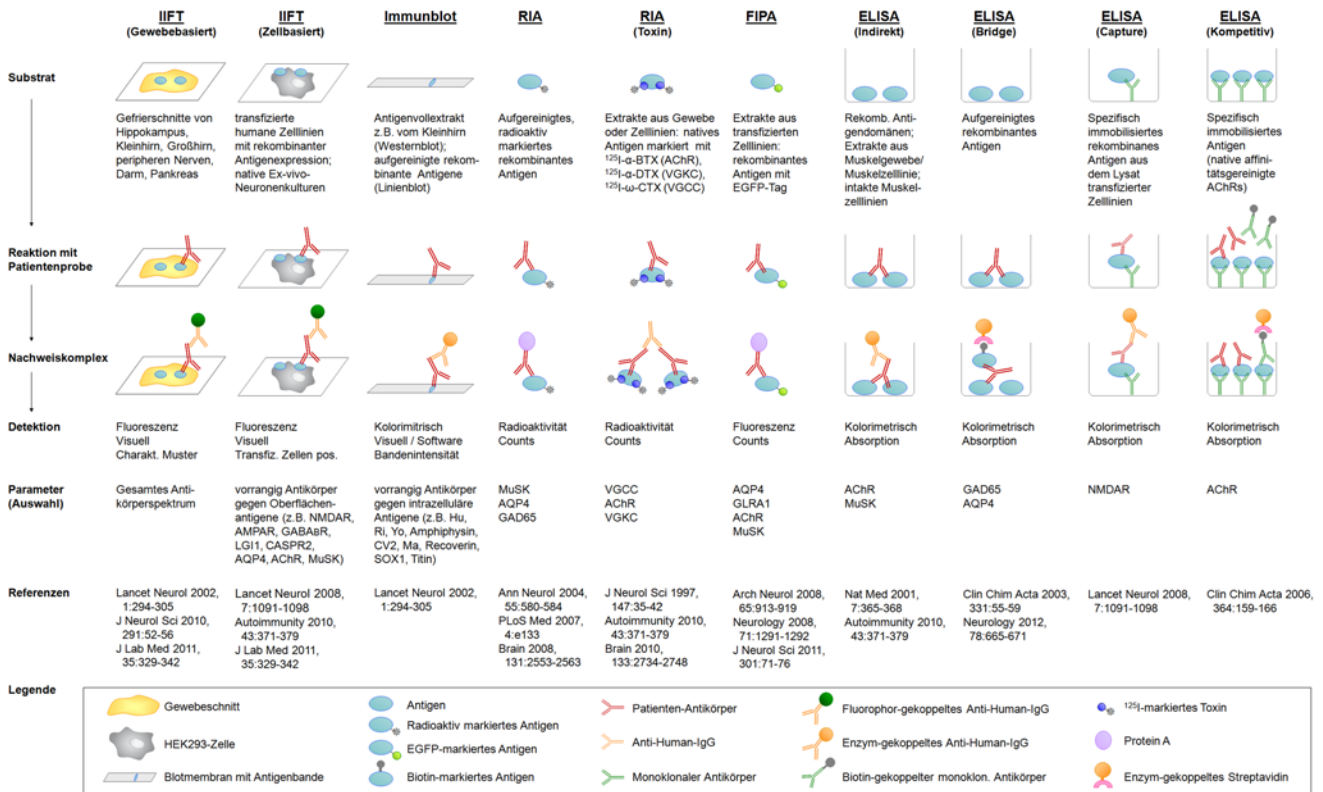


Abb. 1 ▲ Testsysteme zum Nachweis antineuronaler Antikörper (Auswahl). EGFP „enhanced green fluorescent protein“, ELISA „enzyme linked immunosorbent assay“, FIPA Fluoreszenzimmunoprecipitationsassay, IIFT indirekter Immunfluoreszenztest, RIA Radioimmunoassay

» Der Titerverlauf der Autoantikörper korreliert mit der Krankheitsaktivität

Antikörper gegen die Oberfläche von Neuronen sollten bei der Erstuntersuchung idealerweise parallel in Serum und Liquor bestimmt werden. Beschränkt sich die Analyse zunächst auf das Serum, so ist bei negativem Ergebnis eine zusätzliche Untersuchung des Liquors anzuraten, weil dieser in Einzelfällen isoliert positiv reagieren kann [15]. Insbesondere bei bereits begonnener Therapie (z. B. Plasma-pherese) kann die Serumreaktivität unter die Nachweisgrenze absinken, während die Reaktion im Liquor weiterhin positiv ausfällt [6]. In einer eigenen Befundercherche war bei 13 von 69 initialen Serum-Liquor-Paaren von Patienten mit Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis der Autoantikörper ausschließlich im Liquor nachweisbar.

Es hat sich auch gezeigt, dass viele Autoantikörper gegen neurale Oberflächenantigene im Titerverlauf mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Die Bestimmung der Antikörperkonzentration ist daher ein wichtiges Mittel, den Therapieeffekt zu kontrollieren [4, 18] und möglicherweise auch ein Rezidiv frühzeitig zu erkennen.

Serologische Testsysteme

Für die Bestimmung antineuronaler Antikörper wurde eine Vielzahl von Immunoassay-Typen beschrieben. Das am häufigsten verwendete Testprinzip beruht auf der Bindung der Antikörper an das korrespondierende Antigen eines Testsubstrates und der nachfolgenden Darstellung des Antigen-Antikörper-Komplexes mittels Fluoreszenz, Radionukliden oder Kolorimetrie (Abb. 1).

Antikörpernachweis: intrazelluläre Antigene

Als Suchtest wird der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) mit Gefrierschnitten verschiedener Primatengewebe (Hippokampus, Kleinhirn, Großhirn, periphere Nerven, Darm, Pankreas) eingesetzt. Diese Substrate repräsentieren das gesamte relevante Spektrum nativer Antigene und gewährleisten maximale Authentizität im Hinblick auf Antigenstruktur und -präsentation. Die Erfassung charakteristischer Antikörperbindungsmuster (Abb. 2) ist deshalb mit einer hohen Sensitivität verbunden.

Die spezifische Verifizierung positiver histochemischer Reaktionen erfolgt mittels Immunblot. Westernblots auf der Basis elektrophoretisch aufgetrennter Vollextrakte aus Primatenkleinhirn (Abb. 3) umfassen das gesamte zerebelläre Antigenspektrum, sodass nicht nur der Nachweis bekannter Reaktivitäten, sondern auch die Darstellung von Antikörpern bislang unbekannter Spezi-

fität möglich ist. Alternativ können Linienblots verwendet werden, bei denen rekombinante Antigene an definierten Stellen auf Membranstreifen aufgetragen sind (▣ **Abb. 2**). Aufgrund der leichteren Auswertbarkeit werden Linienblots in der Laborpraxis im Vergleich zu Westernblots bevorzugt.

Eine Beschränkung der Diagnostik auf nur eine Methode (indirekte Immunfluoreszenz oder Immunblot) wird nicht empfohlen [7]: Einerseits können bestimmte Reaktivitäten (z. B. Anti-Ma1/Ma2) immunhistochemisch leicht übersehen werden, und die Interpretation der Fluoreszenzmuster kann sich als diffizil erweisen, wenn zusätzlich Autoantikörper gegen Zellkerne oder Mitochondrien vorliegen. Andererseits erfassen Linienblots nur Reaktionen gegen die begrenzte Anzahl eingesetzter Antigene.

Antikörpernachweis: Oberflächenantigene

Bei der Bestimmung von Antikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene stellt die indirekte Immunfluoreszenz die Referenztechnik dar. Zum monospezifischen Nachweis werden bei einigen Parametern auch Radioimmuntests (RIA), Fluoreszenzimmunpräzipitationstests (FIPA) oder enzymgekoppelte Immunadsorptionstests (ELISA) eingesetzt (▣ **Abb. 1**). Allerdings ist die für die ELISA-Herstellung erforderliche Aufreinigung der membranassoziierten Autoantigene mühselig und ihre Kopplung an die Festphase ist schwierig oder unmöglich. Häufig werden bei solchen Präparationen die tertiär- oder quartär-strukturierten Epitope zerstört oder abgeschwächt.

Aus diesen Gründen sind rekombinante Zellsubstrate zum Nonplusultra für die Untersuchung von Oberflächenparametern geworden. Im Immunfluoreszenztest werden spezifisch transfizierte humane Zellen, die jeweils ein definiertes Antigen exprimieren, direkt als Substrat eingesetzt. Dadurch vermeidet man die aufwendige Proteinreinigung und erhält Antigene mit authentischer Konformation sowie posttranslationaler Modifikation.

Nervenarzt 2013 · 84:471–476 DOI 10.1007/s00115-012-3607-5
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

W. Stöcker · S. Saschenbrecker · K. Rentzsch · L. Komorowski · C. Probst

Autoantikörperdiagnostik in der Neurologie mittels nativer und rekombinanter Antigensubstrate

Zusammenfassung

Die moderne Diagnostik neurologisch relevanter Autoantikörper basiert auf der indirekten Immunfluoreszenz mit Gefrierschnitten von Hippokampus, Kleinhirn und anderen Geweben. Dem monospezifischen Nachweis dienen zusätzlich HEK-Zellen („human embryonic kidney cells“), die mit unterschiedlichen neuronalen Antigenen transfiziert sind. Einen schnellen Überblick verschafft man sich mit Biochip-Mosaiken: 20 oder mehr Substrate werden auf einem Reaktionsfeld nebeneinander angeordnet und mit der Probe (Serum oder Liquor) inkubiert. Ergänzend verwendet man Westernblots auf der Basis von Kleinhirn- und Hippokampusextrakten oder Linienblots mit definierten rekombinanten

Antigenen. Initial sollte man die wichtigsten antineuronalen Autoantikörper parallel untersuchen und sich nicht auf die Analyse von Einzelparametern beschränken. Bis vor wenigen Jahren wurden vorwiegend Autoantikörper gegen intrazelluläre neuronale Antigene untersucht. Weitaus häufiger findet man aber Antikörper gegen Strukturen der neuronalen Zelloberfläche, insbesondere gegen Glutamatrezeptoren (Typ NMDA).

Schlüsselwörter

Antineuronale Autoantikörper · Biochip-Mosaiken · Zellbasierter indirekter Immunfluoreszenztest · Neuronale Zelloberfläche · Glutamatrezeptoren

Autoantibody diagnostics in neurology using native and recombinant antigenic substrates

Summary

Modern diagnostics for the determination of neurologically relevant autoantibodies are based on indirect immunofluorescence using tissue sections of the hippocampus, cerebellum and other tissues. For monospecific detection human embryonic kidney (HEK) cells transfected with different neurological antigens are used. Biochip mosaics are designed to give a quick overview and contain 20 or more substances positioned next to each other on a reaction field, which are incubated with the serum or cerebrospinal fluid (CSF) sample. Western blots based on cerebellum or hippocampus extracts or line blots containing defined recombinant antigens are used additionally. Initial investigations should

always comprise the parallel analysis of all major antineuronal autoantibodies instead of performing only single parameter tests. Up until a few years ago autoantibodies against intracellular neuronal antigens were mainly investigated. Antibodies against structures of the neural cell surface, however, are much more frequently found, especially those against glutamate receptors (type NMDA).

Keywords

Anti-neuronal autoantibodies · Biochip mosaics · Cell-based indirect immunofluorescence assay · Neuronal cell surface · Glutamate receptors

Zellbasierter indirekter Immunfluoreszenztest

Die Verwendung rekombinanter Zellsubstrate war anfangs nur spezialisierten Forschungslaboratorien vorbehalten, die für ihre Testreihen jeweils frisch transfizierte Zellen verwendeten [4, 8]. Dieses Vorgehen ist jedoch sehr zeit- und arbeitsaufwendig (Zellkultivierung, molekularbiologische Techniken), und es ist schwierig, ein großes Spektrum verschiedener frischer Substrate ständig parallel bereit zu halten. Durch die Entwicklung standardi-

sierter, Biochip-basierter Testsysteme ist die Immunfluoreszenz inzwischen jedem Labor zugänglich [9].

Für ihre Herstellung werden bei einer der möglichen Vorgehensweisen auf Deckgläsern ausgesäte HEK293-Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche die für das jeweilige Antigen kodierende cDNA-Sequenz enthalten. In einem parallelen Ansatz wird eine Kontrolltransfektion vorgenommen (▣ **Abb. 4a**). Anschließend werden die Zellen 24–72 h lang kultiviert. Nach der Zellfixierung und Trocknung werden die bewachsenen Deckglä-

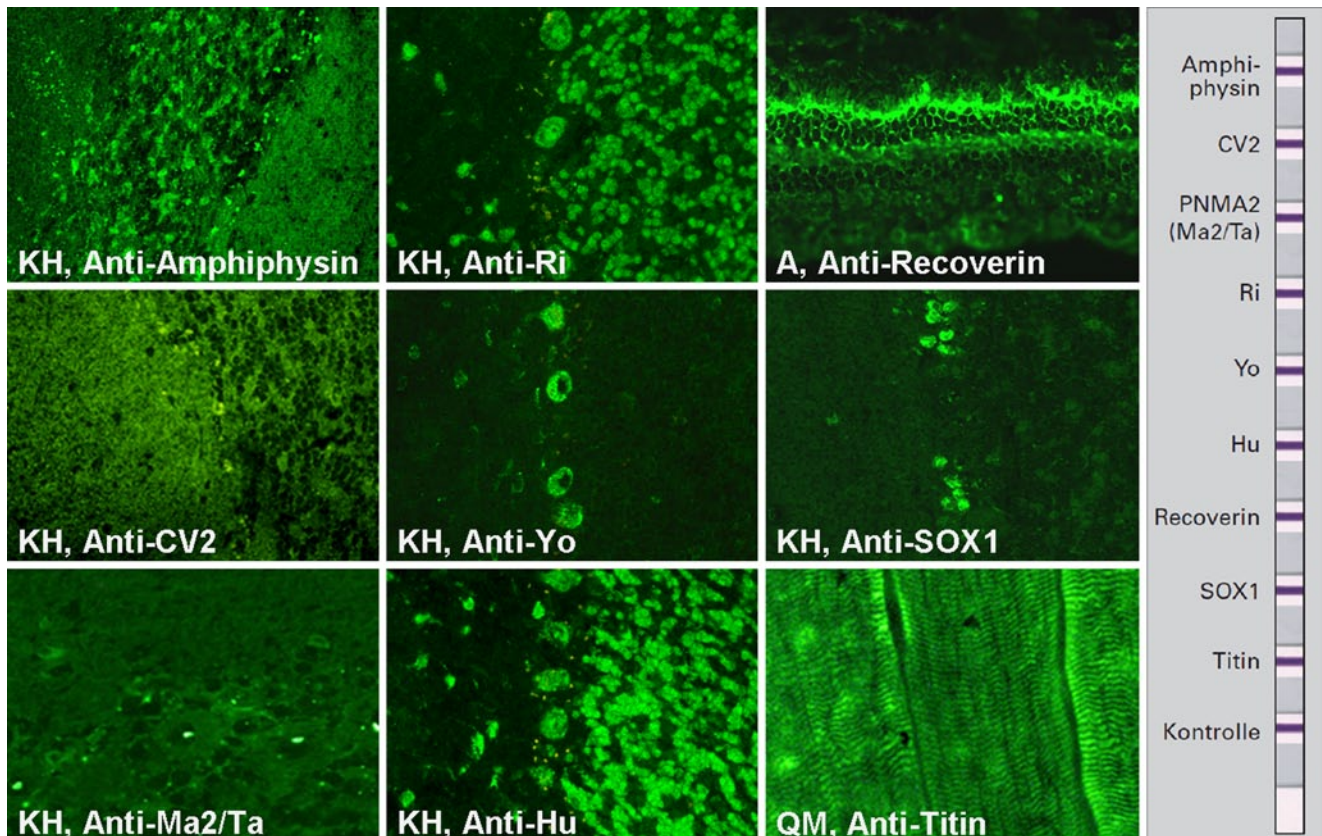


Abb. 2 ▲ Nachweis von Autoantikörpern gegen intrazelluläre Antigene (Auswahl). Links: charakteristische Bindungsmuster im indirekten Immunfluoreszenztest. Rechts: Linienblot mit rekombinanten Antigenen. KH Kleinhirn, A Auge, QM quergestreifte Muskulatur

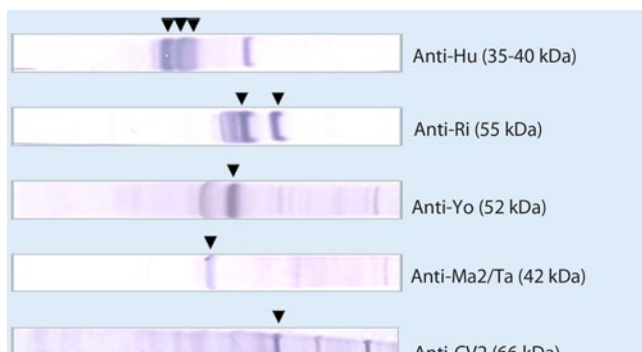


Abb. 3 ◀ Antikörpernachweis mittels Westernblot. Antigenvollextrakt aus Primatenkleinhirn wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit Patientenseren inkubiert. Die Pfeile kennzeichnen die jeweilige definierte Antigenposition

gnose und Therapie von Belang ist. Da eine schnelle, aber dennoch zuverlässige Diagnose in vielen Fällen prognostisch entscheidend ist, sind multiparametrische Analysen der sukzessiven Bestimmung einzelner Parameter vorzuziehen.

» Multiparametrische Analysen verkürzen den Zeitraum bis zur Diagnose

ser maschinell zu millimetergroßen Biochips fragmentiert und einzeln oder als Mosaiken auf die Reaktionsfelder von Objektträgern geklebt (Abb. 4b). Diese sind gekühlt lager- und transportfähig. Im Immunfluoreszenztest binden sich die Autoantikörper der Patientenprobe an die korrespondierenden Antigene und werden dann mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper sichtbar gemacht. Bei einer positiven Reaktion ist eine Fluoreszenz der transfizierten, antigenhaltigen Zellen einfach ablesbar, wäh-

rend nichttransfizierte Zellen keine spezifische Fluoreszenz aufweisen (Abb. 4c).

Biochip-Mosaiken

Die Differenzialdiagnostik verschiedener Krankheitsbilder erfordert die Berücksichtigung eines ganzen Spektrums antineuroner Antikörper, zumal sich die assoziierten neuroimmunologischen Syndrome teilweise gleichen. Zudem können bei Syndromüberlappungen Antikörper gegen mehrere intrazelluläre oder Oberflächenantigene vorliegen, was für Dia-

Mit Biochip-Mosaiken kann eine Vielzahl differenzialdiagnostisch relevanter Antikörper gleichzeitig erfasst werden (Antikörperprofile). Dazu werden je Reaktionsfeld 20 oder mehr Biochips mit unterschiedlichen Antigen substraten nebeneinander angeordnet und mit der Patientenprobe inkubiert (Abb. 5). Die Biochip-Mosaiken beinhalten Gewebeschnitte verschiedener Organe für das Screening und zahlreiche unterschiedliche Zellsubstrate für den monospezifischen Nachweis von Reaktivitäten gegen einzelne rekombinan-

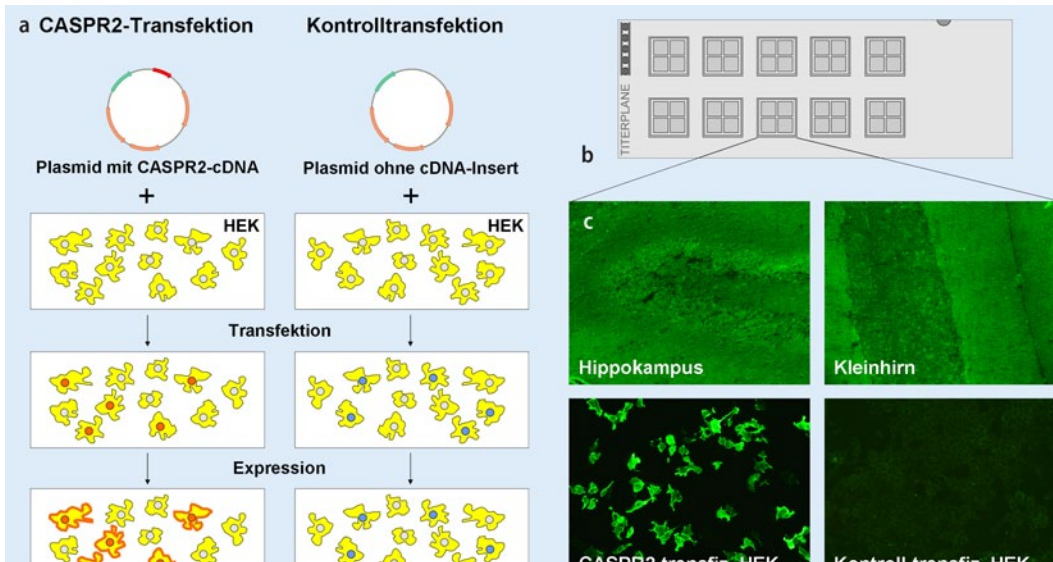


Abb. 4 Zellbasierter indirekter Immunfluoreszenztest: Molekularbiologie und Biochip-Technologie. **a** Herstellung CASPR2-transfizierter und Kontrolltransfizierter HEK293-Zellen (Transfektionsrate 20–50%). **b** Objektträger mit 10 Reaktionsfeldern, auf denen je 4 Biochips mit unterschiedlichen Gewebe- und Zellsubstraten zu einem Mosaik zusammengesetzt sind. **c** CASPR2-IIFT-Mosaik nach Inkubation mit einem anti-CASPR2-positiven Serum

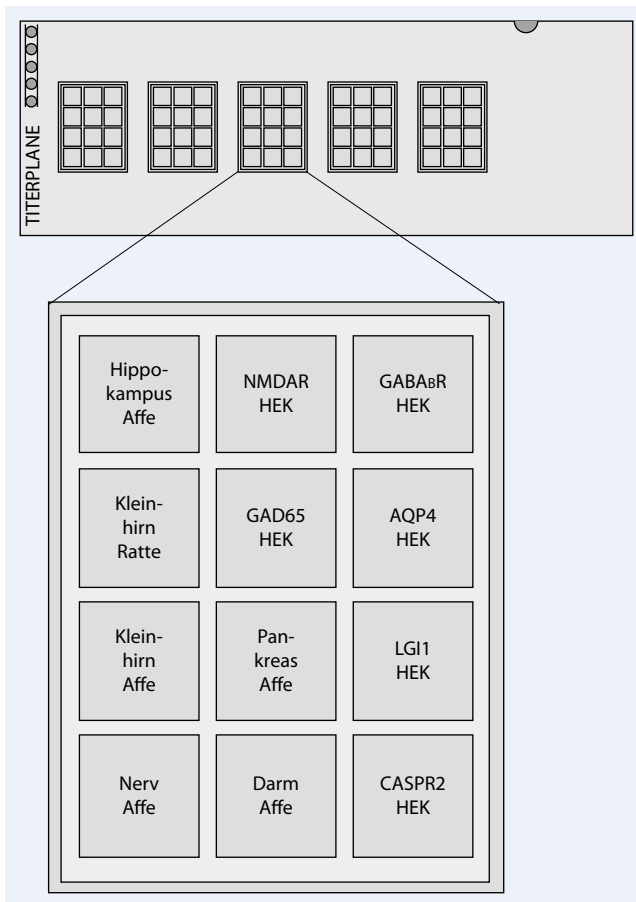


Abb. 5 Multiparametrisches Biochip-Mosaik. Auf jedem der 5 Reaktionsfelder wird eine Patientenprobe mit 12 Antigensubstraten (Gewebeschnitte, spezifisch transizierte HEK-Zellen) gleichzeitig inkubiert. Ein Biochip mit Kontrolltransfizierten HEK-Zellen ist nicht enthalten, da die rekombinanten Substrate gegenseitig als Kontrolle dienen

te Antigene. Auf den Gewebeschnitten lassen sich immer wieder neue Antikörper entdecken, für die bislang noch kein Zielantigen identifiziert wurde.

Antikörperprävalenz

Unserem Lübecker Labor wurden über einen Zeitraum von 3 Monaten (01.05.2012 bis 31.07.2012) 4122 Patientenproben zur Untersuchung antineuronaler Antikörper zugeschickt. Unabhängig vom Analy-

seauftrag wurden alle Seren multiparametrisch mittels IIFT-Biochip-Mosaiken und Linienblot untersucht.

Insgesamt wurden in diesem Kollektiv 294 IgG-positive Antikörperbefunde erhoben (Abb. 6). Antikörper gegen Oberflächenantigene waren 3-mal so häufig (77%) wie Antikörper gegen intrazelluläre Antigene (33%). Bezogen auf Proben mit Anforderung eines Einzelparameters konnte dieser in 156 Fällen bestätigt werden (positiver Zielbefund). In 56 Fällen wurden hingegen andere als die angeforderten Antikörper nachgewiesen (positiver Nebenbefund). Diese Nebenbefunde sind auf den multiparametrischen Ansatz zurückzuführen, durch den die Trefferquote um 36% erhöht und die Diagnostik beschleunigt werden konnte.

Fazit für die Praxis

- Die indirekte Immunfluoreszenz mit Gefrierschnitten neuronaler Gewebe ist eine wichtige Basis bei der Diagnostik antineuronaler Antikörper, weil die Substrate ein umfangreiches Antigenespektrum aufweisen.
- Ergänzend werden monospezifische Testsysteme eingesetzt: Immunblot (intrazelluläre Antigene), Radioimmunoassay und zellbasierter Immunfluoreszenztest (rekombinant exprimierte Oberflächenantigene).
- Werden alle bekannten, differenzialdiagnostisch relevanten Parameter

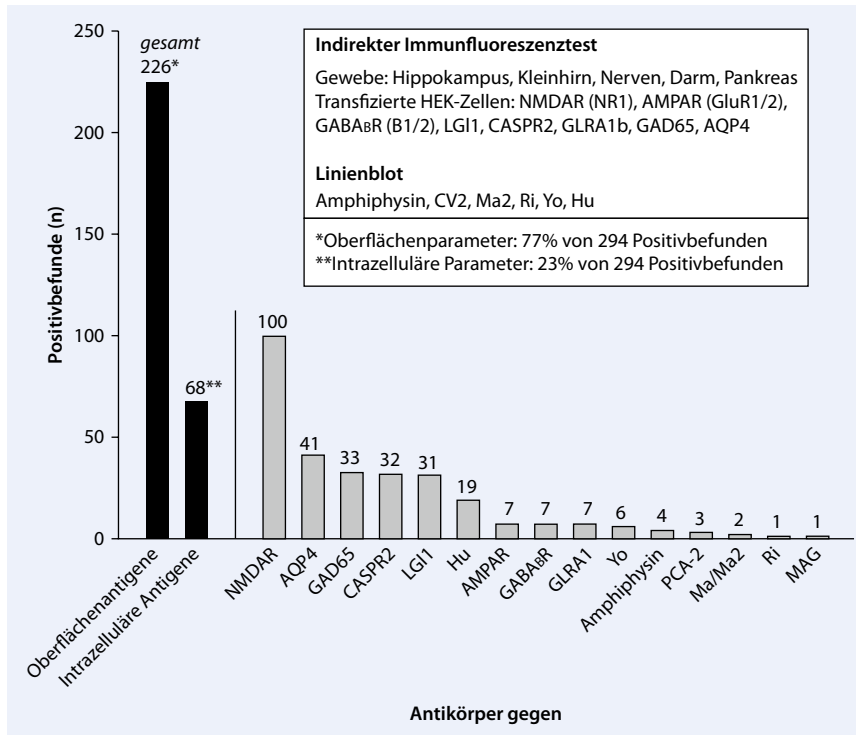


Abb. 6 ▲ Häufigkeit antineuronaler Antikörper (IgG) in 4122 Proben (01.05.2012 bis 31.07.2012), inkl. Folgeproben einzelner Patienten. Bei mehreren positiven Antikörperbefunden pro Probe wurden diese in den jeweiligen Antikörpergruppen je einmal gezählt. Parameter ohne Positivbefunde sind nicht dargestellt

parallel untersucht (Multiplex-Analyse), steigt für Autoantikörper der Immunglobulinklasse IgG die serologische Trefferquote im Vergleich zur Analyse von Einzelparametern um ein Drittel, und der Zeitraum bis zur Diagnose wird reduziert.

Korrespondenzadresse



Prof. Dr. W. Stöcker
 Institut für Experimentelle Immunologie, Euroimmun
 Seekamp 31, 23560 Lübeck
 w.stoecker@euroimmun.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor weist für sich und seine Koautoren auf folgende Beziehungen hin: Die Autoren sind Angestellte (SS, KR, CP, LK) bzw. Vorstandsmitglied (WS) der Euroimmun AG. Euroimmun entwickelt und vertreibt Testsysteme für den Nachweis von Autoantikörpern.

Literatur

1. Becker EB, Zuliani L, Pettingill R et al (2012) Contactin-associated protein-2 antibodies in non-paraneoplastic cerebellar ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:437–440

2. Bien CG, Vincent A, Barnett MH et al (2012) Immunopathology of autoantibody-associated encephalitis: clues for pathogenesis. *Brain* 135:1622–1638

3. Boronat A, Gelfand JM, Gresa-Arribas N et al (2012) Encephalitis and antibodies to DPPX, a subunit of Kv4.2 potassium channels. *Ann Neurol*. doi:10.1002/ana.23756

4. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG et al (2008) Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7:1091–1098

5. Graaff E de, Maat P, Hulsenboom E et al (2012) Identification of delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor as the Tr antigen in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 71:815–824

6. Florance NR, Davis RL, Lam C et al (2009) Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol* 66:11–18

7. Graus F, Delattre JY, Antoine JC et al (2004) Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1135–1140

8. Irani SR, Alexander S, Waters P et al (2010) Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 133:2734–2748

9. Jarius S, Probst C, Borowski K et al (2010) Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen. *J Neurol Sci* 291:52–56

10. Lai M, Hughes EG, Peng X et al (2009) AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 65:424–434

11. Lancaster E, Dalmau J (2012) Neuronal autoantigens – pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol* 8:380–390

12. Lancaster E, Lai M, Peng X et al (2010) Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol* 9:67–76

13. Leypoldt F, Wandinger KP, Voltz R (2012) New developments in paraneoplastic neurological diseases. *Akt Neurol* 39:60–73

14. Lindstrom JM, Seybold ME, Lennon VA et al (1976) Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology* 26:1054–1059

15. Pruss H, Dalmau J, Harms L et al (2010) Retrospective analysis of NMDA receptor antibodies in encephalitis of unknown origin. *Neurology* 75:1735–1739

16. Titulaer MJ, Sofietti R, Dalmau J et al (2011) Screening for tumours in paraneoplastic syndromes: report of an EFNS task force. *Eur J Neurol* 18:19–e3

17. Vincent A (2010) Autoimmune channelopathies: well-established and emerging immunotherapy-responsive diseases of the peripheral and central nervous systems. *J Clin Immunol* 30 (Suppl 1):97–102

18. Vincent A, Buckley C, Schott JM et al (2004) Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 127:701–712

19. Voltz R (2002) Paraneoplastic neurological syndromes: an update on diagnosis, pathogenesis, and therapy. *Lancet Neurol* 1:294–305