

Neurologisches Labor/  
Neurology Laboratory

Redaktion: F. Deisenhammer

## Neue serologische Marker zur Differentialdiagnose der Autoimmun-Enzephalitis

### New serological markers for the differential diagnosis of autoimmune limbic encephalitis

**Klaus-Peter Wandinger<sup>1,\*</sup>, Christine Klingbeil<sup>1</sup>,  
Claudia Gneiss<sup>2</sup>, Patrick Waters<sup>3</sup>, Josep Dalmau<sup>4</sup>,  
Sandra Saschenbrecker<sup>1</sup>, Kathrin Borowski<sup>1</sup>, Florian  
Deisenhammer<sup>2</sup>, Angela Vincent<sup>3</sup>, Christian Probst<sup>1</sup>  
und Winfried Stöcker<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institut für Experimentelle Immunologie, Euroimmun, Lübeck, Deutschland

<sup>2</sup> Klinik für Neurologie, Medizinische Universität Innsbruck, Innsbruck, Österreich

<sup>3</sup> Department of Clinical Neurology, Neurosciences Group, University of Oxford, Oxford, UK

<sup>4</sup> Department of Neurology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

#### Zusammenfassung

In jüngster Zeit wurden mehrere Autoantikörper neu identifiziert, die eng mit verschiedenen Formen der Autoimmun-Enzephalitis assoziiert sind. Die Antikörper richten sich gegen Strukturen der Zelloberfläche von Neuronen: Glutamat-Rezeptoren (Typen NMDA und AMPA), GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sowie die Kaliumkanal(VGKC)-assoziierten Proteine LGI1 und CASPR2. Sie sind doppelt so häufig wie die klassischen paraneoplastischen Antikörper (Anti-Hu, -Yo, -Ri, -Ma, -CV2, -Amphiphysin), weniger eng mit einem Tumor assoziiert und die korrespondierenden klinischen Syndrome sprechen deutlich besser auf eine Immuntherapie an. Der monospezifische Nachweis dieser Autoantikörper in Serum oder Liquor der Patienten erfolgt vorwiegend durch indirekte Immunfluoreszenz, unter Verwendung transfizierter HEK293-Zellen, welche die Membran-assoziierten Zielantigene rekombinant exprimieren. Aufgrund symptomatischer Überlappungen der verschiedenen Krankheitsentitäten ist es

sinnvoll, alle diese Parameter bei jedem Patienten parallel zu bestimmen (Autoantikörper-Profile). Eine rasche Diagnosestellung (maßgeblich unterstützt durch das serologische Labor), der unmittelbare Beginn immuntherapeutischer Intervention und, im Falle einer paraneoplastischen Ätiologie, die Entfernung des Tumors entscheiden die Prognose. Nach eigenen Untersuchungen findet man bei den neu identifizierten Autoimmun-Enzephalitis-Formen Antikörper gegen Glutamat-Rezeptoren (Typ NMDA) mit 42% am häufigsten. Ein Drittel der positiven Reaktionen wurde in der Laborpraxis durch einen Autoantikörper verursacht, dessen Bestimmung vom Kliniker nicht angefordert war: Das unterstreicht die Notwendigkeit, für diesen Diagnostik-Bereich wegen der gebotenen Eile multiparametrische serologische Testsysteme einzusetzen.

**Schlüsselwörter:** AMPA-Rezeptor; Autoimmun-Enzephalitis; BIOCHIP-Mosaik; CASPR2; Differentialdiagnostik; GABA<sub>B</sub>-Rezeptor; indirekte Immunfluoreszenz; LGI1; Neuropil-Antikörper; NMDA-Rezeptor; spannungsabhängige Kaliumkanäle (VGKC).

#### Abstract

Recently, several novel autoantibodies have been identified which are closely associated with different subtypes of autoimmune encephalitis. These antibodies are directed against structures located on the neuronal cell surface: glutamate receptors (types NMDA and AMPA), GABA<sub>B</sub> receptors, as well as the voltage-gated potassium channel-associated proteins LGI1 and CASPR2. They are much more common than the classical paraneoplastic antibodies (anti-Hu, -Yo, -Ri, -Ma, -CV2, -amphiphysin), less frequently associated with a tumour, and the corresponding clinical syndromes respond significantly better to immunotherapy. Monospecific detection of these autoantibodies in the serum or cerebrospinal fluid of patients is primarily performed by indirect immunofluorescence using transfected HEK293 cell lines recombinantly expressing the membrane-associated target antigens. Owing to the symptom overlap of the respective disorders, it is highly appropriate to determine these

\*Korrespondenz: PD Dr. med. Klaus-Peter Wandinger, Institut für Experimentelle Immunologie, Euroimmun AG, Seekamp 31, 23560 Lübeck, Deutschland

Tel.: +49-451-5855-25321

Fax: +49-451-5855-591

E-Mail: kp.wandinger@euroimmun.de

parameters in parallel for each patient (autoantibody profiles). Early diagnosis (substantially supported by the serological laboratory), the immediate initiation of immunotherapeutic intervention and, in cases of paraneoplastic aetiology, tumour resection are crucial for prognosis. In our own investigations, antibodies against glutamate receptors (type NMDA) are most frequently found among the newly identified forms of autoimmune encephalitis, accounting for 42% of cases. In laboratory practice, one-third of positive reactions were caused by an autoantibody whose determination was not requested by the clinician. Considering the clinical significance of a positive result, these findings substantiate the need to implement multiparametric serological test systems in this diagnostic area.

**Keywords:** AMPA receptor; autoimmune encephalitis; BIOCHIP mosaic; CASPR2; differential diagnosis; GABA<sub>B</sub> receptor; indirect immunofluorescence; LGI1; neuropil antibodies; NMDA receptor; voltage-gated potassium channel (VGKC).

## Einleitung

Die autoimmune limbische Enzephalitis ist klinisch von Gedächtnisdefiziten, neuropsychiatrischen Symptomen und epileptischen Anfällen gekennzeichnet und geht mit Aufälligkeiten in MRT und EEG einher. Noch vor wenigen Jahren assoziierte man diese Erkrankung vorrangig mit paraneoplastischen Autoantikörpern gegen intrazelluläre neuronale Antigene (Hu, Ma, CV2, Amphiphysin), die durch zugrunde liegende Tumoren mit ektoper Expression der Neuronenantigene induziert werden. Als hochspezifische pathognomonische Marker ermöglichen diese Antikörper oftmals die frühzeitige Diagnose eines bislang unbekannten Tumorleidens. Bei Nachweis der Reaktivitäten Anti-Hu, Anti-Amphiphysin, Anti-CV2 oder Anti-Ma ist die Wahrscheinlichkeit, dass zum Zeitpunkt der Befunderhebung oder innerhalb der kommenden fünf Jahre ein Tumor nachgewiesen werden kann, größer als 95% [1]. Eine Tumorentfernung kann zur Stabilisierung oder klinischen Besserung der betroffenen Patienten beitragen. Die Wirksamkeit immuntherapeutischer Interventionen hingegen ist begrenzt, da bei diesen paraneoplastischen Syndromen zytotoxische T-Zell-Reaktionen mit resultierender Neuronenzerstörung als maßgeblich für die Pathogenese anzusehen sind [2–10].

Mit steigendem Bekanntheitsgrad des Krankheitsbildes der autoimmunen limbischen Enzephalitis wurden im vergangenen Jahrzehnt zunehmend mehr Patienten diagnostiziert, bei denen sich trotz typischer Symptomatik keiner dieser klassischen paraneoplastischen Autoantikörper nachweisen ließ. Stattdessen stellte man vielfach Antikörper gegen Antigene der Zelloberfläche von Neuronen fest, insbesondere im Bereich des Hippocampus-Neuropils und des Cerebellum [11–13]. Mittlerweile wurden Glutamat-Rezeptoren (Typen NMDA und AMPA), GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sowie die Kaliumkanal(VGKC)-assoziierten Proteine LGI1 und CASPR2 als spezifische Zielantigene identifiziert

[14–19]. Antikörper gegen diese neuronalen Oberflächenantigene sind in einigen Fällen ebenfalls mit Malignomen assoziiert, bei der Mehrzahl der Patienten findet sich jedoch kein Tumor (fakultativ paraneoplastische Antikörper) (Tabelle 1). Im Gegensatz zu den klassischen paraneoplastischen Antikörpern wird Autoantikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene eine direkte pathogene Rolle zugesprochen. Diese beruht auf ihrer unmittelbaren Interaktion mit prä- oder postsynaptischen Zielstrukturen (Tabelle 2), die durch eine Beeinträchtigung der synaptischen Signaltransduktion schwere neuropsychiatrische Defizite hervorruft [59]. Da Immuntherapien und, in den paraneoplastischen Fällen, eine Tumorresektion, häufig zu einer signifikanten Besserung der potentiell reversiblen Symptomatik führen, ist eine frühe Diagnose prognostisch entscheidend. Zu dieser trägt nicht nur die kontinuierliche Weiterentwicklung diagnostischer Methoden bei, sondern auch die zunehmende differentialdiagnostische Berücksichtigung und die immer umfangreichere klinische Charakterisierung der assoziierten Enzephalitis-Subtypen [2–4, 60–62].

## Autoimmun-Enzephalitis mit Autoantikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene

**Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis** Die 2007 erstmals beschriebene Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis ist assoziiert mit Autoantikörpern gegen extrazelluläre Epitope der NR1-Untereinheit von Glutamat-Rezeptoren (Typ NMDA) [13, 14]. Diese sind nicht identisch mit Autoantikörpern gegen die NR2-Untereinheit, die vereinzelt als Hinweis auf eine neurologische Beteiligung bei SLE (neuropsychiatrischer Lupus) diskutiert wurden [63]. Die Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis wurde initial bei jungen Frauen mit Ovarialteratomen beobachtet, wird aber in zunehmendem Maße auch bei Frauen ohne Tumor, bei Männern, Jugendlichen und Kindern diagnostiziert [20–22, 62, 64–67]. Für diese relativ häufige Form einer schweren aber potentiell reversiblen Enzephalitis ist ein nahezu stereotyper, in Phasen gegliederter klinischer Verlauf charakteristisch. Einer grippeähnlichen Prodromalphase (subfebrile Temperaturen, Kopfschmerz, Abgeschlagenheit) folgt bei 100% der Betroffenen ein psychotisches Stadium mit schweren Verhaltens- und Persönlichkeitsänderungen, Wahn, Denkstörungen und Halluzinationen. Infolge dieser Auffälligkeiten gelangt ein großer Teil der Patienten zunächst in psychiatrische Behandlung. In der Folgezeit entwickeln sich Bewusstseinsstörungen, Hypoventilation, epileptische Anfälle, autonome Instabilität, Dyskinesien und unwillkürliche repetitive Bewegungsmuster. Aufgrund der Schwere der Erkrankung (Koma, Status epilepticus etc.) müssen die Betroffenen oft über längere Zeit intensivmedizinisch behandelt werden [13, 14, 20–22, 67–79]. Ungefähr die Hälfte der Patienten zeigt Auffälligkeiten im zerebralen MRT, während das EEG bei über 90% der Erkrankten pathologisch verändert ist. Die Untersuchung des Liquors ergibt in 90% der Fälle eine milde lymphozytäre Pleozytose, in 33% eine intrathekale Eiweißhöhung und in 25% oligoklonale Banden [13, 14, 20, 74, 78]. Ist die

**Tabelle 1** Charakterisierung autoimmuner Enzephalitiden mit Autoantikörpern gegen neuronale Zelloberflächenantigene.

Autoantikörper	Klinisches Syndrom	Häufige Symptome	Paraneoplastische Fälle	Assoziierte Tumoren	Referenzen
Anti-Glutamat-Rezeptor (Typ NMDA)	Anti-Glutamat-Rezeptor (Typ NMDA)-Enzephalitis	Psychose, Gedächtnis-/Sprachdefizite, Anfälle, Bewusstseinsstörung, Dyskinesien, Bewegungsstörungen, Dysautonomie, Hypoventilation	35%–40% (abhängig von Geschlecht, Alter, Ethnizität)	<b>Ovarialteratom</b> ; seltener: Testosteratom, Mammakarzinom, neuroendokriner Ovarialtumor, ovarialer Keimstrang-Sarkom, pseudopapilläre Pankreas-Neoplasie, SCLC, Neuroblastom, Hodgkin-Lymphom	[14, 20–24]
Anti-Glutamat-Rezeptor (Typ AMPA)	Limbische Enzephalitis, atypische Psychose	Gedächtnisdefizite, Verwirrtheit, Desorientiertheit, Anfälle, Agitation, aggressives Verhalten	70%–75%	SCLC und non-SCLC, Thymom, Mammakarzinom	[15, 25, 26]
Anti-GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	Limbische Enzephalitis	Anfälle, Verwirrtheit, Gedächtnisdefizite, Verhaltensauffälligkeiten, Paranoia, Halluzinationen	50%–80%	SCLC, Thymuskarzinoid	[16, 27]
Anti-LGI1	Limbische Enzephalitis	epileptische Anfälle, Gedächtnisdefizite, Verwirrtheit, Desorientiertheit, Hypnotrannie, Myoklonus, Dysautonomie	0%–10%	Schilddrüsenkarzinom, Thymom, SCLC, Nierenzellkarzinom, Ovarialteratom	[17, 19, 28]
Anti-CASPR2	Neuromyotonie, Morvan-Syndrom, Limbische Enzephalitis	peripherne neuronale Hyperexzitabilität, Muskelkrämpfe/Faszikulationen/Myokymien, Anfälle, Gedächtnisdefizite, Verwirrtheit, Desorientiertheit, neuropathische Schmerzen, Schlafstörungen, Dysautonomie, Gewichtsabnahme	0%–35%	Thymom, endometriales Adenokarzinom	[18, 19, 29]

SCLC, small-cell lung carcinoma.

Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis mit einem Tumor assoziiert, handelt es sich um ein paraneoplastisches Syndrom. Die Wahrscheinlichkeit einer zugrunde liegenden Neoplasie liegt bei 35% bis 40% und ist von Alter, Geschlecht und ethnischer Herkunft abhängig (Tabelle 1). Am häufigsten findet man bei Patientinnen zwischen 13 und 42 Jahren Ovarialterome [13, 14, 20, 21, 68, 70, 78]. Diese enthalten Tumorzellen, welche Glutamat-Rezeptoren (Typ NMDA) exprimieren und dadurch die Synthese der rezeptorspezifischen Autoantikörper induzieren [14, 80]. Bei Männern, Patient(inn)en im fortgeschrittenen Alter und Kindern treten Tumore seltener auf [14, 20, 21, 66, 67]. Interessanterweise werden Teratome insgesamt häufiger bei Frauen afroamerikanischer Herkunft gefunden [20]. Es ist davon auszugehen, dass die Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis gegenwärtig stark unterdiagnostiziert ist. Die Erkrankung stellt, insbesondere bei Patienten mit Enzephalitis ohne Erregernachweis und bei jungen Frauen mit epileptischen Erstanfällen (de-novo-Epilepsie), eine wichtige Differentialdiagnose dar [73, 77].

Durch adäquate immunmodulatorische Therapie sowie, im Falle einer paraneoplastischen Ätiologie, möglichst frühzeitige Tumorerkennung und -resektion bessert sich die Prognose der Betroffenen [13, 14, 22, 70–72, 81]. Ein früher Beginn der Immuntherapie ist mit einem signifikant besseren Langzeitverlauf assoziiert als ein später Beginn [14, 62]. Auch bei schweren Fällen von Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis während der Schwangerschaft können sofortige Therapiemaßnahmen einen guten Ausgang für Mutter und Neugeborenes bewirken [82]. Da der Krankheitsprozess vornehmlich durch intrathekal gebildete Autoantikörper aufrecht erhalten wird, besteht eine gute Korrelation zwischen der Besserung der klinischen Symptome und einem Absinken der spezifischen Antikörpertiter im Liquor. Im Serum hingegen können diese auch in der Remissionsphase über einen längeren Zeitraum persistieren [14, 20, 22, 73, 81, 83]. Der Genesungsprozess kann längere Zeit beanspruchen (bis zu Jahren), aber selbst dann noch in einer Rückbildung von frontotemporaler Atrophie und Hypoperfusion resultieren [84]. Als Ursache besonders schwerer und langwieriger Krankheitsverläufe werden Autoantikörper-produzierende Plasmazellinfiltrate im Gehirnparenchym der betroffenen Patienten angesehen, die therapeutisch schwer zu erreichen sind [20, 65, 85]. Generell kann bei etwa 75% aller Patienten eine weitgehende Rückbildung der Symptomatik erzielt werden. 25% der Betroffenen erleiden jedoch schwere neurologische Defizite oder sterben. Bei den Überlebenden bleibt ein Gedächtnisverlust (Amnesie) für die Dauer der Erkrankung sowie die Gefahr von Rezidiven des enzephalitischen Syndroms bestehen, letzteres insbesondere dann, wenn der Tumor spät bzw. nicht entfernt wurde oder kein Tumor gefunden werden konnte [13, 14, 20, 22, 68, 74, 78].

Das Auftreten der rezeptorspezifischen Autoantikörper, deren Korrelation mit dem Krankheitsverlauf, immunpathologische Befunde und die Reversibilität der Erkrankung bei immuntherapeutischer Intervention legen

**Tabelle 2** Charakterisierung neuronaler Oberflächenantigene.

**NMDA-Rezeptoren** gehören zu den ionotropen Glutamat-Rezeptoren und wurden entsprechend ihrer Aktivierbarkeit durch die synthetische Aminosäure N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) benannt. In der postsynaptischen Membran lokalisiert, bilden sie Kationenkanäle mit zentraler Bedeutung für synaptische Übertragung und Plastizität [30, 31]. Die Rezeptoren sind tetramere Komplexe, bestehend aus zwei Glycin-bindenden NR1-Untereinheiten und zwei Glutamat-bindenden NR2-Untereinheiten (NR2A-NR2D), deren heteromere Assemblierung mehrere Rezeptor-Subtypen mit unterschiedlicher synaptischer Lokalisation sowie verschiedenen physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften erzeugt [32]. Ihre Aktivität wird reguliert durch die Bindung von Liganden wie Glutamat, dem wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter. Lokalisation diagnostisch relevanter Epitope: extrazelluläre Region von NR1 [14].

**AMPA-Rezeptoren** gehören zu den ionotropen Glutamat-Rezeptoren und haben eine hohe Affinität für Glutamat und für den synthetischen Glutamat-Agonisten AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure). Sie sind vorrangig in der postsynaptischen Membran glutamaterger Synapsen lokalisiert und werden insbesondere im Hippocampus, Cerebellum, zerebralen Kortex sowie in den Basalganglien exprimiert. Als ligandengesteuerte Kationenkanäle vermitteln AMPA-Rezeptoren die schnelle exzitatorische Neurotransmission im ZNS, sind von Bedeutung für die Modulation synaptischer Plastizität und damit für neurophysiologische Mechanismen, die Lern- und Gedächtnisprozessen zugrunde liegen. Die Rezeptoren sind aus vier Untereinheiten zusammengesetzt (GluR1 bis GluR4), deren Kombination lokal variieren und Ionenspezifität sowie kinetische Eigenschaften der Rezeptoren beeinflussen kann [33–36]. Lokalisation diagnostisch relevanter Epitope: GluR1 und GluR2 [15].

**GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren** sind metabotrope Rezeptoren, die spezifisch den inhibitorischen Neurotransmitter  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA) binden. Im gesamten ZNS, insbesondere im Hippocampus, Thalamus und Cerebellum, liegen sie an prä- und postsynaptischen Membranen als heteromere Komplexe vor, bei denen jeweils zwei GABA<sub>B1</sub>- und GABA<sub>B2</sub>-Untereinheiten ein Tetramer bilden. Dieses ist mit zwei Tetrameren von KCTD-Proteinen (potassium channel tetramerization domain-containing proteins) assoziiert, deren jeweilige Subtypen die kinetischen und pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors bestimmen [37, 38]. Die Bindung von GABA an die GABA<sub>B1</sub>-Untereinheiten führt zur Rezeptoraktivierung. Ihr schließt sich eine G-Protein-vermittelte Transduktionskaskade zur Regulation synaptischer Kationenkanäle sowie zur Hemmung der präsynaptischen Transmitterfreisetzung an [37, 39]. GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren wird außerdem eine Rolle bei der Modulation synaptischer Plastizität zugeschrieben [40, 41]. Lokalisation diagnostisch relevanter Epitope: GABA<sub>B1</sub> [16].

**Spannungsabhängige Kaliumkanäle** (VGKC) finden sich in neuronalen Zellmembranen, insbesondere in paranodulären und terminalen Regionen myelinhaltiger Nerven. Sie sind u.a. für die Membranrepolarisation nach Aktionspotentialen verantwortlich.

**Leucin-reiches Gliom-inaktiviertes Protein 1** (LGI1) wird primär von Neuronen in spezifischen Bereichen des Neokortex und des limbischen Systems (z.B. Hippocampus, Amygdala, Putamen, Medulla, Frontallappen, Temporallappen) exprimiert [42, 43]. Den Namen verdankt es seiner umstrittenen Rolle als Tumorsuppressor in der Gliomprogression [43–46], und einer N-terminalen LRR(leucin-rich repeat)-Domäne mit Bedeutung für die Interaktion zu anderen Proteinen [43, 47]. Gemeinsam mit den prä-/postsynaptischen Rezeptoren ADAM23/ADAM22, präsynaptischen Kaliumkanälen (VGKC), Scaffold-Proteinen (z.B. PSD-95) und weiteren Faktoren bildet sekretiertes LGI1 einen transsynaptischen Proteinkomplex und reguliert vermutlich die VGKC-Inaktivierung sowie die AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Signaltransduktion [48–51]. Aufgrund sogenannter „EPTG repeats“ im C-Terminus wird LGI1 einer Superfamilie von Proteinen zugeordnet, welche in kausalem Zusammenhang mit Epilepsie und anderen neurologischen Erkrankungen stehen [52].

**Contactin-assoziiertes Protein-2** (CASPR2), ein Transmembranprotein mit Expression im ZNS und in peripheren Nerven, gehört zur Neurexin-Superfamilie synaptischer Zelladhäsionsmoleküle, deren Mutationen im Zusammenhang mit Autismus und Schizophrenie stehen [53, 54]. CASPR2 ist Bestandteil von Adhäsionskomplexen der neuronalen Zelloberfläche, welche mit den Untereinheiten spannungsabhängiger Kaliumkanäle (VGKC) interagieren und für die VGKC-Lokalisierung im Bereich der Juxtagranodien myelinisierter Axone des zentralen und peripheren Nervensystems essentiell sind [55–58].

eine immunvermittelte Pathogenese der Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis nahe. Zytotoxische T-Zell-Mechanismen und Komplementreaktionen sind hingegen von geringer Relevanz [20, 59, 69, 80, 85]. Für eine pathogene Rolle der Antikörper spricht auch die Antikörper-vermittelte Dysfunktion glutamaterger Synapsen [86]. In Zellkulturexperimenten an hippocampalen Neuronen konnte zudem demonstriert werden, dass die Bindung der Antikörper eine reversible, titerabhängige Verringerung von Glutamat-Rezeptoren (Typ NMDA) auf der neuronalen Zelloberfläche induziert [14, 87]. Des Weiteren wurden bei pharmakologischer Blockade der Rezeptoren mit NMDA-Antagonisten klinische Symptome ähnlich denen der Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis beobachtet, insbesondere Psychosen [88, 89].

#### Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ AMPA)-Enzephalitis

Antikörper gegen Glutamat-Rezeptoren (Typ AMPA) sind Marker für eine spezielle Form der limbischen Enzephalitis, die bislang bei nur wenigen Patienten (>90% Frauen) mit einem Durchschnittsalter von 60 Jahren (Altersspanne: 38 bis 87) diagnostiziert wurde. Zu den häufig assoziierten Symptomen gehören progrediente Gedächtnisdefizite, Verwirrtheit, Desorientiertheit, Anfälle, Agitation, aggressive Verhaltensmuster sowie (vereinzelt) Halluzinationen, Nystagmus oder Lethargie [15, 25, 26]. In einigen Fällen beschränkt sich das klinische Bild auf eine akute psychotische Symptomatik mit schnell fortschreitenden Verhaltensabnormalitäten [25]. Bei etwa 70% bis 75% der Betroffenen liegt ein Bronchialkarzinom, Mammakarzinom oder Thymom (mit Expression der Rezeptor-Untereinheiten GluR1/GluR2) vor, was auf eine

paraneoplastische Ätiologie des enzephalitischen Syndroms schließen lässt [15, 25, 26] (Tabelle 1). Bei ca. 50% der Fälle zeigen sich Überlappungen mit anderen systemischen Autoimmunerkrankungen (z.B. Stiff-Person-Syndrom, Diabetes mellitus, Raynaud-Syndrom, Hypothyreose) und zusätzliche Autoantikörper unter anderem gegen GAD, CV2, VGCC oder SOX1. Im zerebralen MRT treten bei 89% der Patienten Signalintensitäten im Bereich der medialen Temporallappen auf, während Auffälligkeiten im EEG bei 75% gefunden werden. Zudem lassen sich fast immer pathologische Veränderungen im Liquor feststellen (90% lymphozytäre Pleozytose, 70% intrathecakale Eiweißverhöhung) [15].

Immuntherapie und, im Falle eines paraneoplastischen Syndroms, Tumorresektion/Chemotherapie führen meistens zu einer Besserung der Symptomatik [15, 25]. Auffallend ist aber eine Tendenz (56%) zu schubförmigen Verläufen, wobei neurologische Rezidive auch in Abwesenheit oder nach Entfernung von Neoplasien ein- bis mehrfach auftreten können. Ohne adäquate Behandlung oder bei schlechtem Therapieverlauf kann diese Form der limbischen Enzephalitis zum Tod des Patienten führen.

Sowohl der Erfolg immunmodulatorischer Interventionen als auch die Beobachtung, dass bei kultivierten hippocampalen Neuronen die Applikation der Antikörper zu einer reversiblen Verringerung der synaptischen Rezeptordichte führt, sprechen für eine Antikörper-vermittelte Pathogenese [15, 59]. Einzelne Fallbeispiele legen eine Korrelation der rezeptorspezifischen Antikörpertiter mit der Krankheitsaktivität nahe [15]. Die Mehrheit der bislang untersuchten Patienten weist eine isolierte Reaktivität gegen die Rezeptor-Untereinheit GluR1 (30%) oder GluR2 (60%) auf; seltener (10%) liegen Antikörper gegen beide Untereinheiten parallel vor [15].

**Anti-GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Enzephalitis** Die limbische Enzephalitis mit Autoantikörpern gegen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren wurde bislang bei Patienten (68% Männer) im Durchschnittsalter von 60 Jahren (Altersspanne: 24 bis 75 Jahre) diagnostiziert [16, 27]. Alle Betroffenen weisen epileptische Anfälle, Verwirrtheit und Störungen des Kurzzeitgedächtnisses auf, wobei die Anfälle das primäre klinische Symptom darstellen (komplex-fokale Anfälle mit häufigem Ursprung im Temporallappen und sekundärer Generalisierung, Status epilepticus, non-konvulsive Anfälle). Zusätzlich kann es zu Verhaltensauffälligkeiten, Psychosen, Wahn, Halluzinationen, Schlaf- und Bewusstseinsstörungen, Koma sowie letalen Verläufen kommen. Das Auftreten eines Tumors (meist kleinzelliges Bronchialkarzinom) bei 50% bis 80% der Patienten lässt auf eine häufige paraneoplastische Ätiologie des neurologischen Syndroms schließen (Tabelle 1). Nach den Anti-Hu-Antikörpern stellen Anti-GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Antikörper die zweithäufigste Immunreaktivität bei Patienten mit limbischer Enzephalitis und kleinzelligem Bronchialkarzinom (SCLC) dar [27]. Bei fast der Hälfte der Patienten finden sich dabei noch weitere Autoantikörper, z.B. gegen GAD, TPO, VGCC, VGKC und/oder SOX1, was eine generalisierte autoimmune Störung nahelegt. In ca. 70% aller Fälle zeigt das zerebrale MRT Auffälligkeiten (meist erhöhte FLAIR/T2-Signale

der medialen Temporallappen), und in mehr als 90% treten Epilepsie-typische Potentiale im EEG auf. Oftmals sind die Liquorbefunde pathologisch im Sinne einer lymphozytären Pleozytose, einer intrathecakalen Eiweißverhöhung oder (selten) oligoklonalen Banden. Durch frühzeitige Syndromerkennung, Immuntherapie und gegebenenfalls Tumorresektion/Chemotherapie kann eine partielle bis vollständige Genesung erreicht werden [16].

Der derzeitigen Annahme einer Antikörper-vermittelten Pathogenese durch Inhibierung oder Zerstörung der GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren entspricht die spezifische Bindung von Patientenantikörpern an GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren hippocampaler Neurone [16], der Erfolg immunmodulatorischer Interventionen [16], die Beobachtung von Symptomen ähnlich denen einer limbischen Enzephalitis bei GABA<sub>B1</sub>- und GABA<sub>B2</sub>-Nullmutanten im Mausmodell (z.B. spontane epileptische Anfälle, Gedächtnisdefizite, Angstzustände, gesteigerte Schmerzempfindlichkeit, übermäßige Bewegungsaktivität) [90–93], sowie ein erhöhtes Risiko für Temporallappenepilepsie bei Patienten mit GABA<sub>B1</sub>-Rezeptor-Polymorphismus [94]. Die häufige Assoziation mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen und deren Fähigkeit zur Expression synaptischer Proteine spricht für die Möglichkeit einer Tumor-induzierten Immunantwort gegen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren und die damit einhergehende Ausbildung der beschriebenen Symptomatik. Im Serum oder Liquor aller bislang identifizierten Patienten ließen sich Antikörper gegen die GABA<sub>B1</sub>-Untereinheit nachweisen, während zusätzliche Anti-GABA<sub>B2</sub>-Antikörper nur in Einzelfällen vorlagen [16]. Dementsprechend ist anzunehmen, dass die relevanten Epitope primär in den GABA<sub>B1</sub>-Untereinheiten lokalisiert sind, welche für die Substratbindung und Rezeptorfunktion essentiell sind [37].

**Enzephalitis mit Autoantikörpern gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle (VGKC) und VGKC-assoziierte Proteine: LGI1 und CASPR2** Als Autoantikörper gegen spannungsabhängige Kaliumkanäle (VGKC) bezeichnet man die Gesamtheit aller Antikörper, die VGKC-Komplexe, welche mit dem Schlangengift <sup>125</sup>I- $\alpha$ -Dendrotoxin markiert sind, aus Hirn-Homogenaten präzipitieren können. <sup>125</sup>I- $\alpha$ -Dendrotoxin bindet spezifisch an die  $\alpha$ -Untereinheiten K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2 und K<sub>v</sub>1.6 der Kaliumkanäle. Erst 2010 stellte sich heraus, dass die bei Patienten mit „VGKC-Antikörper-assoziierten“ Syndromen nachgewiesenen Autoantikörper nur in ca. 3% direkt gegen diese Kaliumkanal-Untereinheiten gerichtet sind [95–101]. Tatsächlich sind die relevanten Epitope zu etwa 80% in VGKC-assoziierten Proteinen lokalisiert, die bei der konventionellen Antikörperbestimmung kopräzipitieren werden. Hierbei handelt es sich vorrangig um LGI1 (leucine-rich glioma-inactivated protein 1) und CASPR2 (contactin-associated protein 2), seltener um TAG1 (transient axonal glycoprotein/contactin-2). Etwa 15% bis 20% der Antikörper binden an noch nicht identifizierte Antigene oder sind mit den bislang verfügbaren Testsystemen nicht monospezifisch nachweisbar [17–19, 29, 102].

Autoantikörper gegen LGI1 finden sich nahezu ausschließlich bei Patienten mit limbischer Enzephalitis (ca. 65% Männer, Durchschnittsalter 60 Jahre). Hauptsymptome

sind epileptische Anfälle, Gedächtnisdefizite, Verwirrtheit und Desorientiertheit. Zusätzlich kommt es zum Auftreten von Hyponatriämie, Myoklonien, Schlafstörungen und (seltener) zu Dysautonomien, neuropathischen Schmerzen, Neuromyotonie oder Gewichtsverlust [17, 19, 103]. Bei einer relativ geringen Anzahl von Patienten treten im Prodromalstadium kurze, myokloniforme Bewegungen im Bereich des Gesichtes sowie der Arme und Beine auf, vor deren Beginn, ähnlich wie bei tonischen Anfällen, eine Abnahme der Amplituden im Video-EEG feststellbar ist [28, 104]. Diese Episoden können bereits frühzeitig einen diagnostischen Hinweis auf das Vorliegen einer Anti-LGI1-assozierten Enzephalitis geben, so dass (einhergehend mit der serologischen Verifizierung) durch einen unverzüglichen Therapiebeginn der Progression des Syndroms entgegengewirkt werden kann. Im Vergleich zu Enzephalitisformen mit anderen Antikörperspezifitäten ist bei Anti-LGI1-Positivität die Häufigkeit von Tumoren (Schilddrüsenkarzinom, kleinzelliges Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, Ovarialteratom und Thymom) mit 0% bis 10% gering (Tabelle 1). Bei mehr als der Hälfte der Betroffenen zeigen sich T2-Signalintensitäten des medialen Temporallappens im MRT (56%–84%) sowie EEG-Abnormalitäten (76%). Der Liquorbefund ist in der Regel unauffällig, nur selten findet sich eine lymphozytäre Pleozytose oder Eiweißanhöhung. Immuntherapien bewirken in etwa 80% der Fälle eine weitgehende bis vollständige Rückbildung der Symptome, wobei die Antikörpertiter mit der sinkenden Krankheitsaktivität korrelieren. Die Wahrscheinlichkeit von Rezidiven liegt unter 20% und die Letalitätsrate beträgt ca. 2 bis 6% [17, 19, 28].

Pathophysiologisch könnte die Antikörper-vermittelte Beeinträchtigung der LGI1-Funktion zu einer gesteigerten Erregbarkeit führen und entsprechend der vorrangig hippocampalen Lokalisation des Antigens in der Symptomatik einer limbischen Enzephalitis resultieren. In Entsprechung hierzu sind Mutationen im *LGI1*-Gen, die eine Sekretions- bzw. Funktionsstörung von LGI1 verursachen, mit einem erblichen epileptischen Syndrom (ADLTE bzw. ADPEAF) assoziiert [42, 105–107]. Darüber hinaus geht die Inaktivierung des *LGI1*-Gens mit letaler Epilepsie sowie einer Hypomyelinisierung im peripheren und zentralen Nervensystem einher [48, 108].

Autoantikörper gegen CASPR2 finden sich ebenfalls bei Patienten mit limbischer Enzephalitis, treten aber mehrheitlich im Zusammenhang mit einer erworbenen Neuromyotonie oder dem Morvan-Syndrom auf. Betroffen sind vor allem Männer (ca. 85%) im Alter von durchschnittlich 60 Jahren. Kernsymptom der Neuromyotonie ist die periphere neuronale Hyperexzitabilität, die beim Morvan-Syndrom zudem mit zentralnervösen Störungen wie Gedächtnisdefiziten, Anfällen, Verwirrtheit, Desorientiertheit, Halluzinationen, Schlaflosigkeit, Gewichtsverlust und einer Hyponatriämie vergesellschaftet ist [18, 19, 29]. Angaben zur Häufigkeit assoziierter Tumore (meist Thymome) divergieren in unterschiedlichen Untersuchungskollektiven (0 bis 35%) (Tabelle 1). Bei Patienten ohne Tumor führen immunmodulatorische Interventionen und symptomatische Behandlung in der Regel (80%) zu einer erheblichen Besserung von

Symptomen und Prognose [18, 19, 62]. Paraneoplastische Fälle scheinen hingegen mit geringem oder ausbleibendem Therapieerfolg und einer schlechten Prognose mit möglichem letalem Verlauf verbunden zu sein. [19].

Hinsichtlich der Pathophysiologie wird vermutet, dass CASPR2-Autoantikörper zu einer quantitativen Abnahme von CASPR2-VGKC-Komplexen auf den Axonen peripherer Nerven und somit zu der für Neuromyotonie typischen neuromuskulären Hyperexzitabilität führen [19, 109]. In Entsprechung hierzu treten im Zusammenhang mit Mutationen oder Polymorphismen des CASPR2-kodierenden Gens (*CNTNAP2*) Symptome ähnlich denen von Anti-CASPR2-positiven Patienten auf, beispielsweise fokale Epilepsie oder neuropsychiatrische Veränderungen [110, 111].

## Diagnose

Die Diagnostik der limbischen Enzephalitis mit Autoantikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene basiert zunächst auf der Kombination aus dem charakteristischen klinischen Bild sowie gegebenenfalls stützenden Befunden aus MRT (temporomediale FLAIR-/T2-Signalanhebung), EEG (temporaler Fokus oder generalisierte Verlangsamung) und Liquoruntersuchung (lymphozytäre Pleozytose, Proteinerhöhung, oligoklonale Banden). Aufgrund der Überlappung klinischer Symptome erfolgt die endgültige Diagnosestellung durch den monospezifischen Nachweis von Serum- oder Liquorantikörpern gegen Glutamat-Rezeptoren (Typen NMDA und AMPA), GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren, LGI1 oder CASPR2. Ein positiver serologischer Befund sollte immer eine intensive Tumorsuche nach sich ziehen (Tabelle 1). Da die Möglichkeit besteht, dass bei initial negativem onkologischen Befund ein Tumor erst Monate nach den ersten neurologischen Symptomen oder einhergehend mit Rezidiven identifiziert wird, sollten über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren periodische Wiederholungen von MRT- und Ultraschall-Untersuchungen ein Bestandteil der Nachsorge sein [14, 21, 68]. Eine frühzeitige Diagnosestellung einschließlich adäquater Laboranalyse ist von hoher prognostischer Relevanz, da die meisten Patienten gut auf frühe immuntherapeutische Maßnahmen (Corticosteroide, Plasmapherese, intravenöse Immunglobuline, Rituximab, Cyclophosphamid u.a.) und, im Falle von Neoplasien, auf die Tumorentfernung ansprechen [14–20, 62, 73].

Als Differentialdiagnosen müssen vor allem infektiöse Enzephalitiden (z.B. HSV-Enzephalitis) [112, 113] sowie diverse autoimmune Ätiologien mit neuropsychiatrischen Manifestationen in Betracht gezogen werden. Zu letzteren zählen neben Enzephalitiden mit klassischen paraneoplastischen Autoantikörpern (gegen intrazelluläre onkoneuronale Antigene: Hu, Ma, CV2, Amphiphysin) auch der neuropsychiatrische Lupus, das Sjögren-Syndrom, die Hashimoto-Enzephalopathie, das Anti-Phospholipidsyndrom, metabolische Enzephalopathien, das Korsakow-Syndrom, die primäre Angitis des ZNS und andere [2, 3, 61, 62, 114]. Nicht selten führen die Symptome zur Verdachtsdiagnose einer drogen- oder medikamenteninduzierten Psychose (z.B.

malignes neuroleptisches Syndrom). In Fällen von Anti-Glutamat-Rezeptor-(Typ NMDA)-Enzephalitis wurde das Krankheitsbild zunächst als „idiopathische Enzephalitis mit psychiatrischen Manifestationen und Dyskinesien“ oder als „Enzephalitis lethargica“ klassifiziert [20, 115, 116].

## Serologische Labordiagnostik

Fluoreszenz- oder lichtmikroskopische Immunhistochemie und Immunzytochemie sind die primär angewandten Methoden zur Bestimmung von Autoantikörpern gegen Antigene der neuronalen Zelloberfläche. Die Präsenz dieser Antikörper in Serum- oder Liquorproben erzeugt (i) auf Gewebeabschnitten des Rattenhirns eine charakteristische Anfärbung (Cerebellum, Hippocampus, „Anti-Neuropil-Antikörper“), (ii) eine Oberflächenfärbung kultivierter Hippocampus-Neuronen (Anti-CASPR2-Antikörper: Färbung der Juxtagranodien peripherer Nerven) und (iii) Reaktivität mit spezifisch transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) (Abbildung 1) [14–19, 74].

Die Gewebe- und Zellsubstrate neuronalen Ursprungs (i, ii) enthalten die in nativer Form exprimierten Zielmoleküle mit in-situ-Lokalisation an der Neuronenoberfläche, verbunden mit maximal authentischer Antigen-Darstellung (Konformationsepitope), charakteristischem Bindungsmuster und hoher diagnostischer Sensitivität. Ein eindeutiger Rückschluss auf das jeweilige Zielantigen bzw. eine zuverlässige Differenzierung der unterschiedlichen Autoantikörper ist mittels dieser Substrate jedoch nicht uneingeschränkt möglich, da sich die Bindungsmuster zum Teil nur geringfügig voneinander unterscheiden und die Musterinterpretation durch mögliche parallele Autoreaktivitäten gegen andere neuronale oder nukleäre Targets (z.B. ANA) erschwert sein kann. Die Kenntnis des Zielantigens ist jedoch von großer klinischer Bedeutung, da das therapeutische Vorgehen und die Tumorrassoziation zwischen den verschiedenen Enzephalitisformen variieren (Tabelle 1).

Rekombinante humane Zelllinien (iii), welche das zu untersuchende Antigen auf der Zelloberfläche exprimieren, sind für den hochsensitiven, monospezifischen Antikörernachweis optimal als Substrat geeignet. Die Ziel-Moleküle benötigen als Membran-assoziierte Proteine (Rezeptoren/Ionenkanäle und assoziierte Faktoren) hinsichtlich ihrer Synthese und Präsentation ein möglichst authentisches Expressions- und Detektionssystem. Für maximale Sensitivität und Spezifität lässt man die transfizierten Zellen selektiv diejenigen Antigenkomponenten exprimieren, welche die immunologisch relevanten Epitope enthalten: die NR1-Untereinheit von Glutamat-Rezeptoren (Typ NMDA) [14, 22], GluR1- und GluR2-Untereinheiten von Glutamat-Rezeptoren (Typ AMPA) [15], die B1-Untereinheit von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren [16] sowie die VGKC-assoziierten Proteine LGI1 und CASPR2 [17–19]. Die rekombinanten zellbasierten Assays waren früher nur wenigen spezialisierten Forschungslaboren vorbehalten, da diese Methode mit aufwendigen molekularbiologischen und immunologischen Techniken verbunden ist. Zudem sind die Langzeitkultivierung der

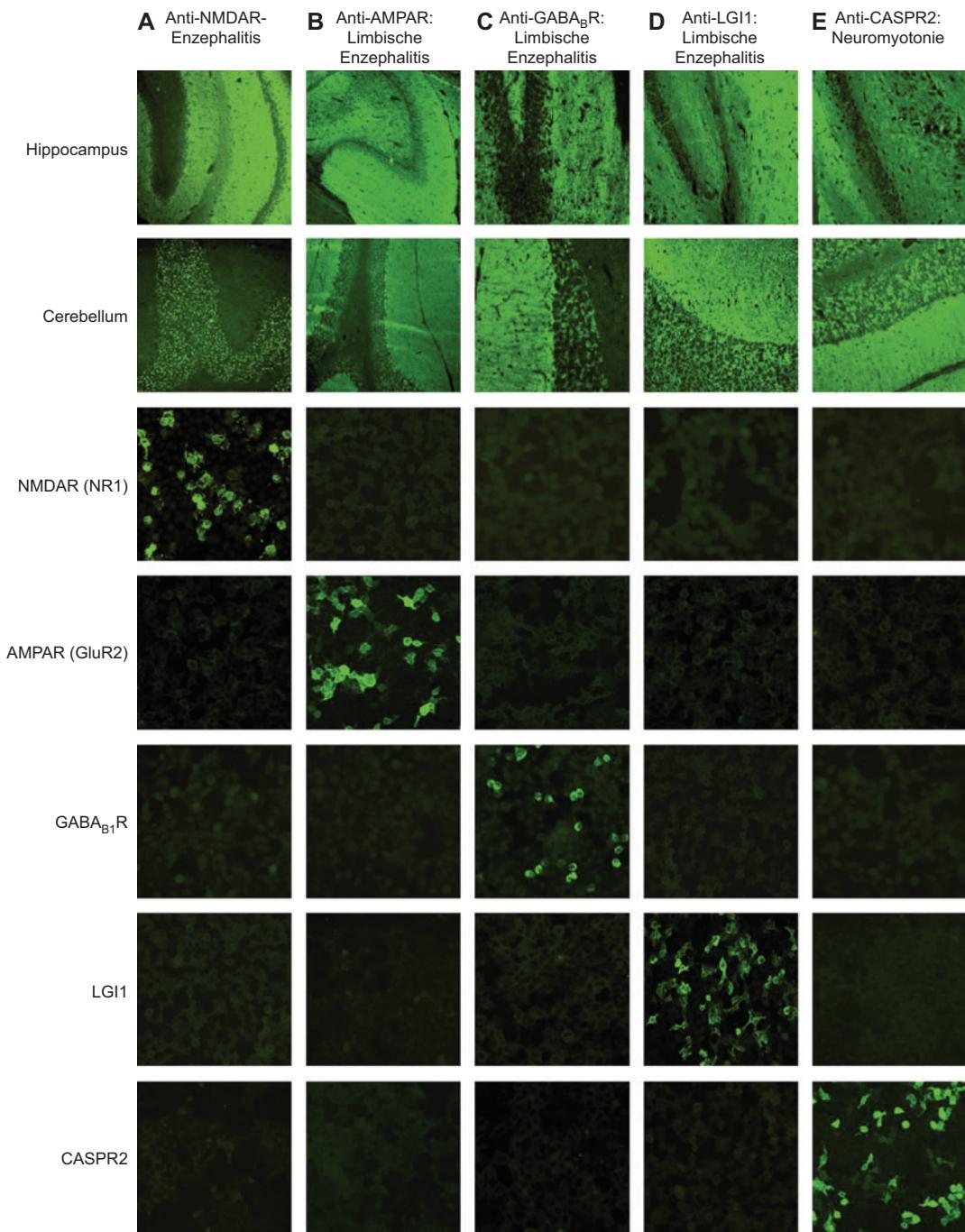
Zelllinien und deren Transfektion zu Beginn jeder Testreihe nicht nur arbeits- und zeitintensiv, sondern können auch die Reproduzierbarkeit der Analysen beeinträchtigen. Durch die Entwicklung standardisierter Testsysteme auf BIOCHIP-Basis kann das Nachweisverfahren mittlerweile aber in jedem Labor angewandt werden, in dem die indirekte Immunfluoreszenz etabliert ist [74, 117–120]. Eine umfassende Serodiagnostik mit transfizierten Zellen und ZNS-Geweben als Zielsubstraten ermöglicht einerseits die Differenzierung der symptomatisch überlappenden Enzephalitis-Subtypen, andererseits deren differentialdiagnostische Abgrenzung zur infektiösen Enzephalitis und zu Syndromen mit klassischen paraneoplastischen Autoantikörpern oder anderen autoimmunen Ätiologien.

Eine diagnostische Besonderheit betrifft den Nachweis von Antikörpern gegen Antigene des VGKC-Komplexes. Da diese zu ca. 80% gegen die VGKC-assoziierten Proteine LGI1 oder CASPR2 gerichtet sind, empfiehlt es sich, die Patientenproben zunächst monospezifisch mittels rekombinanter Zellsubstrate auf ihre Reaktivität gegen LGI1 bzw. CASPR2 zu untersuchen. Fällt dieser Nachweis negativ aus, ist zusätzlich ein Radioimmunoassay durchzuführen, d.h. eine Immunpräzipitation <sup>125</sup>I- $\alpha$ -Dendrotoxin-markierter VGKC-Komplexe aus Hirn-Homogenaten. Auf diese Weise werden zusätzlich auch solche Antikörper erfasst, die sich gegen die Kaliumkanal-Untereinheiten K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>1.2 und K<sub>v</sub>1.6 oder gegen weitere, bislang nicht identifizierte VGKC-Komplex-Proteine richten [19].

Eine Quantifizierung der Antikörpertiter bzw. ein Titervergleich zwischen Verlaufsproben kann anhand der spezifischen Fluoreszenzintensitäten im indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) vorgenommen werden. Häufig geht eine Verringerung der Antikörpertiter mit der klinischen Besserung einher [14, 15, 20, 22, 28, 73]. Da die Möglichkeit einer intrathekalen Antikörpersynthese bei gleichzeitig niedrigem oder negativem Serumtiter besteht, sollten Serum- und Liquorproben stets parallel analysiert werden. Die Einbeziehung des Liquors ist von besonderer Bedeutung bei der Untersuchung von Antikörpern gegen Glutamat-Rezeptoren (Typ NMDA), sowie generell bei Patienten mit bereits begonnener Plasmapherese-Therapie [14, 16, 65].

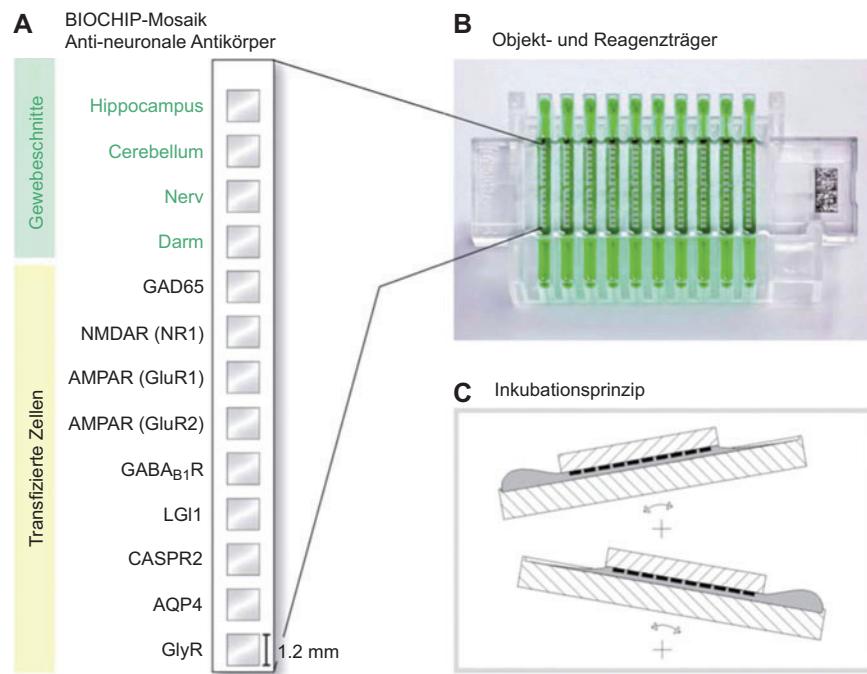
## Prävalenz anti-neuronaler Autoantikörper

Um die relative Häufigkeit von Antikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene zu untersuchen, wurden im klinisch-immunologischen Laboratorium des Letztautors im Zeitraum von Oktober bis Dezember 2010 sämtliche Befunde analysiert, die aus 2716 Einsenderaufträgen zur Bestimmung anti-neuronaler Autoantikörper resultierten. Der Nachweis der Autoantikörper (IgG) in Serum- und Liquorproben erfolgte mit multiparametrischen Testsystemen im IIFT (Abbildung 2). Zur Herstellung monospezifischer Zellsubstrate wurden cDNA-Fragmente generiert, welche für die jeweiligen Zielantigene kodieren: Glutamat-Rezeptor (Typ NMDA; Untereinheit NR1), Glutamat-Rezeptor (Typ AMPA; Untereinheiten GluR1/GluR2), GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Untereinheit



**Abbildung 1** Nachweis von Autoantikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene durch indirekte Immunfluoreszenz. Antigensubstrate: Hippocampus (Gefrierschnitt; Ratte), Cerebellum (Gefrierschnitt; Ratte), transizierte HEK293-Zellen mit Oberflächenexpression der rekombinanten Zielantigene.

(A) Autoantikörper gegen Glutamat-Rezeptoren (Typ NMDA): Fluoreszenz des Stratum moleculare des Hippocampus (Neuropilfärbung) sowie der Neuronenkerne des Stratum granulosum des Cerebellum, monospezifischer Nachweis mit NR1-transfizierten HEK293-Zellen. (B) Autoantikörper gegen Glutamat-Rezeptoren (Typ AMPA): Fluoreszenz des Stratum moleculare des Hippocampus (Neuropilfärbung), der Strata moleculare und granulosum des Cerebellum sowie der Purkinjezellen; monospezifischer Nachweis mit GluR1/GluR2-transfizierten HEK293-Zellen. (C) Autoantikörper gegen GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren: grobgranuläre Fluoreszenz des Stratum moleculare des Hippocampus (Neuropilfärbung) und des Cerebellum; zusätzlich fleckige Fluoreszenz des Stratum granulosum des Cerebellum; monospezifischer Nachweis mit GABA<sub>B1</sub>-transfizierten HEK293-Zellen. (D) Autoantikörper gegen LGI1: feingranuläre Fluoreszenz des Stratum moleculare des Hippocampus (Neuropilfärbung) und des Cerebellum; äußere Molekularschicht des Hippocampus reagiert stärker als die innere; zusätzlich fleckige Fluoreszenz des Stratum granulosum des Cerebellum; monospezifischer Nachweis mit LGI1-transfizierten HEK293-Zellen. (E) Autoantikörper gegen CASPR2: Fluoreszenz des Stratum moleculare des Hippocampus (Neuropilfärbung) und des Cerebellum; zusätzlich fleckige Fluoreszenz des Stratum granulosum des Cerebellum; monospezifischer Nachweis mit CASPR2-transfizierten HEK293-Zellen.



**Abbildung 2** Multiparametrischer Nachweis anti-neuronaler Autoantikörper.

(A) BIOCHIP-Mosaik mit Gewebeschnitten und transfizierten Zellen. Die Mosaiken sind reihenförmig auf den Stegen eines Objektträgers angeordnet. (B) Diese Stege ragen nach unten in die zehn rinnenförmigen Reaktionskammern eines Reagenzträgers, so dass die BIOCHIP-Oberflächen und Antigensubstrate mit den Reagenzien in Kontakt kommen (Aufsicht). Auf diese Weise können zehn Patientenproben parallel inkubiert werden. (C) Die Inkubation erfolgt auf einem Wippschüttler, um eine kontinuierliche Konvektion der Reagenzien und eine gleichmäßige Benetzung aller BIOCHIPS zu gewährleisten (EUROTIDE-Prinzip, seitliche Ansicht). Dies führt zu verkürzten Reaktionszeiten, verstärkten Fluoreszenz-Signalintensitäten, einheitlicher Anfärbung und zur Reduktion von Inkubationsartefakten. (GAD65: Glutamat-Decarboxylase Isoform 65; AQP4: Aquaporin-4; GlyR: Glycin-Rezeptor).

B1), LGI1 (membranständiges Fusionsprotein), CASPR2, GAD65, Aquaporin-4 und Glycin-Rezeptor. Nach Insertion der cDNA in eukaryotische Expressionsvektoren wurden HEK293-Zellen mit den Plasmiden transfiziert, auf Deckgläsern ausgesät und nach 48 Stunden fixiert. Anschließend erfolgte die Unterteilung der Deckgläser in millimetergroße Fragmente (BIOCHIPS), die auf den Stegen von Objektträgern reihenförmig zu Mosaiken zusammengesetzt wurden. Das Substratspektrum der Mosaiken beinhaltete neben den verschiedenen rekombinanten Zelllinien auch Gefrierschnitte neuronaler Gewebe (Hippocampus, Cerebellum, Nerv und Darm) [117–119]. Optimierte Reaktionsbedingungen bei der Assay-Inkubation wurden durch die EUROTIDE-Technologie gewährleistet, bei der die Reaktion im Analyseansatz durch eine forcierte Konvektion unterstützt wird (Abbildung 2) [121].

Die Identifizierung klassischer paraneoplastischer Autoantikörper (Anti-Hu, -Yo, -Ri, -Ma, -CV2, -Amphiphysin) basierte auf dem Vorliegen des jeweils charakteristischen Fluoreszenzmusters auf verschiedenen diagnostisch relevanten Geweben (IIFT) parallel zur Reaktivität im monospezifischen Linienblot-Assay. In die Auswertung einbezogen wurden nicht nur die entsprechend Analyseauftrag angefragten Parameter (Hauptbefunde), sondern auch anti-neuronale

Reaktivitäten, die stattdessen oder zusätzlich nachgewiesen wurden (Nebenbefunde).

Unter den 2716 Serum-/Liquorproben fanden sich 108 Fälle mit anti-neuronalen IgG-Antikörpern, davon 68 mit Antikörpern gegen eines der neuronalen Oberflächenantigene (Gruppe A, 63%), 33 mit Antikörpern gegen ein intrazelluläres onkoneuronales Antigen (Gruppe B, 31%) und 7 mit Antikörpern gegen mehrere Zielantigene (Gruppe C, 6%) (Tabelle 3, Abbildung 3). Bezogen auf diese positiven Proben betrug die Häufigkeit von Reaktivitäten gegen Antigene der Neuronenoberfläche (Gruppen A und C) 67% (72/108) und entsprach somit fast der zweifachen Prävalenz klassischer paraneoplastischer Autoantikörper (Gruppen B und C), die nur 35% (38/108) der Positivbefunde ausmachten. Ein möglicher Bias aufgrund der Laborspezialisierung sowie des Neuheitscharakters der Gruppe-A-Parameter kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Autoantikörper mit Bindungsspezifität für Glutamat-Rezeptoren (Typ NMDA) wurden anteilig am häufigsten nachgewiesen (45/108, 42%). Mit absteigender Prävalenz traten Reaktionen gegen CASPR2 (13/108, 12%), LGI1 (12/108, 11%), Hu (11/108, 10%), Ri (10/108, 9%), Yo (9/108, 8%), CV2 (7/108, 6%), GABA<sub>B</sub>-Rezeptor (4/108, 4%), Ma (2/108, 2%), PCA-2 (1/108, 1%) und Amphiphysin (1/108, 1%) auf. Autoantikörper gegen Glutamat-Rezeptoren (Typ AMPA)

**Tabelle 3** Prävalenz anti-neuronaler IgG-Autoantikörper. Die Angaben (%) beziehen sich auf 108 Positivbefunde in einem Untersuchungszeitraum von 3 Monaten.

Autoantikörper	Positivbefunde (n=108)
<b>A. Autoantikörper gegen neuronale Oberflächenantigene</b>	
NMDAR	41 (38.0%)
AMPAR	–
GABA <sub>B</sub> R	3 (2.8%)
LGI1	12 (11.1%)
CASPR2	12 (11.1%)
Gesamt	68 (63.0%)
<b>B. Klassische paraneoplastische Autoantikörper</b>	
Hu	6 (5.6%)
Yo	9 (8.4%)
Ri	10 (9.3%)
Ma	2 (1.8%)
PCA-2	1 (0.9%)
CV2	4 (3.7%)
Amphiphysin	1 (0.9%)
Gesamt	33 (30.6%)
<b>C. Simultaner Nachweis zweier anti-neuronaler Autoantikörper</b>	
NMDAR/GABA <sub>B</sub> R	1 (0.9%)
NMDAR/CASPR2	1 (0.9%)
NMDAR/Hu	2 (1.8%)
Hu/CV2	3 (2.8%)
Gesamt	7 (6.4%)

wurden im zugrundeliegenden Untersuchungszeitraum in keiner der Proben detektiert (Tabelle 3, Abbildung 3).

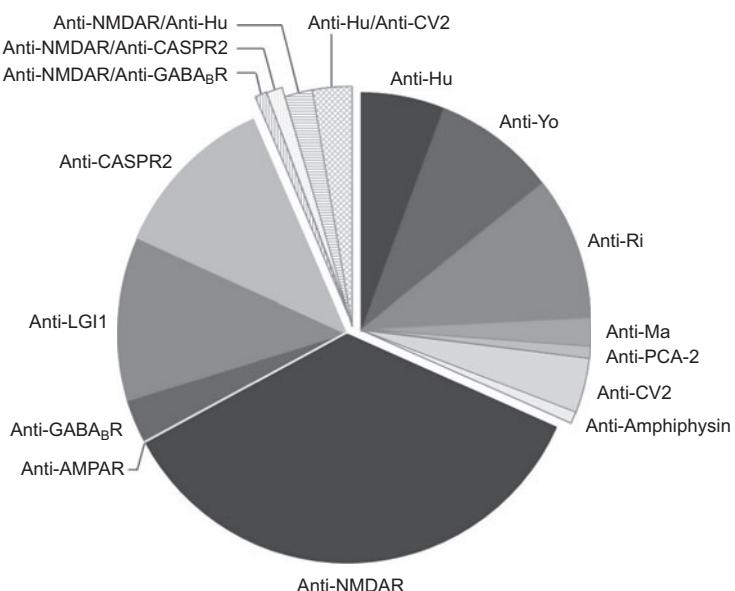
Bei 33% (24/72) der Befunde mit Autoantikörpern gegen neuronale Oberflächenantigene und 26% (10/38) der Befunde mit klassischen paraneoplastischen Autoantikörpern wurden

die positiven Reaktionen durch einen anderen als den laut Analyseauftrag erwarteten Autoantikörper hervorgerufen. Insgesamt stellten 31% (33/108) aller positiven Analyseresultate derartige Nebenbefunde dar (Tabelle 4). Der große Anteil relevanter Nebenbefunde unterstreicht die Bedeutung einer multiparametrischen Antikörperdiagnostik bzw. der Erstellung von Antikörper-Profilen bei der Autoimmun-Enzephalitis: Ohne eine über die erwarteten Parameter (Analyseauftrag) hinausgehende Serologie wären die als Nebenbefunde festgestellten Reaktivitäten nicht erfasst worden. Da der überwiegende Anteil der Nebenbefunde (71%, 24/34) auf Antikörper gegen neuronale Oberflächenantigene entfiel, ist zu vermuten, dass diese neuen Parameter aufgrund ihres eingeschränkten Bekanntheitsgrades in noch unzureichendem Maß in Erwägung gezogen und demzufolge die assoziierten Autoimmunerkrankungen bislang unterdiagnostiziert werden.

Die hier vorgestellten, vergleichsweise hohen Prävalenzen von Autoantikörpern gegen Rezeptoren/Ionenkanäle der Neuronenoberfläche lassen auf die hohe Relevanz schließen, die ihrem Nachweis im Verdachtsfall einer Autoimmun-Enzephalitis zukommt. Mit rekombinanten zellbasierten BIOCHIP-Mosaiken kann die Reaktivität einer Patientenprobe auf verschiedenen Substraten im selben Ansatz untersucht und differentialdiagnostisch relevante Autoantikörper sofort erfasst bzw. ausgeschlossen werden.

## Fazit und Ausblick

Seit vor vier Jahren die Anti-Glutamat-Rezeptor (Typ NMDA)-Enzephalitis einschließlich des zur Befunderhebung notwendigen rezeptorspezifischen Antikörpernachweises erstmals beschrieben wurde, haben auch Autoantikörper gegen weitere neuronale Oberflächenantigene Eingang in die Diagnostik der autoimmunen limbischen Enzephalitis



**Abbildung 3** Relative Häufigkeiten anti-neuronaler IgG-Autoantikörper (n=108; numerische Angaben in Tabelle 3).

**Tabelle 4** Diskrepanzen zwischen angeforderten (Analyseauftrag) und nachgewiesenen anti-neuronalen Autoantikörpern. Bei 33 von 108 untersuchten Proben (31%) zeigte sich in der multiparametrischen Testung ein anderer als der angefragte Autoantikörper.

angefordert	nachgewiesen	Autoantikörper gegen neuronale Oberflächenantigene				Klassische paraneoplastische Autoantikörper				Kombination NMDAR/Hu
		NMDAR	GABA <sub>B</sub> R	LGI1	CASPR2	Hu	Yo	Ri	PCA-2	
Autoantikörper gegen (anderes) neuronales Oberflächenantigen	–	1	1	1	–	2	–	–	–	–
(Anderer) klassischer paraneoplastischer Autoantikörper	7	–	1	4	–	2	1	–	1	1
Sonstige <sup>a</sup>	6	–	–	2	1	–	1	1	–	–

<sup>a</sup>Anti-Aquaporin-4; Anti-Myelin-assoziiertes Glykoprotein.

gefunden. Die Identifizierung der Zielantigene ging mit einer raschen Entwicklung von standardisierten Testsystemen einher, unter denen insbesondere Assays mit spezifisch transfizierten Zellsubstraten eine hoch sensitive und spezifische Antikörperbestimmung in Serum und Liquor ermöglichen. Als Folge können die assoziierten, potentiell fatal verlaufenden Erkrankungen bei immer mehr Patienten frühzeitig diagnostiziert und therapiert werden – mit dem häufigen Resultat einer teilweisen bis vollständigen Genesung, verbunden mit geringeren Letalitätsraten.

Auch in Zukunft ist es wichtig, den Bekanntheitsgrad dieser Parameter weiter zu steigern, ihre Berücksichtigung bei der neurologischen Differentialdiagnose zu forcieren und das diagnostische Potential multiparametrischer Testsysteme zur Erstellung von Antikörper-Profilen stärker zu nutzen. Angesichts kontinuierlicher Bemühungen, Zielstrukturen auf der Neuronenoberfläche zu erkennen und präziser zu charakterisieren, ist die diagnostische Etablierung weiterer serologischer Marker zur Differentialdiagnose der Autoimmun-Enzephalitis in absehbarer Zeit sehr wahrscheinlich.

## Interessenkonflikt

Der korrespondierende Autor weist auf folgende Beziehung hin: K.P. Wandinger, C. Klingbeil, S. Saschenbrecker, K. Borowski, C. Probst und W. Stöcker sind Mitarbeiter der Euroimmun AG. Euroimmun entwickelt und vertreibt Testsysteme zum Nachweis von Autoantikörpern, u.a. gegen neuronale Antigene. Aktuelle Forschungsprojekte von J. Dalmau und A. Vincent werden von Euroimmun unterstützt. Trotz des möglichen Interessenskonfliktes ist der Beitrag unabhängig und produktneutral.

## Literatur

1. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, et al. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:1135–40.
2. Tuzun E, Dalmau J. Limbic encephalitis and variants: classification, diagnosis and treatment. *Neurologist* 2007;13:261–71.
3. Rosenfeld MR, Dalmau J. Update on paraneoplastic and autoimmune disorders of the central nervous system. *Semin Neurol* 2010;30:320–31.
4. Graus F, Saiz A, Dalmau J. Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS. *J Neurol* 2010;257:509–17.
5. Gultekin SH, Rosenfeld MR, Voltz R, Eichen J, Posner JB, Dalmau J. Paraneoplastic limbic encephalitis: neurological symptoms, immunological findings and tumour association in 50 patients. *Brain* 2000;123:1481–94.
6. Albert ML, Austin LM, Darnell RB. Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 2000;47:9–17.
7. Benyahia B, Liblau R, Merle-Beral H, Tourani JM, Dalmau J, Delattre JY. Cell-mediated autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu antibodies. *Ann Neurol* 1999;45:162–7.
8. Rousseau A, Benyahia B, Dalmau J, Connan F, Guillet JG, Delattre JY, et al. T cell response to Hu-D peptides in patients with anti-Hu syndrome. *J Neurooncol* 2005;71:231–6.
9. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine (Baltimore)* 1992;71:59–72.
10. Shams’ili S, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, Hooijkaas H, van der Holt B, et al. Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with antineuronal antibodies: analysis of 50 patients. *Brain* 2003;126:1409–18.
11. Ances BM, Vitaliani R, Taylor RA, Liebeskind DS, Voloschin A, Houghton DJ, et al. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain* 2005;128:1764–77.
12. Bataller L, Kleopa KA, Wu GF, Rossi JE, Rosenfeld MR, Dalmau J. Autoimmune limbic encephalitis in 39 patients: immunophenotypes and outcomes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:381–5.
13. Dalmau J, Tuzun E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, et al. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 2007;61:25–36.
14. Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008;7:1091–8.
15. Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 2009;65:424–34.
16. Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, et al. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol* 2010;9:67–76.

17. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010;9:776–85.
18. Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, et al. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol* 2011;69:303–11.
19. Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, et al. 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* 2010;133:2734–48.
20. Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 2011;10:63–74.
21. Florance NR, Davis RL, Lam C, Szperka C, Zhou L, Ahmad S, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol* 2009;66:11–8.
22. Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010;133:1655–67.
23. Lebas A, Husson B, Didelot A, Honnorat J, Tardieu M. Expanding spectrum of encephalitis with NMDA receptor antibodies in young children. *J Child Neurol* 2010;25:742–5.
24. Zandi MS, Irani SR, Follows G, Moody AM, Molyneux P, Vincent A. Limbic encephalitis associated with antibodies to the NMDA receptor in Hodgkin lymphoma. *Neurology* 2009;73:2039–40.
25. Graus F, Boronat A, Xifro X, Boix M, Svilgelj V, Garcia A, et al. The expanding clinical profile of anti-AMPA receptor encephalitis. *Neurology* 2010;74:857–9.
26. Bataller L, Galiano R, Garcia-Escrig M, Martinez B, Sevilla T, Blasco R, et al. Reversible paraneoplastic limbic encephalitis associated with antibodies to the AMPA receptor. *Neurology* 2010;74:265–7.
27. Boronat A, Sabater L, Saiz A, Dalmau J, Graus F. GABA(B) receptor antibodies in limbic encephalitis and anti-GAD-associated neurologic disorders. *Neurology* 2011;76:795–800.
28. Irani SR, Michell AW, Lang B, Pettingill P, Waters P, Johnson MR, et al. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2011;69:892–900.
29. Vincent A, Irani SR. Caspr2 antibodies in patients with thymomas. *J Thorac Oncol* 2010;5:S277–80.
30. Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 2008;55:1081–94.
31. Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:413–26.
32. Qiu S, Hua YL, Yang F, Chen YZ, Luo JH. Subunit assembly of N-methyl-D-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2005;280:24923–30.
33. Palmer CL, Cotton L, Henley JM. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *Pharmacol Rev* 2005;57:253–77.
34. Sprengel R. Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Tissue Res* 2006;326:447–55.
35. Genoux D, Montgomery JM. Glutamate receptor plasticity at excitatory synapses in the brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34:1058–63.
36. Shepherd JD, Huganir RL. The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:613–43.
37. Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev* 2004;84:835–67.
38. Schwenk J, Metz M, Zolles G, Turecek R, Fritzius T, Bildl W, et al. Native GABA(B) receptors are heteromultimers with a family of auxiliary subunits. *Nature* 2010;465:231–5.
39. Padgett CL, Slesinger PA. GABAB receptor coupling to G-proteins and ion channels. *Adv Pharmacol* 2010;58:123–47.
40. Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:952–62.
41. Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y. Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* 2002;25:564–70.
42. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli BF, et al. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 2002;30:335–41.
43. Chernova OB, Somerville RP, Cowell JK. A novel gene, LGI1, from 10q24 is rearranged and downregulated in malignant brain tumors. *Oncogene* 1998;17:2873–81.
44. Besleaga R, Montesinos-Rongen M, Perez-Tur J, Siebert R, Deckert M. Expression of the LGI1 gene product in astrocytic gliomas: downregulation with malignant progression. *Virchows Arch* 2003;443:561–4.
45. Kunapuli P, Chitta KS, Cowell JK. Suppression of the cell proliferation and invasion phenotypes in glioma cells by the LGI1 gene. *Oncogene* 2003;22:3985–91.
46. Piepoli T, Jakupoglu C, Gu W, Lualdi E, Suarez-Merino B, Poliani PL, et al. Expression studies in gliomas and glial cells do not support a tumor suppressor role for LGI1. *Neuro Oncol* 2006;8:96–108.
47. Kobe B, Deisenhofer J. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 1995;374:183–6.
48. Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, et al. Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:3799–804.
49. Schulte U, Thumfart JO, Klocker N, Sailer CA, Bildl W, Biniossek M, et al. The epilepsy-linked Lgi1 protein assembles into presynaptic Kv1 channels and inhibits inactivation by Kvbeta1. *Neuron* 2006;49:697–706.
50. Fukata Y, Adesnik H, Iwanaga T, Bredt DS, Nicoll RA, Fukata M. Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* 2006;313:1792–5.
51. Leonardi E, Andreazza S, Vanin S, Busolin G, Nobile C, Tosatto SC. A computational model of the LGI1 protein suggests a common binding site for ADAM proteins. *PLoS One* 2011;6:e18142.
52. Staub E, Perez-Tur J, Siebert R, Nobile C, Moschonas NK, Deloukas P, et al. The novel EPTP repeat defines a superfamily of proteins implicated in epileptic disorders. *Trends Biochem Sci* 2002;27:441–4.
53. Sudhof TC. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* 2008;455:903–11.
54. Kirov G, Gumiš D, Chen W, Norton N, Georgieva L, Sari M, et al. Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2008;17:458–65.
55. Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, et al. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K<sup>+</sup> channels

- in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol* 2003;162:1149–60.
56. Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, et al. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K<sub>+</sub> channels. *Neuron* 1999;24:1037–47.
57. Horresh I, Poliak S, Grant S, Bredt D, Rasband MN, Peles E. Multiple molecular interactions determine the clustering of Caspr2 and Kv1 channels in myelinated axons. *J Neurosci* 2008;28:14213–22.
58. Scherer SS, Arroyo EJ. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst* 2002;7:1–12.
59. Moscato EH, Jain A, Peng X, Hughes EG, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Mechanisms underlying autoimmune synaptic encephalitis leading to disorders of memory, behavior and cognition: insights from molecular, cellular and synaptic studies. *Eur J Neurosci* 2010;32:298–309.
60. Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology* 2011;77:179–89.
61. Vincent A, Bien CG, Irani SR, Waters P. Autoantibodies associated with diseases of the CNS: new developments and future challenges. *Lancet Neurol* 2011;10:759–72.
62. Kayser MS, Dalmau J. The emerging link between autoimmune disorders and neuropsychiatric disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2011;23:90–7.
63. DeGiorgio LA, Konstantinov KN, Lee SC, Hardin JA, Volpe BT, Diamond B. A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 2001;7:1189–93.
64. Wong-Kisiel LC, Ji T, Renaud DL, Kotagal S, Patterson MC, Dalmau J, et al. Response to immunotherapy in a 20-month-old boy with anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology* 2010;74:1550–1.
65. Frechette ES, Zhou L, Galetta SL, Chen L, Dalmau J. Prolonged follow-up and CSF antibody titers in a patient with anti-NMDA receptor encephalitis. *Neurology* 2011;76:S64–S66.
66. Luca N, Daengsuwan T, Dalmau J, Jones K, Deveber G, Kobayashi J, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: a newly recognized inflammatory brain disease in children. *Arthritis Rheum* 2011.
67. Schimmel M, Bien CG, Vincent A, Schenck W, Penzien J. Successful treatment of anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis presenting with catatonia. *Arch Dis Child* 2009;94:314–6.
68. Iizuka T, Sakai F, Ide T, Monzen T, Yoshii S, Iigaya M, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis in Japan: long-term outcome without tumor removal. *Neurology* 2008;70:504–11.
69. Iizuka T, Sakai F. Anti-NMDA receptor encephalitis—clinical manifestations and pathophysiology. *Brain Nerve* 2008;60:1047–60.
70. Ferioli S, Dalmau J, Kobet CA, Zhai QJ, Broderick JP, Espay AJ. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: characteristic behavioral and movement disorder. *Arch Neurol* 2010;67:250–1.
71. Uchino A, Iizuka T, Urano Y, Arai M, Hara A, Hamada J, et al. Pseudo-Piano playing motions and nocturnal hypoventilation in anti-NMDA receptor encephalitis: response to prompt tumor removal and immunotherapy. *Intern Med* 2011;50:627–30.
72. Breese EH, Dalmau J, Lennon VA, Apivattanakul M, Sokol DK. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: early treatment is beneficial. *Pediatr Neurol* 2010;42:213–4.
73. Pruss H, Dalmau J, Harms L, Holtje M, Ahnert-Hilger G, Borowski K, et al. Retrospective analysis of NMDA receptor antibodies in encephalitis of unknown origin. *Neurology* 2010;75:1735–9.
74. Wandinger KP, Saschenbrecker S, Stöcker W, Dalmau J. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a severe, multistage, treatable disorder presenting with psychosis. *J Neuroimmunol* 2011;231:86–91.
75. Vincent A, Bien CG. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a cause of psychiatric, seizure, and movement disorders in young adults. *Lancet Neurol* 2008;7:1074–5.
76. Sansing LH, Tuzun E, Ko MW, Baccon J, Lynch DR, Dalmau J. A patient with encephalitis associated with NMDA receptor antibodies. *Nat Clin Pract Neurol* 2007;3:291–6.
77. Niehusmann P, Dalmau J, Rudlowski C, Vincent A, Elger CE, Rossi JE, et al. Diagnostic value of N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in women with new-onset epilepsy. *Arch Neurol* 2009;66:458–64.
78. Pruss H, Dalmau J, Arolt V, Wandinger KP. Anti-NMDA-receptor encephalitis. An interdisciplinary clinical picture. *Nervenarzt* 2010;81:396–408.
79. Kleinig TJ, Thompson PD, Matar W, Duggins A, Kimber TE, Morris JG, et al. The distinctive movement disorder of ovarian teratoma-associated encephalitis. *Mov Disord* 2008;23:1256–61.
80. Tuzun E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 2009;118:737–43.
81. Seki M, Suzuki S, Iizuka T, Shimizu T, Nihei Y, Suzuki N, et al. Neurological response to early removal of ovarian teratoma in anti-NMDAR encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:324–6.
82. Kumar MA, Jain A, Dechant VE, Saito T, Rafael T, Aizawa H, et al. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis during pregnancy. *Arch Neurol* 2010;67:884–7.
83. Alexopoulos H, Kosmidis ML, Dalmau J, Dalakas MC. Paraneoplastic anti-NMDAR encephalitis: long term follow-up reveals persistent serum antibodies. *J Neurol* 2011;258:1568–70.
84. Iizuka T, Yoshii S, Kan S, Hamada J, Dalmau J, Sakai F, et al. Reversible brain atrophy in anti-NMDA receptor encephalitis: a long-term observational study. *J Neurol* 2010;257:1686–91.
85. Martinez-Hernandez E, Horvath J, Shiloh-Malawsky Y, Sangha N, Martinez-Lage M, Dalmau J. Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology* 2011;77:589–93.
86. Manto M, Dalmau J, Didelot A, Rogemond V, Honnorat J. In vivo effects of antibodies from patients with anti-NMDA receptor encephalitis: further evidence of synaptic glutamatergic dysfunction. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:31.
87. Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, et al. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci* 2010;30:5866–75.
88. Manahan-Vaughan D, von Haebler D, Winter C, Juckel G, Heinemann U. A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats. *Hippocampus* 2008;18:125–34.
89. Stone JM, Morrison PD, Pilowsky LS. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia—a synthesis and selective review. *J Psychopharmacol* 2007;21:440–52.
90. Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron* 2001;31:47–58.

91. Prosser HM, Gill CH, Hirst WD, Grau E, Robbins M, Calver A, et al. Epileptogenesis and enhanced prepulse inhibition in GABA(B1)-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:1059–70.
92. Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, Sansig G, van der Putten H, Cryan JF. Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:1050–62.
93. Gassmann M, Shaban H, Vigot R, Sansig G, Haller C, Barbieri S, et al. Redistribution of GABAB(1) protein and atypical GABAB responses in GABAB(2)-deficient mice. *J Neurosci* 2004;24:6086–97.
94. Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, La Russa A, Serra P, et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003;60:560–3.
95. Vincent A, Lang B, Kleopa KA. Autoimmune channelopathies and related neurological disorders. *Neuron* 2006;52:123–38.
96. Tan KM, Lennon VA, Klein CJ, Boeve BF, Pittock SJ. Clinical spectrum of voltage-gated potassium channel autoimmunity. *Neurology* 2008;70:1883–90.
97. Kleopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS. Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K<sup>+</sup> channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain* 2006;129:1570–84.
98. Misawa T, Mizusawa H. Anti-VGKC antibody-associated limbic encephalitis/Morvan syndrome. *Brain Nerve* 2010;62:339–45.
99. Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, et al. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain* 2004;127:701–12.
100. Thieben MJ, Lennon VA, Boeve BF, Aksamit AJ, Keegan M, Vernino S. Potentially reversible autoimmune limbic encephalitis with neuronal potassium channel antibody. *Neurology* 2004;62:1177–82.
101. Buckley C, Oger J, Clover L, Tuzun E, Carpenter K, Jackson M, et al. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol* 2001;50:73–8.
102. Suleiman J, Brenner T, Gill D, Brilot F, Antony J, Vincent A, et al. VGKC antibodies in pediatric encephalitis presenting with status epilepticus. *Neurology* 2011;76:1252–5.
103. Kaymakzade B, Kansu T, Tan E, Dericoglu N. LGI1 related limbic encephalitis and response to immunosuppressive therapy. *J Neurol* [Epub ahead of print, 2011 May 10]. PMID: 21556879. DOI: 10.1007/s00415-011-6044-7.
104. Andrade DM, Tai P, Dalmau J, Wennberg R. Tonic seizures: a diagnostic clue of anti-LGI1 encephalitis? *Neurology* 2011;76:1355–7.
105. Morante-Redolat JM, Gorostidi-Pagola A, Piquer-Sirerol S, Saenz A, Poza JJ, Galan J, et al. Mutations in the LGI1/epittempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet* 2002;11:1119–28.
106. Nobile C, Michelucci R, Andreazza S, Pasini E, Tosatto SC, Striano P. LGI1 mutations in autosomal dominant and sporadic lateral temporal epilepsy. *Hum Mutat* 2009;30:530–6.
107. Sirerol-Piquer MS, Ayerdi-Izquierdo A, Morante-Redolat JM, Herranz-Perez V, Favell K, Barker PA, et al. The epilepsy gene LGI1 encodes a secreted glycoprotein that binds to the cell surface. *Hum Mol Genet* 2006;15:3436–45.
108. Silva J, Sharma S, Hughes B, Yu YE, Cowell JK. Homozygous inactivation of the LGI1 gene results in hypomyelination in the peripheral and central nervous systems. *J Neurosci Res* 2010;88:3328–36.
109. Arimura K, Watanabe O. Immune-mediated neuromyotonia (Isaacs' syndrome)-clinical aspects and pathomechanism. *Brain Nerve* 2010;62:401–10.
110. Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM, et al. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med* 2006;354:1370–7.
111. Friedman JI, Vrijenhoek T, Markx S, Janssen IM, van der Vliet WA, Faas BH, et al. CNTNAP2 gene dosage variation is associated with schizophrenia and epilepsy. *Mol Psychiatry* 2008;13:261–6.
112. Tyler KL. Update on herpes simplex encephalitis. *Rev Neurol Dis* 2004;1:169–78.
113. Whitley RJ, Kimberlin DW. Herpes simplex encephalitis: children and adolescents. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005;16:17–23.
114. Dalmau J, Rosenfeld MR. Paraneoplastic syndromes of the CNS. *Lancet Neurol* 2008;7:327–40.
115. Gable MS, Gavali S, Radner A, Tilley DH, Lee B, Dyner L, et al. Anti-NMDA receptor encephalitis: report of ten cases and comparison with viral encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:1421–9.
116. Dale RC, Irani SR, Brilot F, Pillai S, Webster R, Gill D, et al. N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in pediatric dyskinetic encephalitis lethargica. *Ann Neurol* 2009;66:704–9.
117. Stöcker W, Teegen B, Meyer W, Müller-Kunert E, Proost S, Schlumberger W, et al. Differenzierte Autoantikörper-Diagnostik mit BIOCHIP-Mosaiken. In: Conrad K, editor. Autoantikörper. Lengerich (Deutschland): Pabst Science Publishers 1998;78–99.
118. Wandinger KP, Probst C, Komorowski L, Saschenbrecker S, Rosemann A, Mothes T, et al. Novel recombinant antigenic targets for the determination of (auto)antibodies in autoimmune dermatoses, neurological disorders and gastrointestinal diseases. In: Conrad K, et al., editors. From pathogenesis to therapy of autoimmune diseases. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity 6. Lengerich (Deutschland): Pabst Science Publishers 2009;179–90.
119. Wandinger KP, Dalmau J, Borowski K, Probst C, Fechner K, Stöcker W. Recombinant immunofluorescence assay for the detection of anti-glutamate receptor (type NMDA) antibodies in the differential diagnosis of autoimmune encephalitis. In: Conrad K, et al., editors. From pathogenesis to therapy of autoimmune diseases. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity 6. Lengerich (Deutschland): Pabst Science Publishers 2009;434–5.
120. Jarius S, Probst C, Borowski K, Franciotta D, Wildemann B, Stoecker W, et al. Standardized method for the detection of antibodies to aquaporin-4 based on a highly sensitive immunofluorescence assay employing recombinant target antigen. *J Neurol Sci* 2010;291:52–6.
121. Wandinger KP, Klingbeil C, Waters P, Dalmau J, Saschenbrecker S, Borowski K, et al. Multiparametric serological testing in autoimmune encephalitis using a recombinant immunofluorescence assay and EUROTIDE technology. In: Conrad K, et al., editors. From prediction to prevention of autoimmune diseases. Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity 7. Lengerich (Deutschland): Pabst Science Publishers 2011;706–8.