

Silamed 2022, Horgen

# Indirekte Immunofluoreszenz auf transfizierten Zellen und iIF auf Cerebellum

Simone Ferrari-Fidel

Fachbereichsexperte BMA

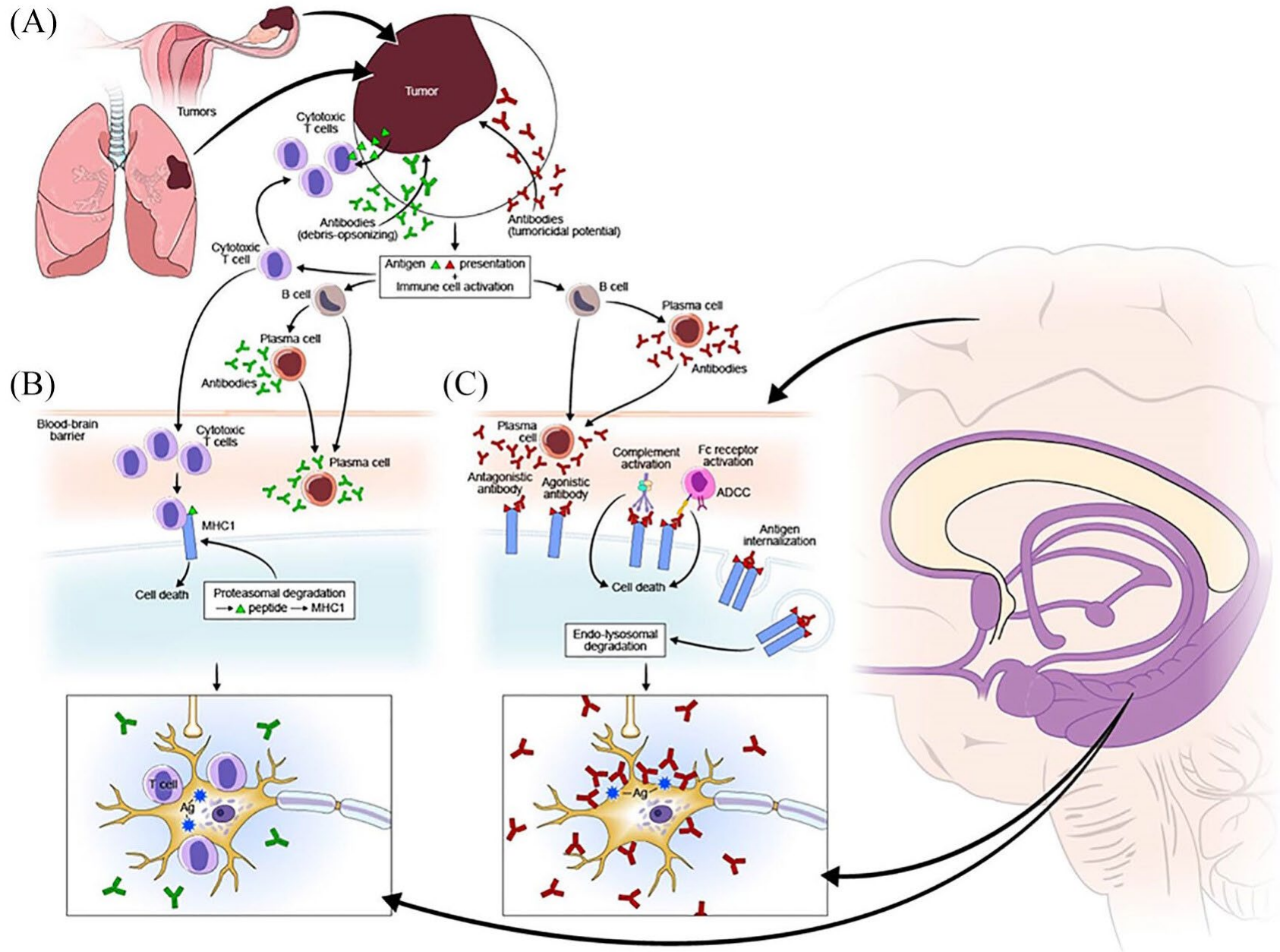
Universitätsspital Zürich, Klinik für Immunologie

SILAMED 28. April 2022



# Neurologische paraneoplastische Syndrome (NPS)

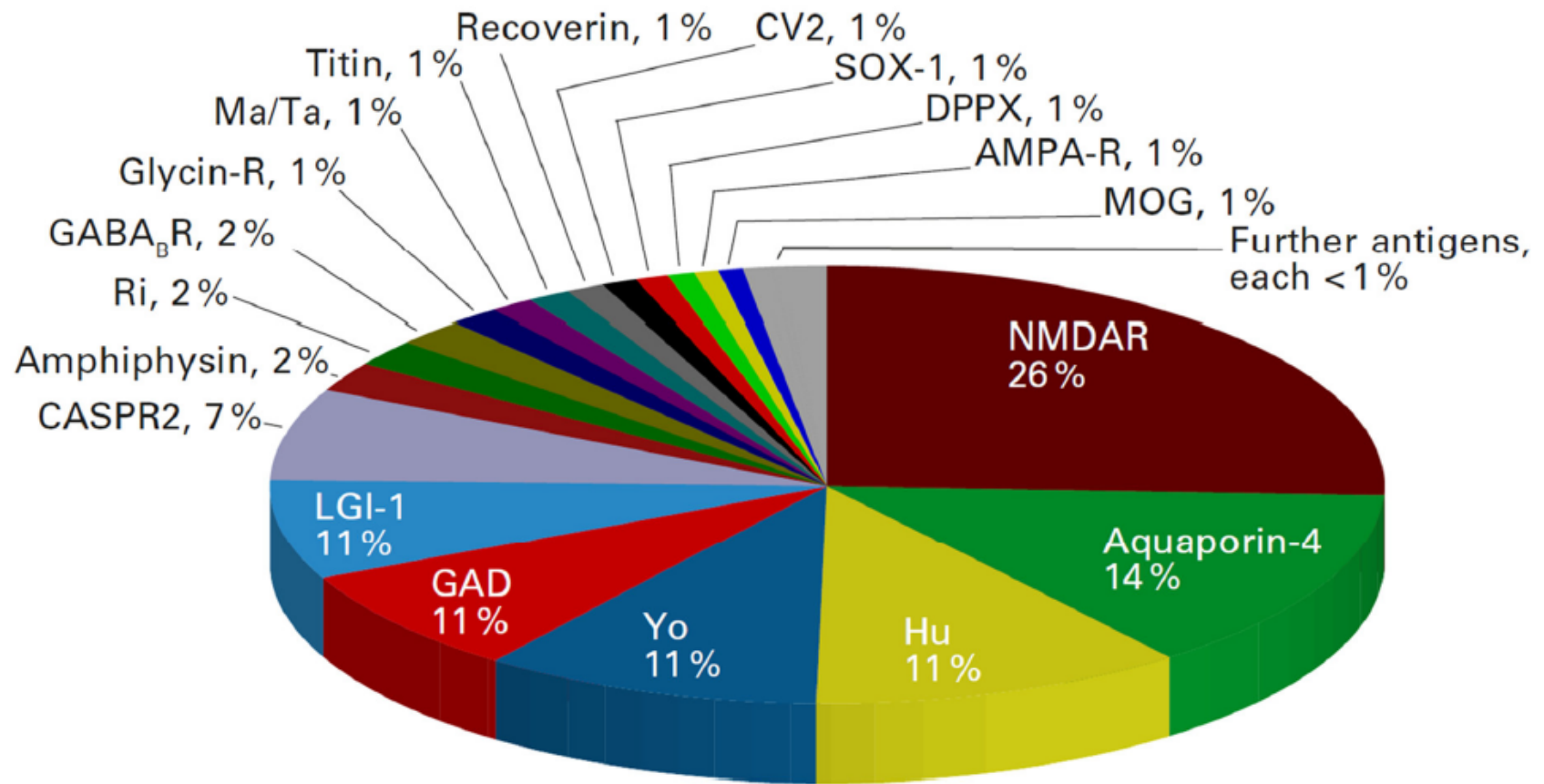
- NPS treten bei etwa 1 von 300 Patienten mit Tumoren auf. Die angegebene Inzidenz schwankt jedoch zwischen 0,89 und 4,4 pro 100'000/Jahr, was darauf hindeutet, dass Unterdiagnose immer noch ein relevantes Thema ist. (Vogrig et al. 2019)
- 67% Weiblich, Durchschnittsalter 51, MRI in 75 % der Fälle normal (Vogrig et al. 2019)
  - Wenn ein Tumor ektop ist, das heisst ausserhalb des Nervensystems neuronale Antigen exprimiert, kann die Immunantwort gegen den Tumor und gegen diese Antigen sich sekundär dann auch gegen die Antigene im Nervensystem richten und zu Schäden führen.
- Onkoneurale Autoantikörper, die der Diagnose des Tumors bis zu mehrere Jahre vorausgehen können, sind daher wichtige diagnostische Marker.



# Neurologische paraneoplastische Syndrome

Autoantikörper gegen <u>intrazelluläre neuronale Antigene</u>	Autoantikörper gegen neuronale <u>Oberflächen- oder synaptische Antigene</u>
Hohe Tumorspezifität >95%	Tumorspezifität 10-60%
Autoantikörper nicht direkt pathogen	Autoantikörper pathogen
Cytotoxische T-Zellen	Ev. Membrane attack complex (MAC)
Irreversible Schäden	Reversible Schäden
Eingeschränkter oder kein Erfolg bei der Immuntherapie	Häufig Erfolg bei der Immuntherapie
Der Tumor muss intensiv gesucht werden (jede 6 Monate für 4 Jahre)	Gering Tumorassoziation
Line Immunoblot und IIF	Transfizierte Zellen IIF

# Diagnose autoimmuner neurologischer Erkrankungen



[Stöcker et al. Scientific presentation on EAN, Berlin 2015]

**Table 1** High-Risk Antibodies (>70% Associated With Cancer)

Antibody (alternative name)	Neurologic phenotypes	Frequency of cancer (%)	Usual tumors	Sex, age-related, and other specificities
<b>Hu (ANNA-1)<sup>8</sup></b>	SNN, chronic gastrointestinal pseudo-obstruction, EM, and LE	85	SCLC >> NSCLC, other neuroendocrine tumors, and neuroblastoma	LE is usually nonparaneoplastic in patients aged <18 y <sup>18</sup>
<b>CV2/ CRMP5<sup>30,e17,e40,e41</sup></b>	EM and SNN	>80	SCLC and thymoma	Patients with an associated thymoma are younger and present more frequently MG and less commonly neuropathy
<b>SOX1<sup>36,e42</sup></b>	LEMS with and without rapidly progressive cerebellar syndrome	>90	SCLC	Stronger correlation with SCLC than with a particular neurologic presentation
<b>PCA2 (MAP1B) 57,e43,e44</b>	Sensorimotor neuropathy, rapidly progressive cerebellar syndrome, and EM	80	SCLC, NSCLC, and breast cancer	
<b>Amphiphysin<sup>31,e18</sup></b>	Polyradiculoneuropathy, SNN, EM, SPS	80	SCLC and breast cancer	Associated antibodies commonly coexist. Patients with isolated anti-amphiphysin → women, with breast cancer and SPS
<b>Ri (ANNA-2)<sup>20,26</sup></b>	Brainstem/cerebellar syndrome, OMS	>70	Breast > lung (SCLC and NSCLC)	Breast cancer in women; lung cancer in men
<b>Yo (PCA-1)<sup>21,e16</sup></b>	Rapidly progressive cerebellar syndrome	>90	Ovary and breast cancers	Almost all female; in men, antigen expression by tumor should be proven
<b>Ma2 and/or Ma<sup>45,e15,e45</sup></b>	LE, diencephalitis, and brainstem encephalitis	>75	Testicular cancer and NSCLC	Young men → testicular tumors and isolated Ma2 positivity; older patients → SCLC and both Ma1/2 positivity
<b>Tr (DNER)<sup>22,23</sup></b>	Rapidly progressive cerebellar syndrome	90	Hodgkin lymphoma	
<b>KLHL11<sup>48-50</sup></b>	Brainstem/cerebellar syndrome	80	Testicular cancer	Young men

Abbreviations: ANNA = antineuronal nuclear antibody; CRMP5 = collapsin response-mediator protein 5; DNER = delta/notch-like epidermal growth factor-related receptor; EM = encephalomyelitis; KLHL11 = Kelch-like protein 11; LE = limbic encephalitis; LEMS = Lambert-Eaton myasthenic syndrome; MAP1B = microtubule-associated protein 1B; MG = myasthenia gravis; NMDAR = NMDA receptor; NSCLC = non-small-cell lung cancer; OMS = opsoclonus-myoclonus syndrome; PCA = Purkinje cell antibody; SCLC = small-cell lung cancer; SNN = sensory neuronopathy; SPS = stiff-person syndrome.

**Table 2** Intermediate-Risk Antibodies (30%–70% Associated With Cancer)

Antibody	Neurologic phenotypes	Frequency of cancer (%)	Usual tumors	Sex, age-related, and other specificities
AMPA <sup>R</sup> <sup>16,17,e46</sup>	Limbic encephalitis	>50	SCLC and malignant thymoma	Paraneoplastic origin is more likely when other onconeural antibodies co-occur
GABA <sub>B</sub> R <sup>e14,15,e2,e3,e47-e49</sup>	Limbic encephalitis	>50	SCLC	Paraneoplastic cases are more commonly observed in elderly men, smokers, with associated anti-KCTD16 antibodies. Most of young patients are not paraneoplastic
mGluR5 <sup>38</sup>	Encephalitis	~50	Hodgkin lymphoma	
P/Q VGCC <sup>e50,e51</sup>	LEMS, rapidly progressive cerebellar syndrome	50 (LEMS; nearly 90 for rapidly progressive cerebellar syndrome)	SCLC	Co-occurrence with N-type VGCC antibodies might be slightly more common in paraneoplastic LEMS <sup>e52-e54</sup>
NMDAR <sup>40,43,44</sup>	Anti-NMDAR encephalitis	38	Ovarian or extraovarian teratomas	Tumor (mostly ovarian teratomas) predominates in female aged between 12 and 45 y (50%). Elderly patients have less frequently tumors (<25%), but usually they are carcinomas. Paraneoplastic cases in children are very rare (<10%)
CASPR2 <sup>51,52</sup>	Morvan syndrome	50	Malignant thymoma	CASPR2 should be considered as intermediate-risk antibody only in the setting of Morvan syndrome. When associated with other neurologic syndromes, the risk of cancer is very low.

Abbreviations: AMPAR =  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; GABA<sub>B</sub>R = gamma-aminobutyric acid-b receptor; KCTD16 = potassium channel tetramerization domain containing; LEMS = Lambert-Eaton myasthenic syndrome; mGluR5 = metabotropic glutamate receptor type 5; NMDAR = NMDA receptor; SCLC = small-cell lung cancer; VGCC = voltage-gated calcium channel.

Updated Diagnostic Criteria for Paraneoplastic Neurologic Syndromes, Graus et al. 2021

**Table 3** Lower-Risk Antibodies (<30% Associated With Cancer)

Antibody	Neurologic phenotypes	Frequency of cancer (%)	Usual tumors	Sex, age-related, and other specificities
<b>mGluR1</b> <sup>e55</sup>	Cerebellar ataxia	30	Mostly hematologic	
<b>GABA<sub>A</sub>R</b> <sup>39,e56</sup>	Encephalitis	<30	Malignant thymoma	Paraneoplastic origin is less frequent (10%) in children than in adults (60%)
<b>CASPR2</b> <sup>51,52,e57,e58</sup>	LE, acquired neuromyotonia (Isaac syndrome), and Morvan syndrome	<30	Malignant thymoma	Morvan syndrome is more associated (≈50%) with malignant thymoma, whereas LE is almost always nonparaneoplastic
<b>GFAP</b> <sup>e59,e60</sup>	Meningoencephalitis	≈20	Ovarian teratomas and adenocarcinomas	May occur as an immunologic accompaniment in anti-NMDAR encephalitis with ovarian teratomas
<b>GAD65</b> <sup>e61,e62</sup>	LE, SPS, and cerebellar ataxia	<15	SCLC, other neuroendocrine tumors, and malignant thymoma	Paraneoplastic patients are older, more frequently male, with associated neuronal antibodies, and atypical clinical presentations
<b>LGI1</b> <sup>e63-e67</sup>	LE	<10	Malignant thymoma and neuroendocrine	Paraneoplastic cases are mainly observed in patients with Morvan syndrome and both serum LGI1 and CASPR2 antibodies
<b>DPPX</b> <sup>e68,e69</sup>	Encephalitis with CNS hyperexcitability and PERM	<10	B-cell neoplasms	
<b>GlyR</b> <sup>55,56</sup>	LE and PERM	<10	Malignant thymoma and Hodgkin lymphoma	
<b>AQP4</b> <sup>e70</sup>	Neuromyelitis optica spectrum disorder	<5	Adenocarcinomas	Older age, male, and severe nausea/vomiting at onset
<b>MOG</b> <sup>e71-e73</sup>	MOG antibody-associated disease	5 cases reported	Mostly ovarian teratomas	

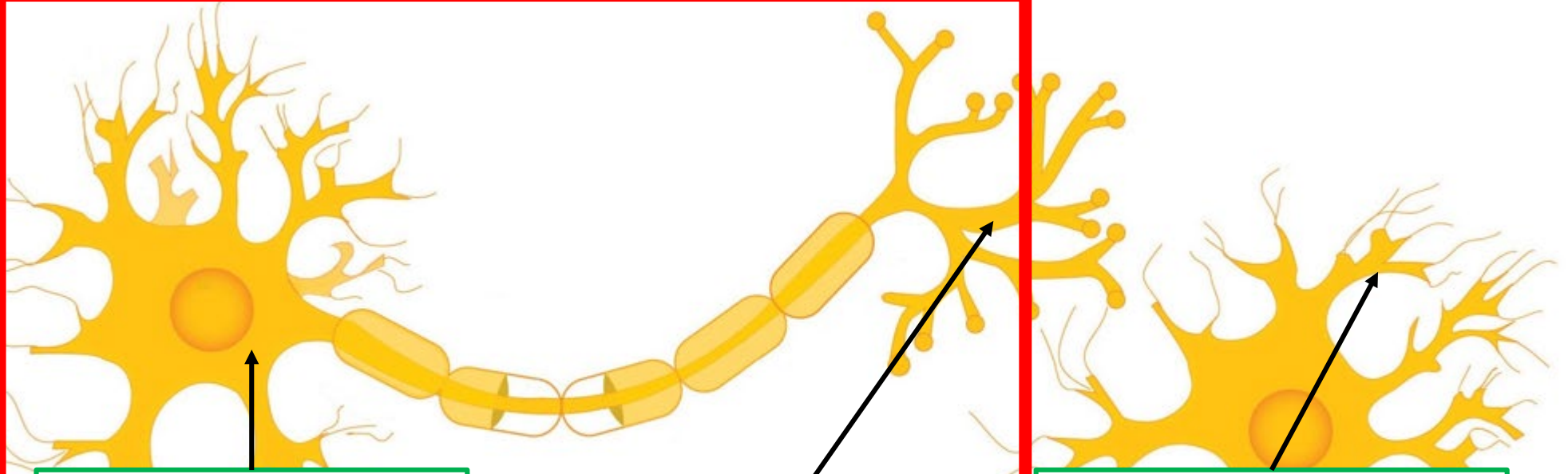
Abbreviations: AQP4 = aquaporin 4; CASPR2 = contactin-associated protein-like 2; DPPX = dipeptidyl peptidase-like protein; GABA<sub>A</sub>R = gamma-aminobutyric acid-A receptor; GAD = glutamic acid decarboxylase; GFAP = glial fibrillary acidic protein; GlyR = glycine receptor; LE = limbic encephalitis; LGI1 = leucine-rich glioma-inactivated protein 1; mGluR1 = metabotropic glutamate receptor type 1; MOG = myelin oligodendrocyte glycoprotein; NMDAR = NMDA receptor; PERM = progressive encephalomyelitis with rigidity and myoclonus; SCLC = small-cell lung cancer; SPS = stiff-person syndrome.



# Autoantikörper gegen neuronale intrazelluläre Antigene



# Cerebellum



Intrazelluläre neuronale Antigene: *Hu, Ri, ZIC4, Ma1, Ma2/Ta, Yo, Tr, SOX1, CV2, PCA-2, PKCγ, Ca, CARPVIII, ITPR1, HOMER3, ANNA3*

Intrazelluläre Synaptic Antigene: *GAD67, Amphiphysin*

Oberflächen- oder synaptische Antigene: *LG1, CASPR2, AMPA1/2, NMDAR, GABA<sub>b</sub>R, Glycin R, mGluR1/5, NMO, MOG, DPPX, IgLON5*

*Immunoblot*

**Immunofluoreszenz**

*Transfizierte Zellen*

# IIF Cerebellum

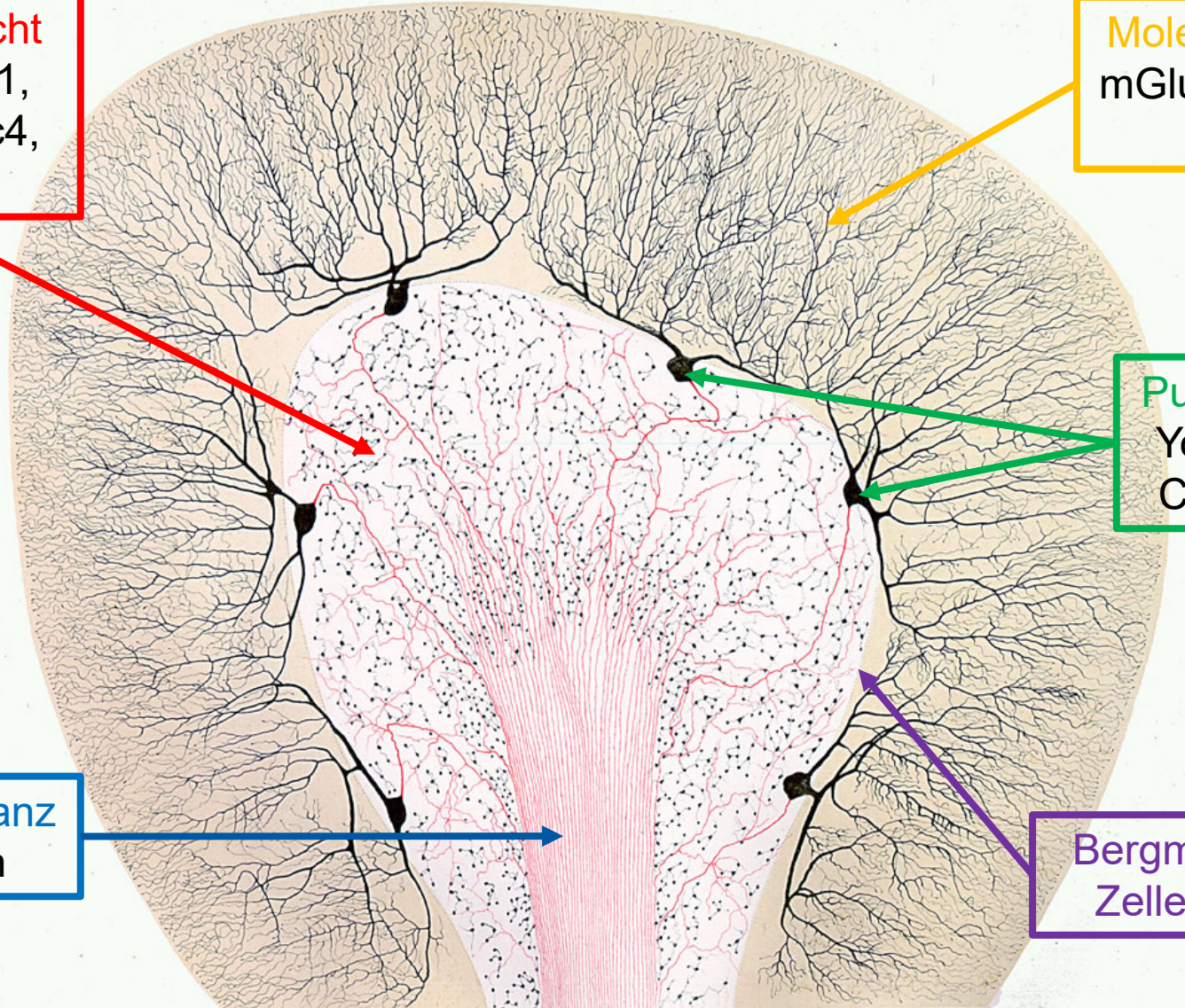
**Körnerschicht**  
Hu, Ri, Ma1,  
Ma2/Ta, Zic4,  
GAD67

**Molekularschicht**  
mGluR1, MGlur5,  
Homer3

**Purkinje-Zellen**  
Yo, PCA2, Tr,  
Ca, Sj, PKC $\gamma$

**Weisse Substanz**  
CV2, Myelin

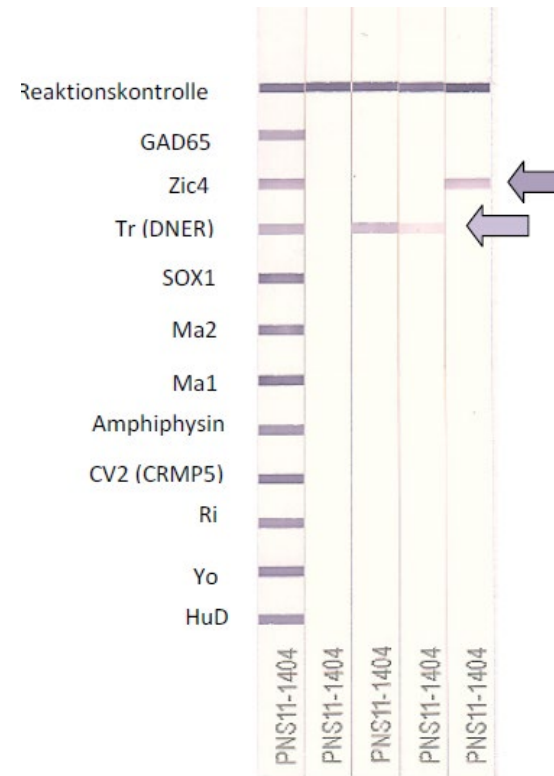
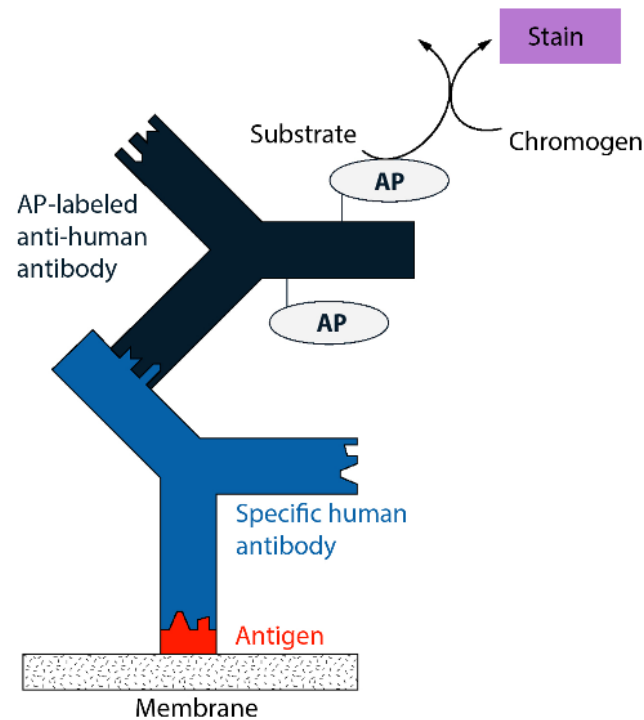
**Bergmann-Glia  
Zellen SOX1**



# Empfehlungen für die Bestimmung

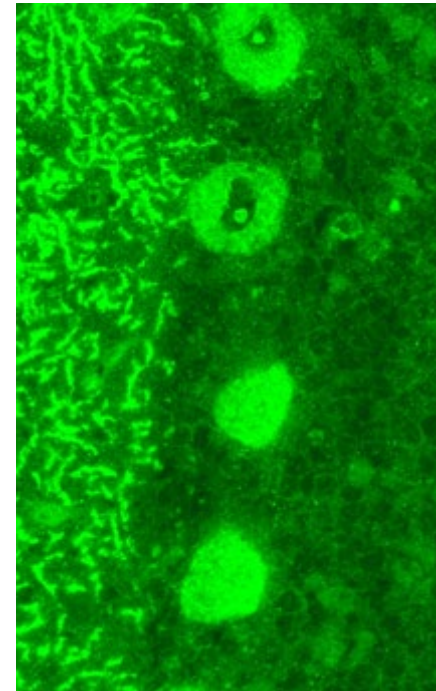
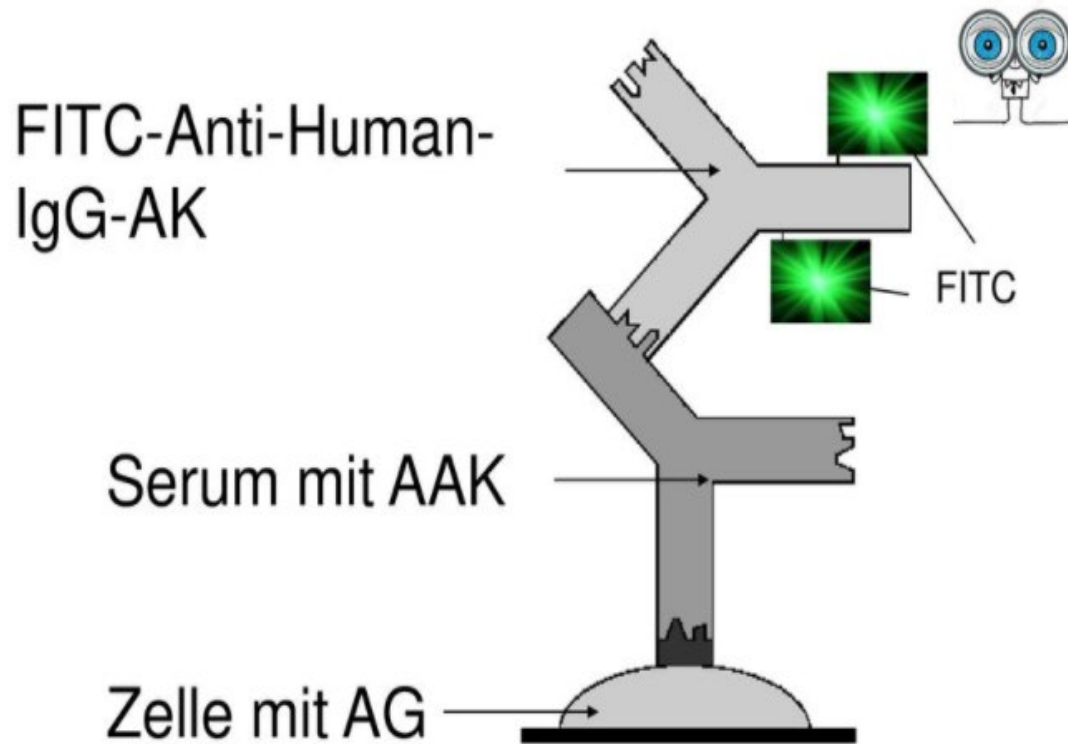
- Konjugat: IgG
  - Probenmaterial: Serum, Liquor
- 2 Verdünnungen: 1:10 und 1:100 (Prozonen-Effekt sehr häufig)
- 2 verschiedene Methoden: Mikroskopie und Immunoblot (oder falls vorhanden zellbasierte Assays )
- Schwierigstes Gewebe für IIF: nicht alle Antikörper und Muster sind bekannt. Häufig unspezifische Fluoreszenz (unbekannte Ak? ev. auch gegen nicht spezifische Antigene des Nervensystems).

# Immunoblot: Line Assay



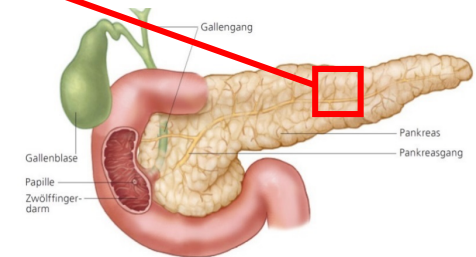
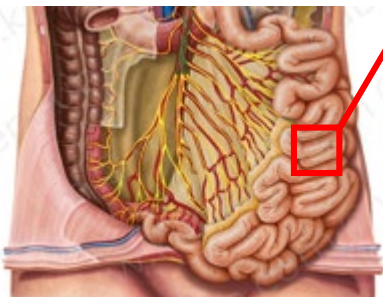
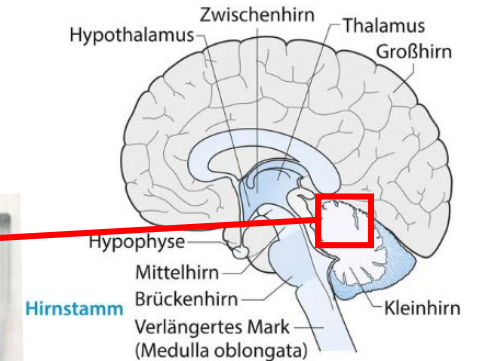
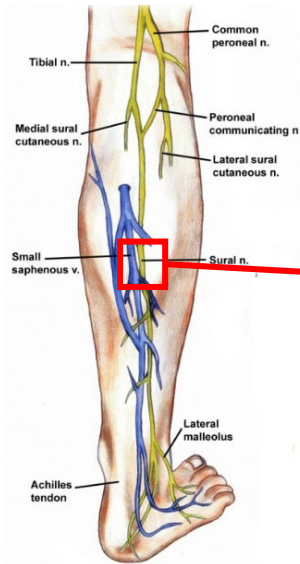
Für lineares oder sequenzielles Epitop  
(Epitop, das von Antikörpern anhand seiner **linearen** Aminosäuresequenz oder Primärstruktur erkannt wird. D. h. die 3D-Struktur der Antigene muss nicht unbedingt vorhanden sein).

# Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz (iIF)



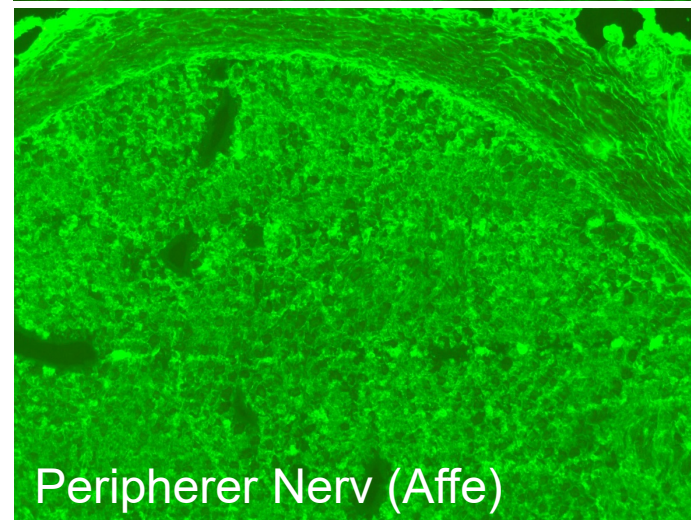
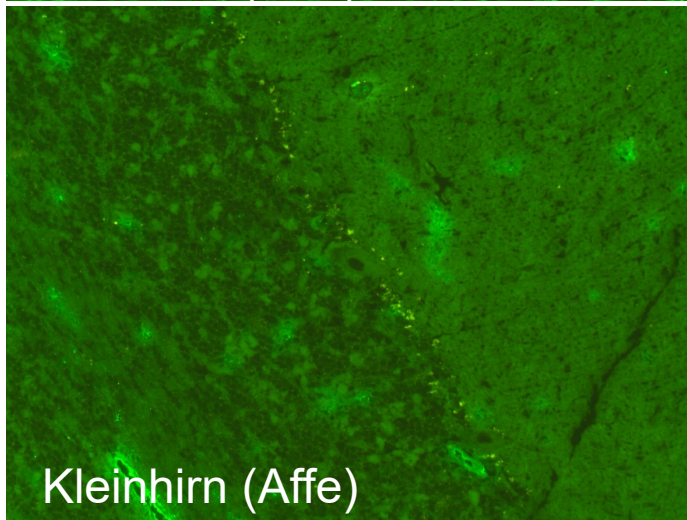
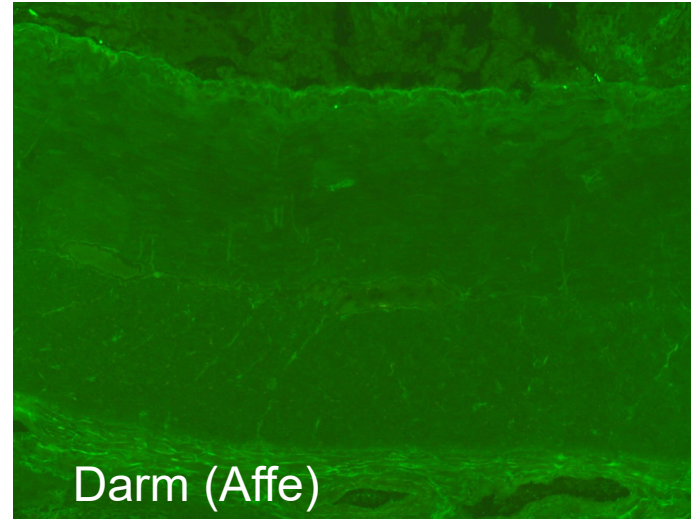
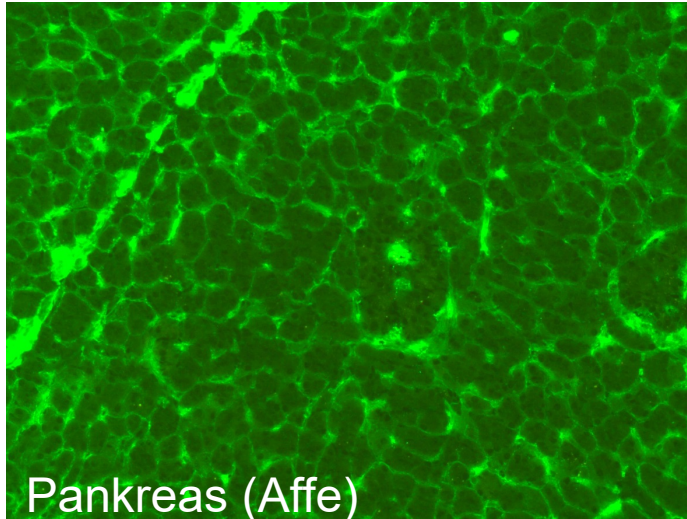
# Euroimmun Neurologie Mosaik-8

Primatenkleinhirn und Primatennerven sind die Standardsubstrate für den Nachweis verschiedener neuronaler Antikörper. Der parallelen Einsatz von Primatendarm und Pankreas helfen bei der Differenzierung der Autoantikörper



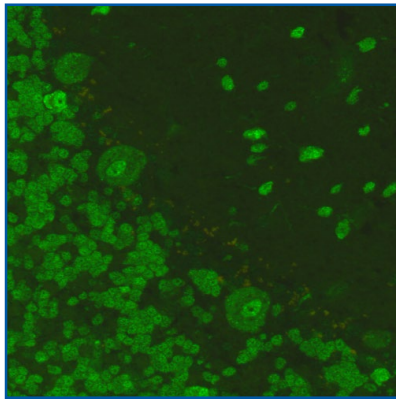
Herkunft: Primaten, die in Zoos auf natürliche Weise gestorben sind

# Neurologie Mosaik-8 (Euroimmun) Negative Kontrolle 20x

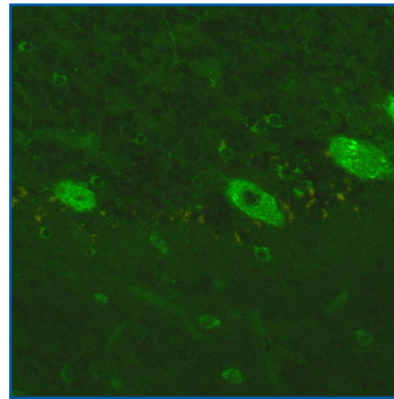




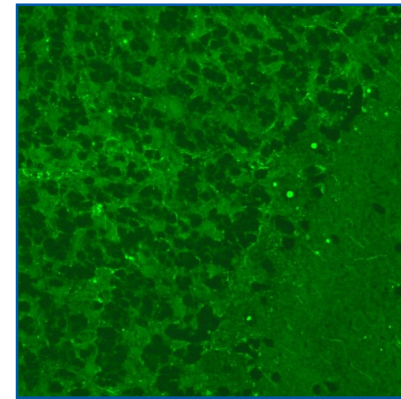
# Autoantikörper bei neurologischen Erkrankungen



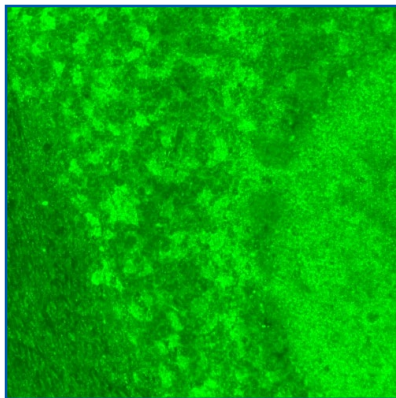
Neuronal nukleär



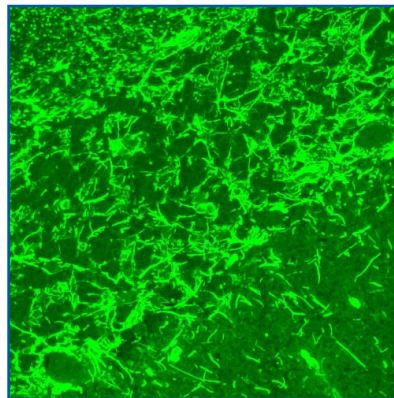
Purkinje-Zellen



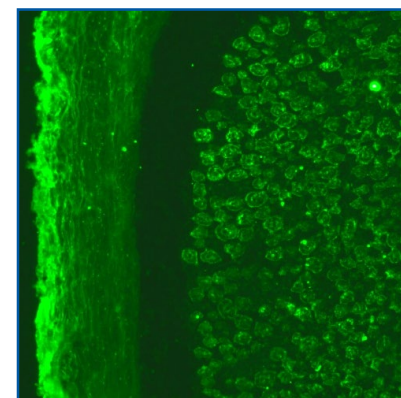
Neuronal nukleolär



Intrazellulär  
synaptisch

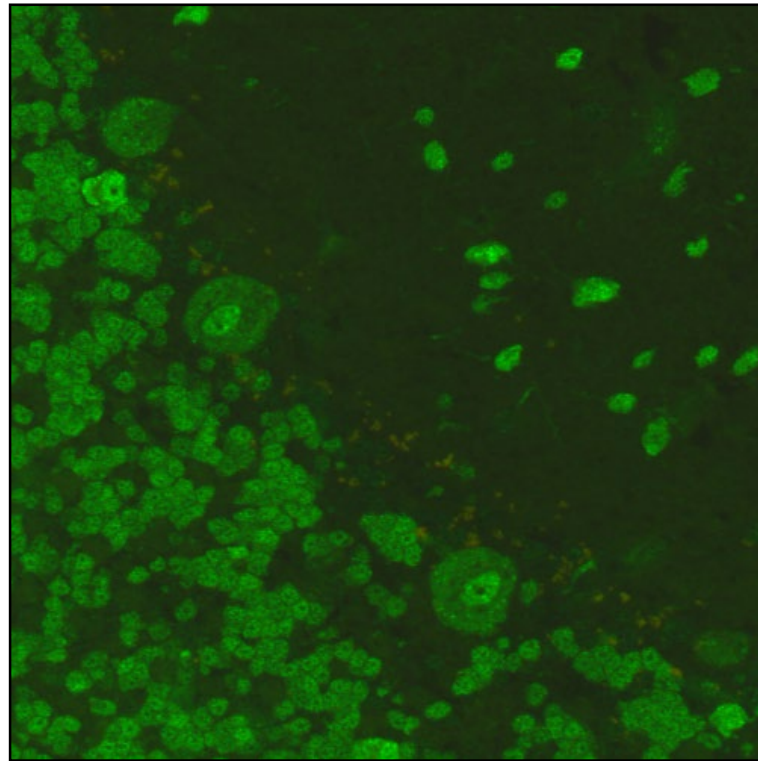


Intrazellulär



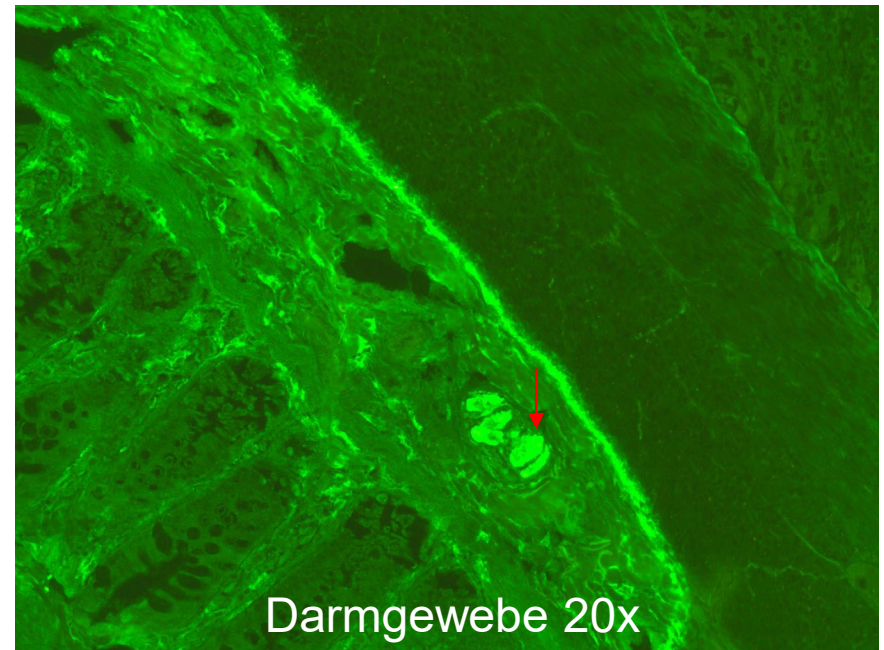
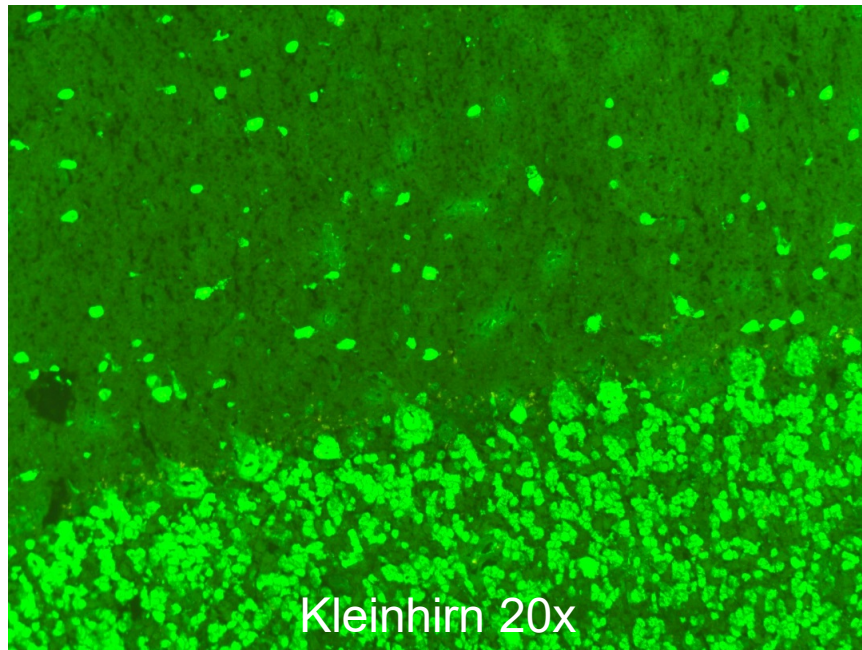
Peripherer Nerv

# Autoantikörper bei neurologischen Erkrankungen



Neuronal nukleär  
Hu (ANNA-1), Ri (ANNA-2), Zic-4,  
SOX-1 (AGNA)

# Anti-Hu (ANNA-1)



## Kleinhirn

- Purkinje-Zellen: **stark positiv** Zellkerne und **schwach positiv** Zytoplasma
- Körnerschicht: Zellkerne **Positiv**
- Molekularschicht: Zellkerne **Positiv**
- Nukleoli negativ, Gliazellen **Negativ**

## Darmgewebe

- Plexus myentericus (Auerbach): Zellkerne **Positiv**

Alle anderen Zellkernen müssen negativ sein (Falls positiv: ANA?)

# Anti-Hu (ANNA-1)

## **Anzeichen und Symptome:**

Gedächtnisverlusten, Persönlichkeitsveränderungen, Kopfschmerzen, Wahn oder Halluzinationen begleitet. In einigen Fällen Schwindel, Übelkeit, Erbrechen und eine verminderte Atmung, die bis zum Atemstillstand fortschreiten kann.

## **Epidemiologie:**

Kleinzelligen Lungenkarzinoms ist stark mit Anti-Hu-Antikörpern assoziiert ist. Männer (>60J) sind dreimal häufiger betroffen als Frauen.

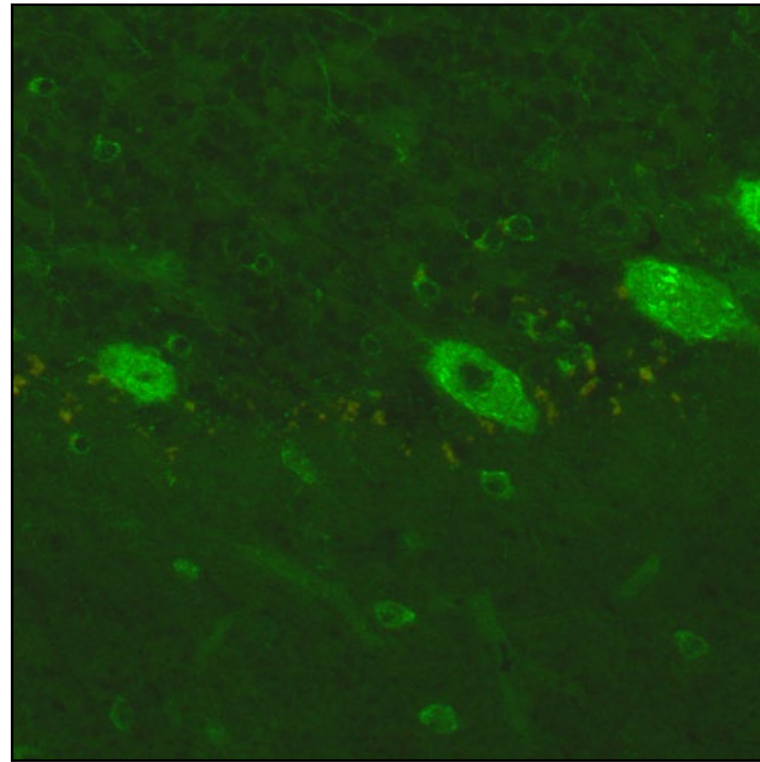
## **Behandlung:**

Behandlung des Krebses, und Verabreichung von Medikamenten. Da die derzeitigen Behandlungen die Krankheit nicht beseitigen können, besteht das Ziel der Behandlung häufig darin, die Symptome zu lindern, anstatt zu versuchen, die Krankheit zu heilen.

## **Prognose:**

Im Vergleich zu anderen paraneoplastischen Enzephalitiden hat die Anti-Hu-assoziierte Enzephalitis eine besonders schlechte Prognose. (Überlebenszeit von weniger als einem Jahr ab dem Zeitpunkt der Diagnose). Ein grosser Teil der Prognose hängt von der Wirksamkeit der Behandlung ab, die auf die zugrunde liegende Krebserkrankung abzielt, sofern diese vorhanden ist.

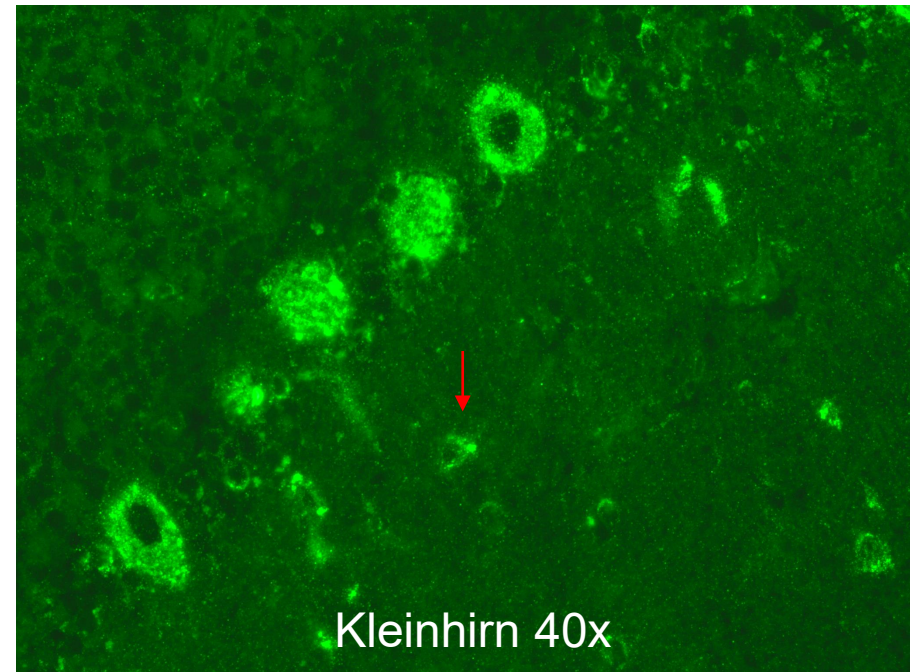
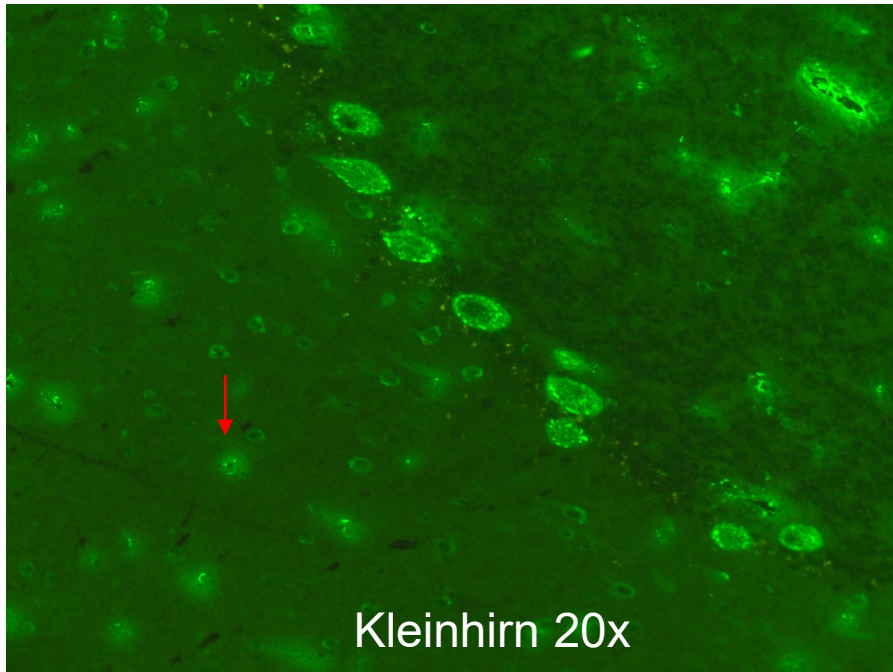
# Autoantikörper bei neurologischen Erkrankungen



## Purkinje- Zellen

Yo (PCA-1), PCA-2, Tr (DNER),  
Ca (ARHGAP26), Sj (ITPR1),  
CARP VIII, Homer-3, C $\gamma$  (PKC $\gamma$ )

## Yo (PCA-1; CDR2, CDR62)



### Kleinhirn

- Purkinje-Zellen: Zytoplasma **Positiv** (Glatt-Fluoreszenz), schwache Fluoreszenz der Dendriten möglich
- Körnerschicht: **Negativ**
- Molekularschicht: Zytoplasma **randbetont** (Donuts)

# Yo (PCA-1; CDR2, CDR62)

## **Anzeichen und Symptome:**

subakute zerebellare Degeneration, Ataxia

## **Epidemiologie:**

Bei 90 bis 98 % der Patienten mit Kleinhirnataxie und Anti-Yo-Antikörpern wird eine Ovar- Brustkrebs festgestellt. Sehr seltene Fälle bei Männern, Tumorassoziation (Lungen) muss nachgewiesen werden.

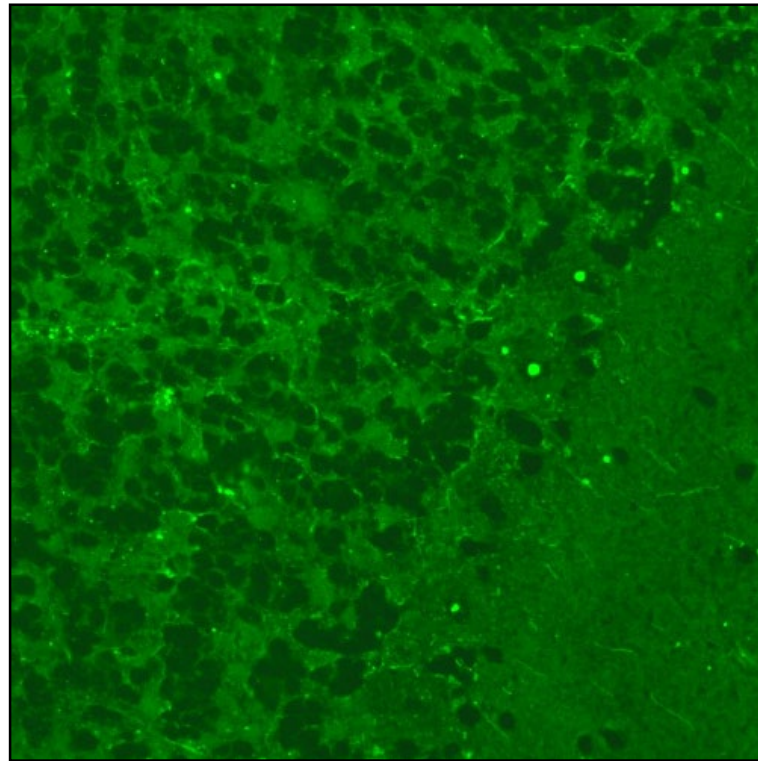
## **Behandlung:**

Immuntherapien wie Kortikosteroide, Plasaphorese und intravenöses Immunglobulin (IVIg) sind unwirksam.

## **Prognose:**

Langfristige Überlebenschancen wurden mit weniger als 25 % angegeben. Bessere Prognose bei Brustkrebs (100 Monate) und eine schlechtere bei Eierstockkrebs (22 Monate).

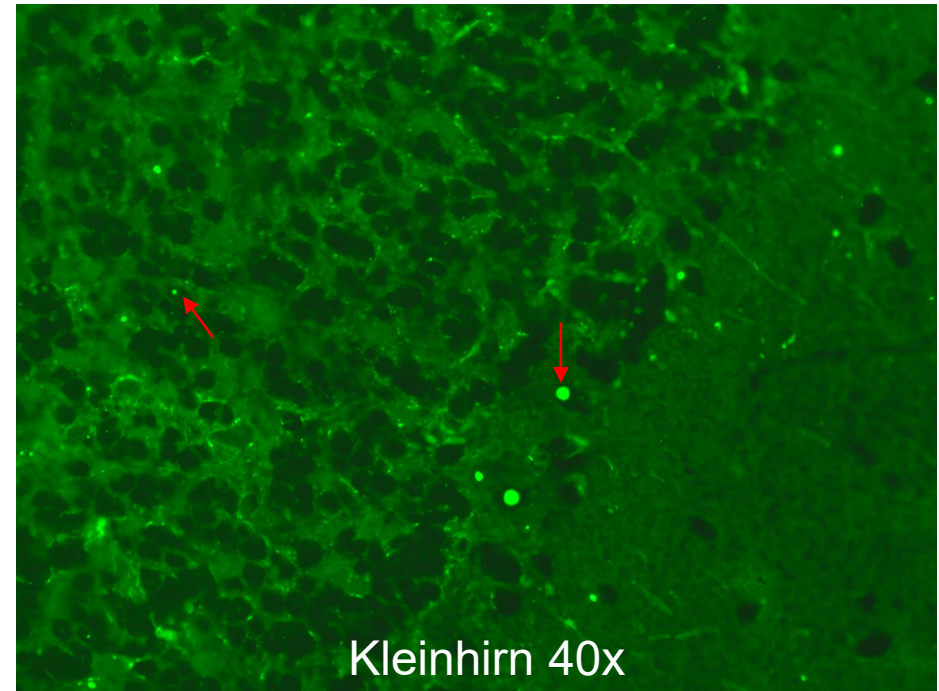
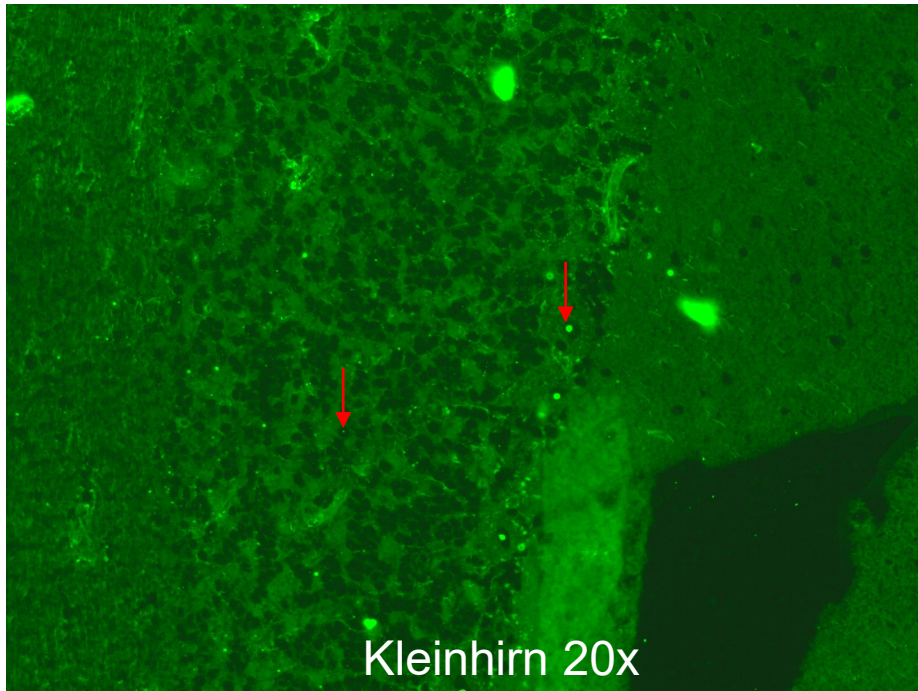
# Autoantikörper bei neurologischen Erkrankungen



Neuronal nukleolär  
Ma1 (PNMA1),  
Ma2/Ta (PNMA2)



## Ma1 (PNMA1), Ma2/Ta (PNMA2)



### Kleinhirn

- Purkinje-Zellen: Nukleoli in Zellkernen **Positiv**
- Körnerschicht: Nukleoli in Zellkernen **Positiv** (oft nicht klar/schwach/negativ)
- Molekularschicht: **Negativ**

### Krankheitsbilder / assoziierte Tumoren:

- MA1: Hirnstammenzephalitis und limbische Enzephalitis, Hoden- und andere Tumoren;
- Ma2/Ta: Hirnstammenzephalitis und limbische Enzephalitis, Hodentumoren

Alle andere Zellnukleoli negativ (Falls positiv: ANA?)

## Ma1 (PNMA1), Ma2/Ta (PNMA2)

### **Anzeichen und Symptome:**

Isolierte oder kombinierte limbische Enzephalitis, Diencephale oder Hirnstammenzephalitis. In diesen Hirnregionen traten häufig MRT-Anomalien auf, und im Liquor sind die typischerweise entzündliche Veränderungen vorhanden

### **Epidemiologie:**

Der Anti-Ma2-Antikörper ist bei Männern (jung) mit Hodentumoren und. Koexistierende Antikörper gegen Ma1 wurden bei 15 von 34 Patienten mit Anti-Ma2-Enzephalitis festgestellt und traten bei Patienten mit anderen Tumoren als Hodenkrebs deutlich häufiger auf

### **Behandlung:**

Immunsuppressiva und Kortikosteroide

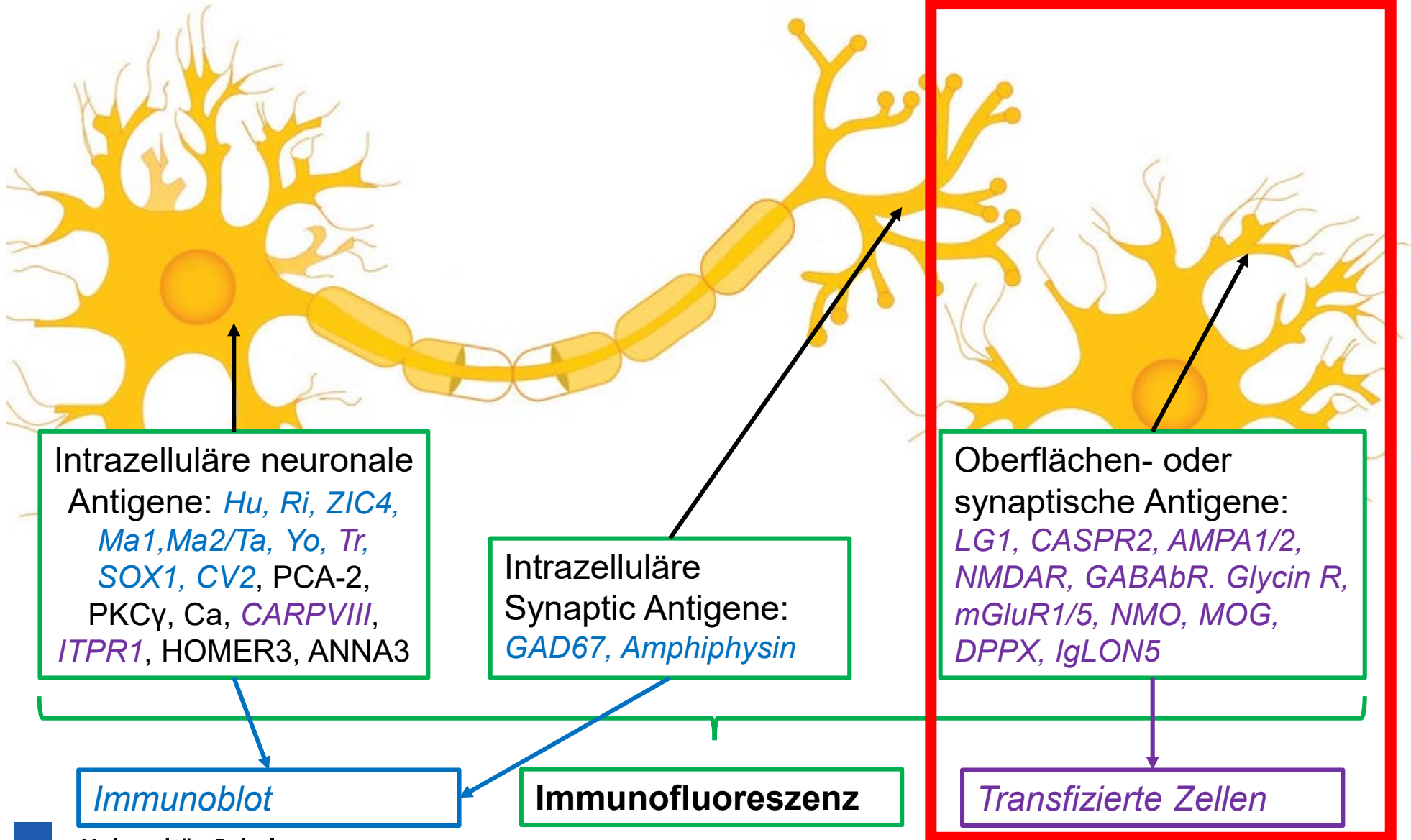
### **Prognose:**

Die Anti-Ma2-assoziierte Enzephalitis spricht besser auf eine onkologische und immunologische Behandlung an als andere Arten der paraneoplastischen Enzephalomyelitis

# Falsch positive Muster

- ANA: nukleär oder nukleolär (Pankreas/ Darm überprüfen)
- Antikörper gegen den Golgi-Apparat: sie färben das Zytoplasma der Purkinje-Zellen
- Mitochondrien
- Purkinje-Zellen haben eine Hintergrundfluoreszenz

# Cerebellum

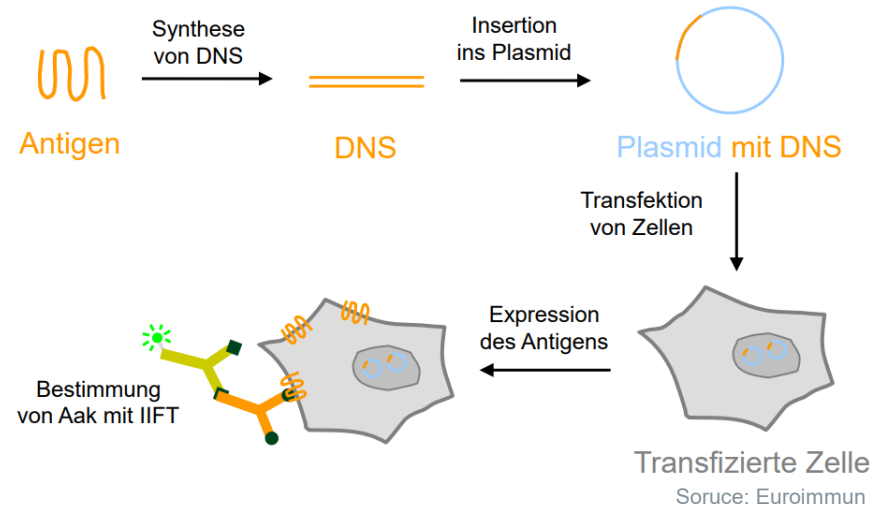


# Autoimmun-Enzephalitis (AIE)

- Autoantikörper gegen neuronale Oberflächen- oder synaptische Antigene
  - Tumorspezifität 10-60%
  - Reversible Schäden
  - Autoantikörper pathogen
- Häufig Erfolg bei der Immuntherapie

# Transfizierte Zellen

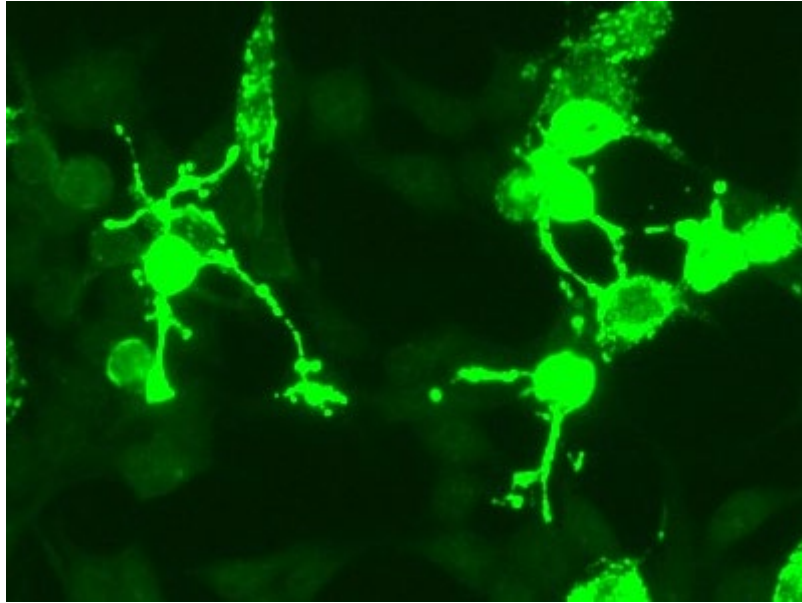
- Die Transfektion ist das Einbringen einer fremden DNA- oder RNA-Sequenz in Zellen. Die eingefügte Fremd-DNA oder RNA befähigt die Zelle, ein bestimmtes Protein zu produzieren.



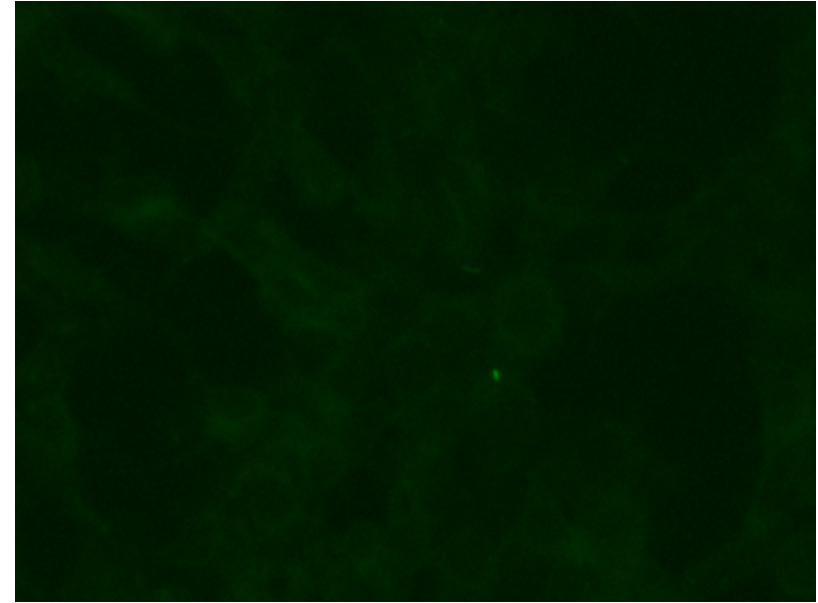
- In diesem Fall produzieren und exprimieren die HEP2-Zellen (immortalisierte menschliche Tumorzellen) auf ihrer Membran ein spezifisches Antigen, das von einem spezifischen Antikörper angegriffen wird.
- Für Epitop "nicht linear" oder "diskontinuierlich" (der Antikörper interagiert mit mehreren unterschiedlichen Segmenten aus der primären Aminosäuresequenz des Antigens. D.h. es ist notwendig, die 3D-Struktur des Antigens zu haben).



# NMDA-Rezeptoren



Transfizierte und nicht transfizierte Zellen (EU 90) 20x



Nicht transfizierte Zellen (EU 90) 20x

AK gegen NMDAR erzeugen eine feingranuläre cytoplasmatische Fluoreszenz mit typischen Zellausläufern. Die Zellkerne sind probenabhängig nur geringfügig bis schwach angefärbt (Bonbon-Perlenkette fluoreszenz)

# NMDA-Rezeptoren

## **Anzeichen und Symptome:**

Die Symptome scheinen in der Regel psychiatrischer Natur zu sein, was die Differentialdiagnose verwirren kann. Unruhe, Paranoia, Psychosen und aggressives Verhalten. Krampfanfälle, bizarre Bewegungen, kognitive Störungen, Gedächtnislücken und Sprachprobleme bis Aphasie. Ist es wichtig, dass alle Psychiater eine Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis als mögliche Ursache einer akuten Psychose bei jungen Patienten.

## **Epidemiologie:**

81 % Frauen, Durchschnittsalter bei der Diagnose 21 Jahre. Mehr als ein Drittel der Fälle sind Kinder. Tumorassotiation 38 % (Teratome der Ovarien).

## **Behandlung:**

Falls Tumor: Entfernung in Verbindung mit Immuntherapie. Steroide zur Suppression des Immunsystems, intravenöses Immunglobulin und Plasmapherese. Der Genesungsprozess kann viele Monate dauern.

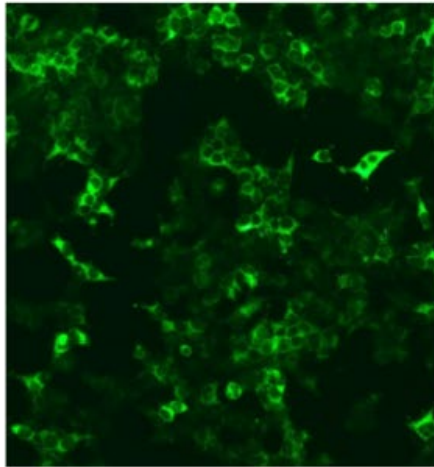
## **Prognose:**

Dieselbe Studie ergab, dass 394 von 501 Patienten (79 %) nach 24 Monaten ein gutes Ergebnis hatten.[10] 30 Personen (6 %) starben, und die übrigen blieben mit leichten bis schweren Defiziten zurück.

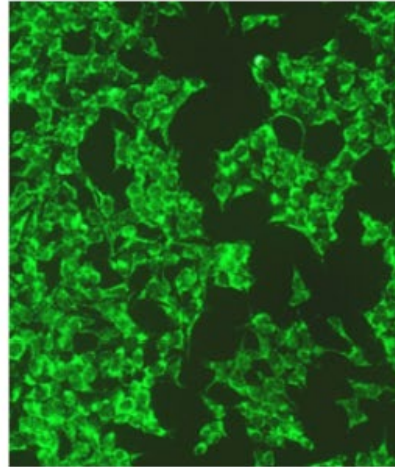


# Falsch positive Muster bei ANA

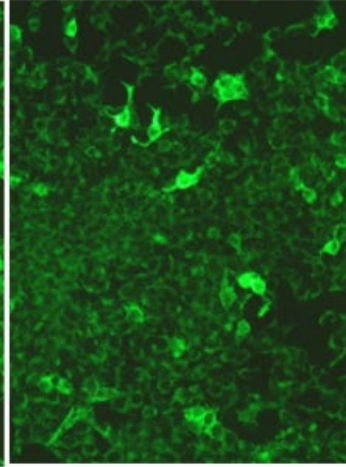
Mischmuster:



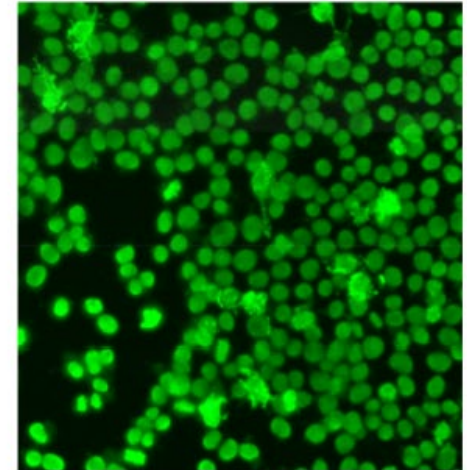
Anti-Lysosomen



AMA positiv

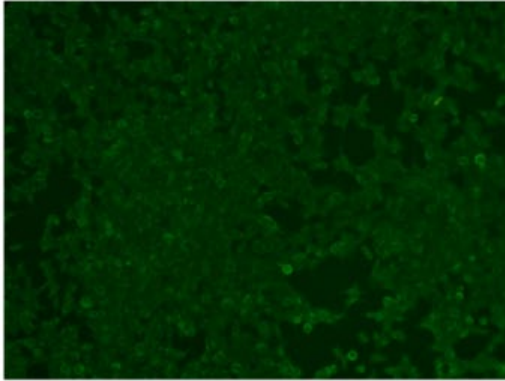


AMA und NMDA  
positiv

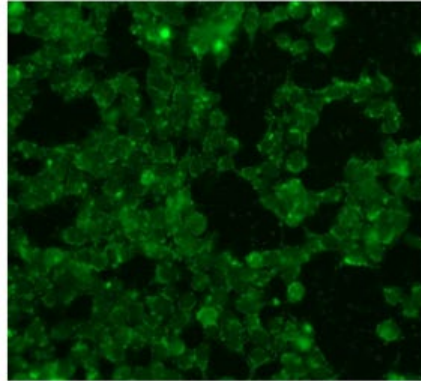


ANA und NMDA  
positiv

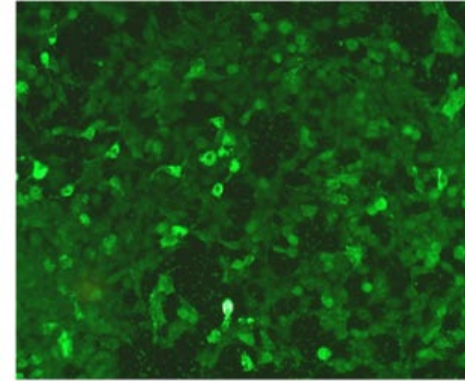
# Unspezifische Fluoreszenz



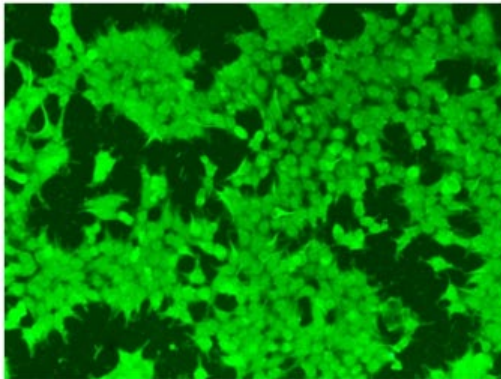
Unspezifische Fluoreszenz aller Zellen mit Betonung der mitotischen Zellen



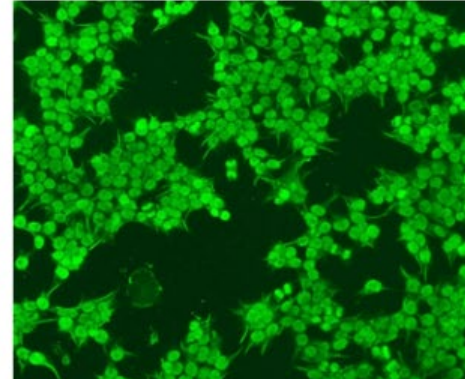
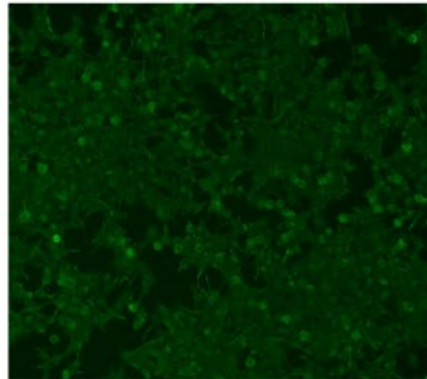
Unspezifische cytoplasmatische Fluoreszenz



Unspezifische Fluoreszenz und NMDAR positive Zellen



Unspezifische Fluoreszenz des Cytoplasma



Unspezifische Fluoreszenz aller Zellkerne und fädige Fluoreszenz des Cytoplasma



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit