

Autoantikörperspektrum und Charakterisierung von neuen Autoantikörpern in Patienten mit Temporallappenepilepsie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Julia Christina Kühn

aus Köln

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Albert J. Becker
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus M. Müller

Tag der Mündlichen Prüfung: 22.10.2021

Aus dem Institut für Neuropathologie
Direktor: Prof. Dr. med. Torsten Pietsch

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Deutsche Zusammenfassung	6
1.1	Einleitung	6
1.2	Material und Methoden	8
1.3	Ergebnisse	13
1.4	Diskussion	18
1.5	Zusammenfassung	25
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	26
2.	Veröffentlichung	37
	Abstract	37
	Introduction	38
	Materials and Methods	38
	Results	41
	Discussion	47
	References	52
3.	Danksagung	56

Abkürzungsverzeichnis

AED	Antiepileptika (Anti-epileptic Drugs)
AMPAR	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolpropionsäure-Rezeptor
BL21	Escherichia coli-Stamm
CA	Cornu Ammonis
CASPR2	Contactin-associated Protein-like 2
DAPI	2-phenylindol
DPPX	Dipeptidyl-peptidase-like Protein-6
EEG	Elektroenzephalogramm
GABAaR	ionotroper γ -Aminobuttersäure (Gamma-Aminobutyric Acid) - Rezeptor
GABAbR	metabotroper γ -Aminobuttersäure (Gamma-Aminobutyric Acid) -Rezeptor
GAD65	Glutamat-Decarboxylase Isoform 65
GlycinR	Glycinrezeptor
HEK	Human embryonic kidney
IIFT	indirekter Immunfluoreszenz-Test
IP	Immunopräzipitation
LE	limbische Enzephalitis
LGI1	Leucin-rich Glioma Inactivated Protein 1
mGluR5	metabotroper Glutamatrezeptor 5
MRT	Magnetresonanztomographie
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor

neuroAK ⁺	positive für Autoantikörper, die mit neurologischen Syndromen assoziiert sind
neuroAK ⁻	negativ für Autoantikörper, die mit neurologischen Syndromen assoziiert sind
neuroAK ⁻ /screening ⁺	negativ für Autoantikörper, die mit neurologischen Syndromen assoziiert sind und positiver Screening-Test
neuroAK ⁻ /screening ⁻	negativ für Autoantikörper, die mit neurologischen Syndromen assoziiert sind und negativer Screening-Test
NHS	normales humanes Serum
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
TLE	Temporallappenepilepsie
SOX1	SRY-box transcription factor 1
VGKC	spannungsabhängige Kalium-Kanäle (voltage-gated potassium channel)
Zic4	Zic family member 4

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Epilepsie ist mit einer Prävalenz von 4-10 pro 1000 eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen (Duncan et al., 2006; Thijs et al., 2019). Hierbei bilden Patienten mit Temporallappenepilepsie (TLE) die größte Gruppe (Hauser und Kurland, 1975). Wie in verschiedenen populations-basierten Studien gezeigt, ließ sich in vielen der Fälle die Ätiologie der Erkrankung klären, jedoch blieb diese bei ca. 60% aller Patienten ungeklärt (Fosgren et al., 2005). Zuletzt gelang es bei Patienten, bei denen zuvor eine kryptogene Epilepsie diagnostiziert wurde, eine große Gruppe mit autoimmun bedingten Epilepsien abzugrenzen. Zwei Studien konnten zeigen, dass bei TLE-Patienten mit Hippocampussklerose (Bien et al., 2007) und Patienten mit mediotemporaler Epilepsie (Soeder et al., 2009), mit Beginn der Anfälle im erwachsenen Alter, in 24-29% der Fälle eine autoimmunologische Ursache in Form einer limbischen Enzephalitis (LE) festzustellen war.

Diese Autoimmunenzephalitiden, welche teilweise paraneoplastisch auftreten, können oft mithilfe von anti-neuronalen Autoantikörpern näher stratifiziert werden und zeigen abhängig von dem Vorkommen dieser Autoantikörper ein spezifisches klinisches Symptomspektrum (Leypoldt et al., 2015). In der letzten Zeit lag der Fokus auf Autoantikörpern, welche sich gegen meist synaptische Oberflächenantigene richten. Innerhalb einer Zeitspanne von einigen Jahren kam es zu der Charakterisierung zahlreicher dieser meist nicht-paraneoplastischen Autoantikörper, darunter Autoantikörper gerichtet gegen den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR; Dalmau et al., 2007), den α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolpropionsäure-Rezeptor (AMPA; Lai et al. 2009), den ionotropen und metabotropen γ -Aminobuttersäure-Rezeptor (GABA_A- und GABA_BR; Lancaster et al., 2010; Petit-Pedrol et al., 2014), den Glycinrezeptor (GlycinR; Hutchinson et al., 2008), das Dipeptidyl-peptidase-like Protein-6 (DPPX; Boronat et al., 2012) und den metabotropen Glutamatrezeptor 5 (mGluR5; Lancaster et al., 2011). Zu dieser Antigengruppe gehören auch die Proteine Leucin-rich Glioma Inactivated Protein 1 (LGI1) und Contactin-associated Protein-like 2 (CAPR2), zwei spannungsabhängige Kalium-Kanäle (VGKC)-assoziierte Proteine (Irani et al., 2010; Lai

et al., 2010). Die Relevanz von anti-VGKC-Autoantikörpern, welche weder gegen LGI1 noch CASPR2 gerichtet sind, ist aktuell fraglich (van Sonderen et al., 2017). Demgegenüber steht die Gruppe der onkoneuronalen Autoantikörper (Darnell and Posner, 2003; Graus et al., 2005) wie anti-Amphiphysin, anti-CV2, anti-Ma2/Ta, anti-Ri, anti- SRY-box transcription factor 1(SOX1), anti-Yo und anti- Zic family member 4 (Zic4) -Autoantikörper, die meist paraneoplastisch auftreten und gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sind. Eine Ausnahme bilden Autoantikörper gegen das intrazelluläre Protein Glutamat-Decarboxylase Isoform 65 (GAD65). Diese sind initial in Patienten mit Diabetes mellitus Typ I identifiziert worden, gelten als nicht-paraneoplastisch und sind, vor allem in hohen Titern, mit verschiedenen neurologischen Syndromen assoziiert (Baekkeskov et al., 1990; Malter et al., 2010; Saiz et al., 2008).

Autoimmun bedingte Epilepsien stellen in der klinischen Diagnostik eine Herausforderung dar. Die von Graus et al., 2016 beschriebenen Kriterien, um die Diagnose einer limbischen Enzephalitis zu etablieren, beinhalten ein subakutes Auftreten innerhalb der letzten 3 Monate mit Anfällen, Gedächtnisstörungen oder psychiatrischen Symptomen, LE-typische bilaterale Magnetresonanztomographie (MRT)-Veränderungen und einen Liquorbefund mit Pleozytose oder ein Elektroenzephalogramm (EEG) mit temporalen Auffälligkeiten. Ist eines dieser Kriterien nicht erfüllt, kann die Diagnose nur bei positivem Autoantikörper-Befund gestellt werden. Gerade das Kriterium der kurzen Symptombdauer ist in einem tertiären epileptologischen Zentrum häufig nicht anwendbar. Durch diese sehr strengen Kriterien wird eine Vielzahl der Patienten mit potenziell autoimmuner Genese einer Epilepsie nicht erfasst. Des Weiteren gibt es eine starke klinische Überlappung zwischen LE und autoimmun bedingter Epilepsie, dennoch sind die beiden Begriffe nicht gleichzusetzen (Geis et al., 2019; Rada et al., 2020).

Eine richtige Einordnung von autoimmun bedingten Epilepsien ist allerdings therapeutisch von großer Relevanz, da die üblicherweise verwendeten Antiepileptika (AED) eine schlechte Wirksamkeit zeigen (Cabezudo-Garcia et al., 2018). Es konnte belegt werden, dass eine frühe immunmodulierende Therapie mit einem besseren Outcome assoziiert ist (de Bruijn et al., 2019; Quek et al., 2012). Des Weiteren werden prospektive randomisierte Studien zu einzelnen Therapieregimen für Patienten mit spezifischen Autoantikörpern durchgeführt (Dubey et al., 2020). Durch Fortschritte im Verständnis der Rolle von

Autoantikörpern, komplementvermitteltem Zelluntergang und T-Zell-medierten Mechanismen für die Pathogenese der Erkrankung sind weitere, auf diesen Erkenntnissen basierende, therapeutische Ansätze zu erwarten (Bernal et al. 2002; Bien et al., 2012; Geis et al., 2019; Hara et al., 2017). Aufgrund dessen ist es essenziell das sehr spezifische Tool der Autoantikörperdiagnostik zu optimieren und somit Patienten mit autoimmun bedingter Epilepsie frühzeitig spezifischer Therapie zuzuführen.

Um die Diagnosestellung einer autoimmun-bedingten Epilepsie zu verbessern, hat diese Studie zum Ziel, 800 Patienten mit potenziell autoimmun bedingter TLE des Erwachsenenalters mithilfe einer Screening-Prozedur zu stratifizieren, dieses Kollektiv serologisch und klinisch zu charakterisieren und so zu ermöglichen, eine Patientengruppe mit Hinweisen auf Autoantikörper gegen bisher unbekannte neuronale Antigene zu identifizieren. Zusätzlich sollen diese Antigene charakterisiert werden.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Serum und Liquorproben, klinische Daten und gesundes Kontrollkollektiv

Die verwendeten Seren und Liquores entstammen einer Sammlung von Proben, die von Patienten mit klinischem Verdacht auf eine antikörpervermittelte neurologische Erkrankung stammen. In die Studie wurden Proben von 800 Patienten mit im Erwachsenenalter einsetzender TLE eingeschlossen. Alle Patienten wurden in dem Zeitraum von 11/2013 bis 12/2016 in der Klinik für Epilepsie der Universitätsklinik Bonn vorstellig und zeigten mindestens eines der folgenden Charakteristika, welche mit autoimmun bedingter Epilepsie assoziiert sind: Gedächtnisstörungen, affektive Störungen, LE- typische Liquor und/oder MRT-Befunde. Insgesamt wurden 966 Serum- und 434 Liquorproben analysiert. Alle Patienten haben ihr informiertes schriftliches Einverständnis gegeben. Alle Untersuchungen wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

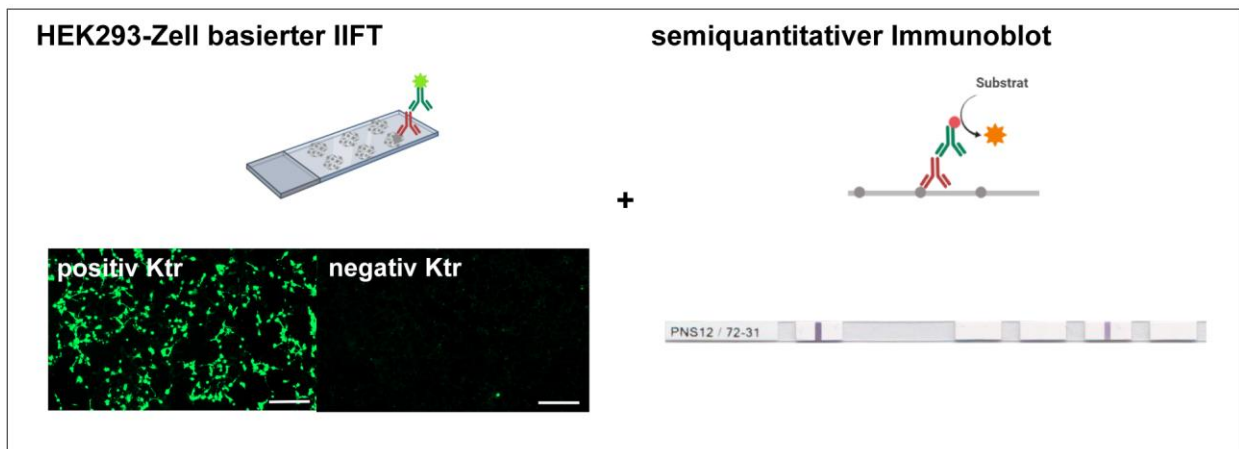
Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte retrospektiv aus den klinischen Akten, bestehend aus Verlaufsdokumentation und Arztbriefen.

Das Kontrollkollektiv besteht aus Serum Proben 27 gesunder Spender (männlich: n= 13; weiblich n=14, mittleres Alter: $34 \pm 10,6$ SD Jahre).

1.2.2 -Screening-Prozedur auf bekannte und unbekannte neuronale Autoantikörper

Der diagnostische Pfad zum Screening auf bekannte, mit neurologischen Syndromen assoziierte Autoantikörper (neuroAK) und Autoantikörper mit noch unbekanntem Antigen, beinhaltet mehrere Schritte (**Abb. 1**).

1. Screening auf bekannte neuroAK



2. Screening auf AK gegen unbekannte Antigene

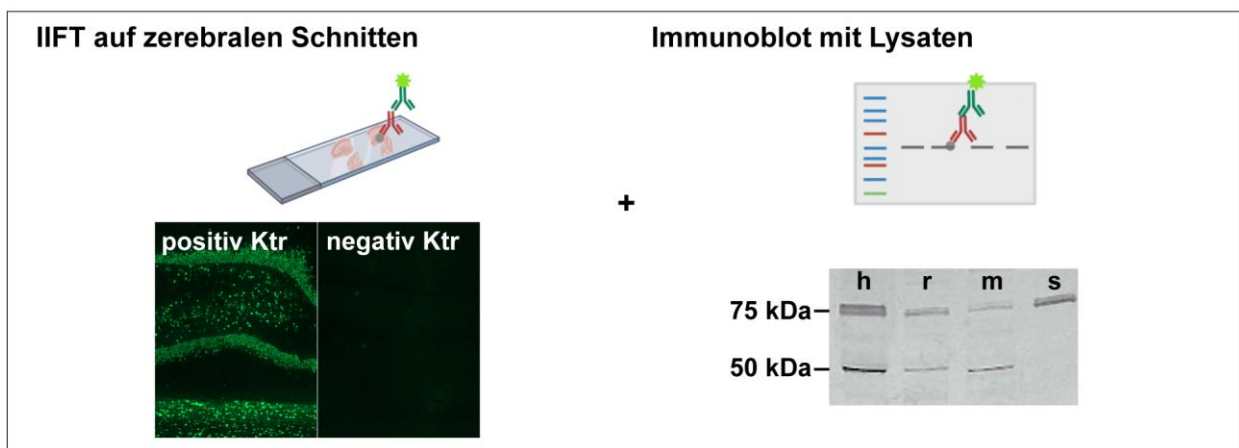


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Screening-Prozedur auf bekannte und unbekannte neuronale Antikörper. (1.) Zuerst werden bekannte neuroAK detektiert. Hierfür wird ein HEK293-Zell basierter IIFT, zur Detektion von Oberflächenantigenen, und ein semiquantitativer Immunoblot zur Detektion von intrazellulären Antigenen durchgeführt. (2.) Als zweiter Schritt folgt das Screening auf Autoantikörper, gerichtet gegen unbekannte neuronale Antigene, bestehend aus einem IIFT mit verschiedenen zerebralen Schnitten und einem Immunoblot mit Gewebe- und Synaptosomenlysaten. Legende: rote Antikörper - Antikörper aus Biomaterial des Patienten, grüne Antikörper - anti-humaner Zweitantikörper, Ktr - Kontrolle, h - human, r - ratte, m - murin, s - Synaptosomen. Maßstab 100 μ m.

Zuerst erfolgten Assays, welche bekannte, anti-neuronale Autoantikörper detektieren. Zusätzlich wurde im zweiten Schritt ein Immunoblot, in welchem eine Vielzahl von Antigenen aus Gewebe- und Synaptosomenlysaten gegenüber dem Biomaterial der Patienten und somit eventuell vorhandenen Autoantikörpern exponiert werden, durchgeführt. Der zweite Schritt beinhaltet auch einen indirekten Immunfluoreszenz-Test (IIFT) auf Gewebeschnitten, in dem vor allem Autoantikörper mit Affinität für Antigene in erhaltener Gewebearchitektur detektiert werden. Des Weiteren wird die Affinität von potenziellen Autoantikörpern an nicht-neuronale Antigene mithilfe von HEp2-Zellen untersucht. Ein negatives Screening-Ergebnis in diesem Schritt ist ein weiteres Indiz für spezifisch anti-neuronale Autoantikörper. So können endgültig Patientenproben zur Antigenidentifikation mittels Immunopräzipitation (IP) und Massenspektrometrie selektiert werden.

Autoantikörper gegen intrazelluläre Antigene, welche mit neurologischen Erkrankungen assoziiert sind, namentlich Amphiphysin, CV2, Ma2/Ta, Ri, Yo, Hu, Recoverin, SOX1, Titin, Zic4, GAD65 und Tr, wurden mithilfe eines semiquantitativen Immunoblots (EUROLINE PNS 12, Euroimmun, DL 1111-1601-7 G) untersucht. Hierfür wurde Serum in der Verdünnung 1:100 und Liquor in der Verdünnung 1:1 verwendet. Weitere Autoantikörper, gerichtet gegen oberflächliche neuronale Proteine (NMDAR, CASPR2, LGI1, GABAaR, GABAbR, AMPAR) und GAD65, wurden mithilfe eines IIFTs diagnostiziert, welcher auf Human embryonic kidney (HEK) 293-Zellen mit oberflächlicher Überexpression der entsprechenden Antigene basiert (IIFT: 'Autoimmune-Enzephalitis-Mosaik1', Euroimmun, FA 1120-1005-1; GAD65-IIFT, Euroimmun, FA 1022-1005-50). Liquor wurde unverdünnt eingesetzt, Serum 1:10 verdünnt. Bei positivem Befund erfolgte die weitere Titration. Die Durchführung der diagnostisch zugelassenen Assays erfolgte gemäß der Herstellerangaben.

Für den Immunoblot wurde eine SDS-PAGE mit Gewebe- und Synaptosomenlysaten (humanes Gewebelysat, murines Gewebelysat, Synaptosomen) durchgeführt und mithilfe des Trans-Blot Turbo Transfer Systems (Bio-Rad) auf eine Membran transferiert. Die Membranen wurden bei 4 °C über Nacht mit 5ml Blockierlösung inkubiert, gewaschen und mit Serum (1:500) in Blockierlösung für 2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen und 45 min Inkubation mit einem anti-humanen Zweitantikörper (Goat anti-human IRDye 800CW,

926-32232, Odyssey 1:20000) in Blockierlösung waren die Banden mithilfe eines Odyssey CLX (Li-Core) Geräts detektierbar.

Der IIFT (IIFT: 'Neurologie-Mosaik28', Euroimmun, FA 111-1005-28) für murine und simiiforme hippocampale und zerebelläre Schnitte wurde nach Herstellervorgabe durchgeführt. Das Serum wurde in einer Verdünnung von 1:10 und Liquor in einer Verdünnung von 1:1 eingesetzt. Bindungsmuster wurden mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops (Observer A1; Zeiss) beurteilt

Das Screening auf Autoantikörper, welche sich gegen nicht neuronale Antigene richten, wurde mithilfe eines IIFT auf HEp-2-Zellen (IIFT: HEp-2; Euroimmun, FA 1512-20), analog zu den vorher beschriebenen IFTs, nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

1.2.3 Identifizierung des Antigens unbekannter Autoantikörper

Die IP zur Identifizierung des Antigens der im Patientenserum vermuteten Autoantikörper erfolgte angelehnt an ein Protokoll beschrieben von Scharf et al., 2018. Als Positivkontrolle diente Patientenserum von zwei Patienten mit bekannten anti-GAD65-Autoantikörpern. Die Negativkontrollen setzen sich aus Serum von 2 gesunden Blutspendern und 3 Patienten mit Temporallappenepilepsie ohne jeglichen Hinweis auf Autoantikörper in den Screeningtests zusammen.

Die zusätzlich zum üblichen Hintergrundmuster auffallenden Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten, gewaschen, entfärbt und dehydriert. Der Trypsin-Verdau der Proteine in den Gelstücken wurde gemäß dem Protokoll des Trypsin IGD Kits (PP0100, Sigma-Aldrich) durchgeführt. Die aus den Gelstücken extrahierten Peptide wurden gefriergetrocknet und für die massenspektrometrische Untersuchung in die Core Facility verbracht. Es wurden alle detektierten Proteine, die in mehr als 5 Proben oder in mehr als einer Kontrolle vorkamen, als Antigen ausgeschlossen. Verschiedene Isoformen eines Proteins wurden zu einer Proteingruppe zusammengefasst. Antigen-Kandidaten wurden durch einen zweiten Durchgang der IP und Massenspektrometrie bestätigt.

1.2.4 Validierung von Drebrin als Antigen anti-neuronaler Autoantikörper

Zur Herstellung eines rekombinanten humanen Drebrin Proteins, ein Antigen-Kandidat aus vorherigen Arbeitsschritten, wurde ein pETDuet1-T7-His-hDrebrin(wt) Plasmid (adgene #40362, Geraldo et al., 2008) in BL21 kompetente Escherichia coli Zellen transformiert. Der Überstand wurde entsprechend des QIAGEN-Protokolls mithilfe Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose aufgereinigt und in 500 µl Elutionspuffer eluiert.

Mit 40 µg des aufgereinigten humanen Drebrin Proteins wurde ein Immunoblot, angelehnt an das Protokoll, welches für das Screening auf unbekannte Autoantikörper (siehe oben) verwendet wurde, durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten ein anti-Drebrin-Antikörper (ab12350, abcam, 1:200) und ein anti-Polyhistidin-Tag-Antikörper (ab18184, abcam, 1:1000), als negative Kontrolle normales humanes Serum (NHS).

89 Patienten mit ähnlichen Banden im initialen Screening wie der Indexpatient wurden mithilfe des Immunoblot-Assays, äquivalent zu dem Index-Patienten auf anti-Drebrin-Antikörper, getestet. Patientenseren mit Reaktivität gegenüber Drebrin, wurden des Weiteren titriert.

Fixierte und permeabilisierte primäre murine hippocampale Neurone (van Loo et al., 2019) wurden mit einem anti-Drebrin-Antikörper (ab12350, abcam, 1:1000) und den Patientenseren (1:200) inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit Alexa Fluor® Antikörpern (goat anti-human A11013, Invitrogen; goat anti-mouse A11001; 1:1000) und 2-phenylindol (DAPI; 1:100). Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Nikon Eclipse Ti confocal microscope, Nikon Instruments) angefertigt.

1.2.5 Statistik

Zum statistischen Vergleich von kategorialen Variablen wurde in Abhängigkeit der Gruppengröße der Chi-Quadrat oder der Exakte Test nach Fischer verwendet. Diese erfolgten mit Hilfe der Software GraphPad PRISM Version 6.02 (GraphPad Software, Inc.). P-Werte <0,05 wurden als signifikant gewertet. Eine Korrektur der p-Werte nach Bonferroni wurde mithilfe von Microsoft Excel 2010 vorgenommen.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Verteilung von bekannten neuroAK

In der untersuchten Kohorte von 800 Patienten mit im Erwachsenenalter neu aufgetretener TLE (männlich: n=402, weiblich: n=398, mittleres Alter: $44,5 \pm 16$ SD Jahre) konnte in 13% der Fälle mindestens ein bekannter mit neurologischen Syndromen assoziierte Autoantikörper detektiert werden (im Folgenden als neuroAK⁺ bezeichnet; siehe Table 1 Kuehn et al., 2020b). Dabei kamen anti-GAD65-Autoantikörper mit 46,7% am häufigsten in dieser Gruppe vor, zumeist (55,1%) in hohen Titern ($\geq 1:100$) (siehe Figure 1A, Kuehn et al., 2020b). Autoantikörper gegen Oberflächenantigene zeigten sich in 23,8% der neuroAK⁺ Patienten. Hierbei waren Antikörper gegen den NMDAR mit einer Prävalenz von 16,2% am häufigsten detektierbar. Bei 29,5% dieser Patienten konnten hingegen onkoneuronale Autoantikörper, vor allem gegen Ma2/Ta detektiert werden. In 56% der Fälle, in denen Liquor zur Analyse verfügbar war, konnten entsprechende Autoantikörper auch im Liquor nachgewiesen werden. Alle Patienten, mit Ausnahme eines anti-Ri-Autoantikörper positiven Patienten, bei denen der Nachweis von Autoantikörpern im Liquor gelang, zeigten einen entsprechenden Autoantikörper-Befund im Serum. In keiner der Proben des Kontrollkollektivs konnte ein bekannter neuroAK nachgewiesen werden.

1.3.2 Screening auf unbekannte anti-neuronale Autoantikörper

71% der 696 Patienten ohne neuroAK (im Folgenden als neuroAK⁻ bezeichnet), zeigten keine Auffälligkeiten im Screening mittels IIFT und Immunoblot (im Folgenden als neuroAK⁻/screening⁻ bezeichnet).

Im Biomaterial von 18,5% der neuroAK⁻ Patienten konnte Reaktivität im IIFT nachgewiesen werden (siehe Figure 1B, Kuehn et al., 2020b). Auf den hippocampalen und zerebellären Schnitten wurden vier verschiedene Bindungsmuster unterschieden: neuronal n=44, neuropil n=36, nucleär n=21, cytoplasmatisch n=21 (siehe Figure 1C, Kuehn et al., 2020b, **Abb. 2A**). Bei 50,4% der Patienten mit IIFT-Bindungsmustern im Serum und/oder Liquor konnte diese nur in den hippocampalen Strukturen beobachtet werden, weniger häufig (24,6%) sowohl in hippocampalen als auch in zerebellären Strukturen (**Abb. 2B**). Meist zeigten sich äquivalente Muster von Serum und Liquor in den

IIFTs. Bindungsmuster waren in 12 Fällen lediglich unter Verwendung von Liquor, nicht jedoch mit dem korrespondierenden Serum, nachweisbar. In keiner der Proben des Kontrollkollektivs zeigte sich ein Bindungsmuster.

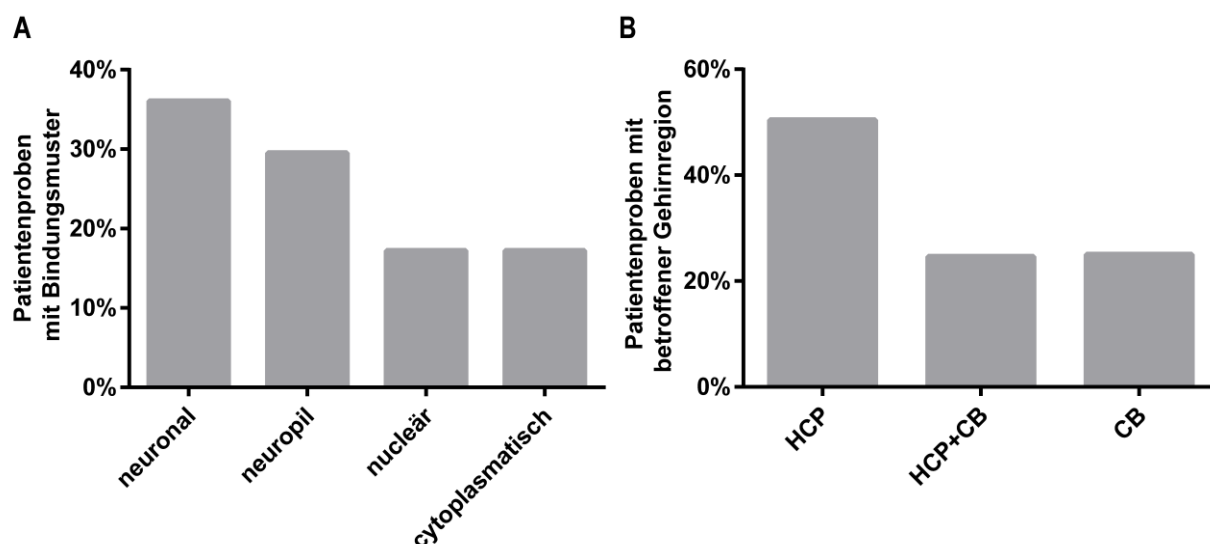


Abbildung 2: (A) Verteilung der Bindungsmuster in den Serum/CSF Proben in neuroAK⁻/Screening⁺ Patienten im IIFT (B) Verteilung der Gehirnregionen, in denen ein Bindungsmuster in diesen Patientenproben im IIFT detektiert wurde. Legende: HCP - ausschließlich im Hippocampus, CB - ausschließlich im Zerebellum, HCP+CB - Hippocampus und Zerebellum

Banden im Immunoblot mit Gewebe- und Synaptosomenlysaten, die in Kontrollseren nicht nachweisbar waren, traten in 14,3% der Proben von neuroAK⁻ Patienten auf (siehe Figure 1B, Kuehn et al., 2020b). In 88% der Proben zeigten sich diese Banden in der Synaptosomenfraktion (siehe Figure 1D, Kuehn et al., 2020b). Die meisten Banden traten bei 40-80 kDa auf, der Größe vieler synaptischer Strukturproteine (siehe Figure 1E, Kuehn et al., 2020b). In mehr als der Hälfte (53%) der Fälle zeigte die korrespondierende Liquorprobe ein äquivalentes Bandenmuster. Im Gegensatz zu den Seren (10%) waren in den Liquores sehr selten (2%) mehrere Banden erkennbar.

Insgesamt konnten unter Berücksichtigung beider Methoden insgesamt 28,6% aller neuroAB⁻ Patienten (n=199) als Screening positiv eingeordnet werden (im Folgenden als neuroAK⁻/screening⁺ bezeichnet). 12% dieser Patienten zeigten positive Befunde sowohl im IIFT als auch im Immunoblot. Beide Elemente des Screenings waren dazu in der Lage das Kontrollkollektiv serologisch von den neuroAK⁺ Patienten zu unterscheiden (**Abb. 3**).

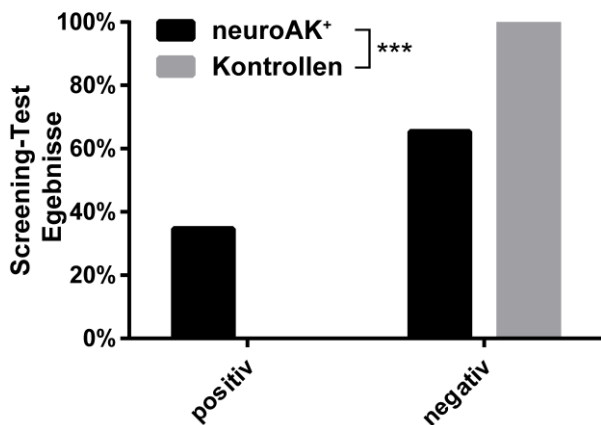


Abbildung 3: Das Screening, bestehend aus IIFT und Immunoblot, war dazu in der Lage neuroAK⁺ Patienten vom Kontrollkollektiv zu unterscheiden (Exakter Test nach Fisher: $p < 0.0001$, neuroAK⁺ Patienten $n = 105$, Kontrollen $n = 27$)

1.3.3 Klinische Parameter bei Patienten mit und ohne neuroAK

Von Beginn der ersten Symptome bis zum Nachweis eines bekannten mit neurologischen Syndromen assoziierten Autoantikörpers vergingen im Durchschnitt $6,3 \pm 8$ SD Jahre. Diese Zeitspanne variierte stark zwischen den einzelnen Autoantikörpern. Die Zeit bis zu einer Testung auf anti-neuronale Autoantikörper betrug bei neuroAK⁻/Screening⁺ Patienten $7,9 \pm 10$ SD Jahre, bei neuroAK⁻/Screening⁻ sogar $9,7 \pm 10$ SD Jahre.

Bezüglich klinischer Parameter zeigte sich, dass die neuroAK⁺ Patienten in einigen Parametern Ähnlichkeiten zu den neuroAK⁻/Screening⁺ Patienten aufwiesen, während dies im Gegensatz dazu bei den neuroAK⁻/screening⁻ nicht der Fall war.

Bezüglich der MRT-Befunde unterscheiden sich sowohl neuroAK⁻/Screening⁺ als auch neuroAK⁻/screening⁻, signifikant gegenüber neuroAK⁺ Patienten, welche in 70% der Fälle Volumenzunahme oder erhöhte T2-Signalintensität der mesiotemporalen Strukturen zeigten (siehe Figure 2A, B, Kuehn et al., 2020b). Hinsichtlich Lateralisation von LE-typischen MRT-Befunden waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen zu erkennen (siehe Figure 2C, Kuehn et al., 2020b). Dasselbe gilt für das Vorhandensein von EEG-Fokusse (siehe Figure 2D, Kuehn et al., 2020b). In den Parametern Lateralisation der EEG-Fokusse, Anfallstyp als auch in der Kategorie entzündliche Liquorbefunde unterschieden sich neuroAK⁺ und neuroAK⁻/Screening⁺ Patienten nicht signifikant. Bei neuroAK⁻/Screening⁻ Patienten hingegen ergaben sich gegenüber den neuroAK⁺ Patienten in all diesen Parametern signifikante Unterschiede (siehe Figure 2E-G, Kuehn et al., 2020b). In allen drei Gruppen konnte eine unterdurchschnittliche Gedächtnisleistung nachgewiesen werden (siehe Figure 3A,

Kuehn et al., 2020b). Im Vergleich zu neuroAK⁺ Patienten traten bei neuroAB⁻/screening⁻ Patienten signifikant weniger motorische Störungen auf (siehe Figure 3B, Kuehn et al., 2020b). Bezüglich Psychosen und Depression konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Figure 3C, D, Kuehn et al., 2020b).

Bemerkenswerterweise hatten nur 9,5% der Patienten eine bekannte Tumorerkrankung in der Vorgeschichte oder im Rahmen der Verlaufsuntersuchungen (siehe Figure 4A, Kuehn et al., 2020b). Das Spektrum der Neoplasien stellte sich überraschend vielseitig dar (siehe Table 2, Kuehn et al., 2020b). Andererseits war eine starke Assoziation zu extrazerebralen autoimmunologischen Erkrankungen, darunter Autoimmunthyreoiditiden, Diabetes mellitus Typ I, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Kollagenosen zu erkennen (siehe Figure 4B, Kuehn et al., 2020b).

1.3.4 Charakterisierung des anti-Drebrin-Autoantikörpers

Basierend auf den Ergebnissen der vorausgegangenen Screenings auf bisher unbekannte anti-neuronale Autoantikörper wurden 102 Seren von neuroAK⁻/Screening⁺ Patienten ohne Reaktivität auf HEp-2-Zellen der IP zugeführt. In 22,5% dieser IPs konnte eine Bande, welche sich vom normalen Hintergrund abhob, identifiziert werden (**Abb. 4**). Hieraus ergaben sich nach der Massenspektrometrie in Proben von 5 Patienten Antigen-Kandidaten.

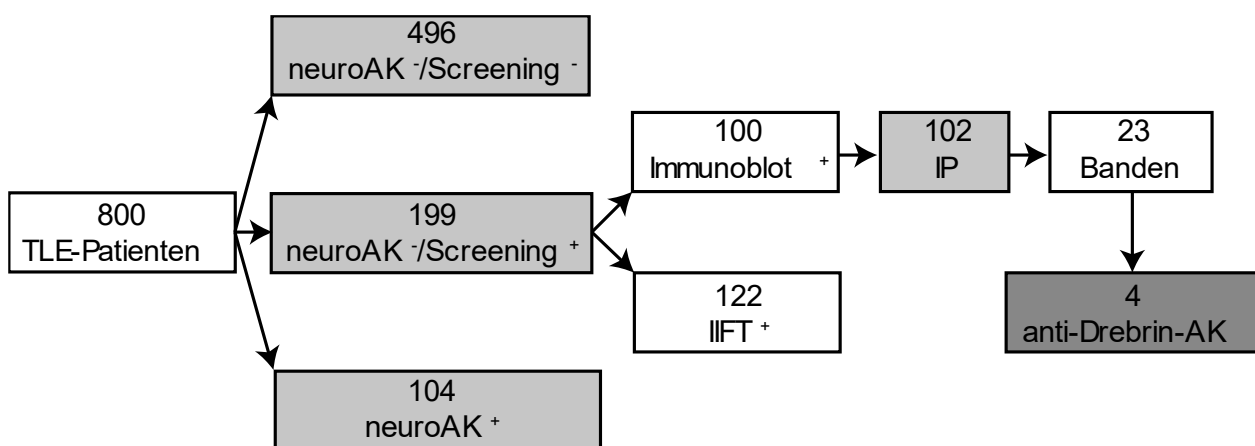


Abbildung 4: Stratifizierung des Ausgangskollektivs von Patienten mit im Erwachsenenalter aufgetretener TLE mit vermutlicher autoimmuner Genese (TLE-Patienten) nach neuroAK und Screening-Befunden. Proben von Patienten mit positivem Ergebnis im Immunoblot und negativem HEp2-Zell Befunden wurden mittels IP weiter analysiert. In 23 Patienten konnten Banden nach IP detektiert werden. In Biomaterial von 4 Patienten gelang der Nachweis von anti-Drebrin-Autoantikörper. Legende: IP-Immunopräzipitation, AK-Autoantikörper

Das Serum des Indexpatienten bei dem Drebrin als Autoantikörper-Target identifiziert wurde, zeigte in den Screening-Tests auf allen Gewebelysaten und dem Synaptosomenlysat eine starke Bande bei ca. 70 kDa im Immunoblot. Zusätzlich zeigte sich ein neuropil-Bindungsmuster im IIFT. Nach IP zeigte sich erneut eine Bande bei 70 kDa in der Coomassie-Färbung, welche in keiner der Negativkontrollen detektierbar war (**Abb. 5A**). Es konnte in der Massenspektrometrie Drebrin als am häufigsten vorkommendes Protein in diesem Gelstück nachgewiesen werden.

Im Immunoblot mit aufgereinigtem Polyhistidin-markierten Drebrin-Protein konnte bestätigt werden, dass es sich bei den im Serum des Indexpatienten vorhandenen Autoantikörpern um anti-Drebrin-Autoantikörper handelt. Des Weiteren konnte dieses Verfahren zum Screening weiterer Seren auf diesen Autoantikörper verwendet werden. Es gelang Autoantikörper in drei weiteren Proben zu detektieren (**Abb. 5B**).

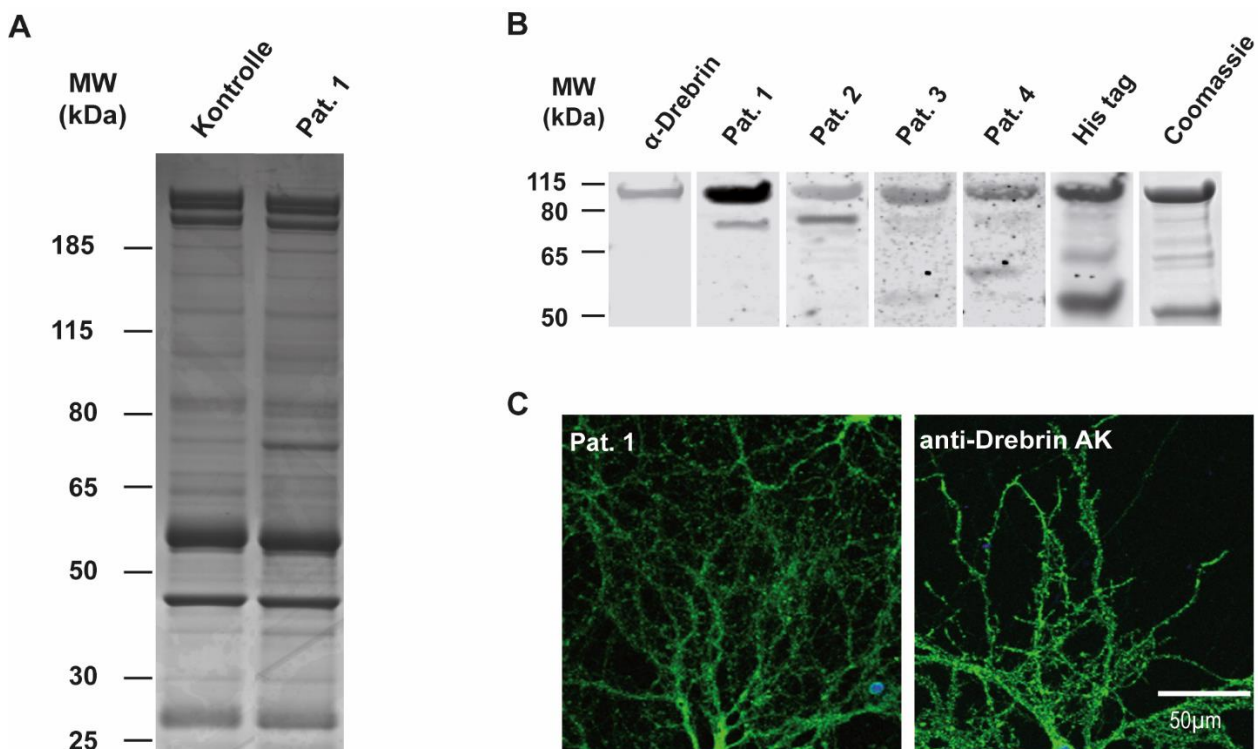


Abbildung 5: (Auszug aus Pitsch et al., 2020) **(A)** Coomassie gefärbtes Gel nach Immunopräzipitation. Der Indexpatient (Pat. 1) zeigte im Vergleich zu einer Kontrollprobe eines gesunden Probanden eine zusätzliche Bande bei ca. 70 kDa. **(B)** Das Serum des Indexpatient, drei weiterer Patienten (Pat. 1-4) und ein kommerzieller anti-Drebrin-Antikörper (α -Drebrin) zeigten eine Bande bei ca. 100 kDa im Immunoblot mit aufgereinigtem rekombinanten His-getaggt Drebrin-Protein. Mit einem anti-His-tag-Antikörper (His tag) und einer Coomassie Färbung sind zusätzlich weitere unspezifische Banden sichtbar. Das unterschiedliche Elektrophoreseverhalten

ist durch starke negative Ladungen und komplexe posttranslationale Modifikationen erklärbar. (C) Das punktate Bindungsmuster an dendritischen Strukturen der Serumprobe des Indexpatienten und eines kommerziellen anti-Drebrin-Antikörper auf permeabilisierten primären hippocampalen Neuronen weisen eine starke Ähnlichkeit auf. Legende: AK - Antikörper.

Der Titer im Serum variierte dabei von 1:1000-1:10000. In drei Patienten konnten anti-Drebrin-Autoantikörper auch im Liquor nachgewiesen werden (Titer: 1:1-1:100). Damit machen Patienten mit anti-Drebrin-Autoantikörpern 0,5% der Patienten in der Kohorte und 2% der neuroAK-/Screening+ Patienten aus.

Immunzytochemie auf primären murinen hippocampalen Neuronen mit Serum der vier Patienten zeigte eine starke Ähnlichkeit der Bindungsmuster verglichen mit dem kommerziellen anti-Drebrin-Antikörper (**Abb. 5C**).

1.4 Diskussion

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass ein Screening mittels IIFT und Immunoblot eine große Gruppe von Patienten innerhalb einer Kohorte mit im Erwachsenenalter neu einsetzender TLE stratifizieren kann, bei denen Hinweise auf Autoantikörper mit bisher unbekanntem Antigen bestehen. Diese Gruppe zeichnet sich klinisch durch Ähnlichkeiten mit neuroAK+ Patienten aus und unterscheidet sich deutlich von neuroAK-/screening- Patienten. Des Weiteren konnte die Prävalenz von neuroAK in unserer Kohorte beschrieben werden.

Einige Studien haben zuvor das Autoantikörperspektrum in Kollektiven mit Epilepsiepatienten und Patienten mit LE adressiert (**Tab. 1**). Dabei ist das Antigenspektrum der untersuchten Autoantikörper sehr heterogen und vom Erscheinungsdatum der Studien sowie dem erwarteten Antikörperspektrum in der untersuchten Kohorte abhängig. Eine sehr hohe Prävalenz von neuroAK (49-93%) in Studien mit LE-Kollektiven kann durch die sehr strikten Einschlusskriterien erklärt werden. Unter den gegen Oberflächenantigene gerichteten Autoantikörpern waren anti-VGKC-Autoantikörper am häufigsten. Hu und Ma2 hingegen stellten die häufigsten Antigene in der Gruppe der onkoneuronalen Autoantikörper dar. Ein Vergleich ist aufgrund der divergierenden Einschlusskriterien nur eingeschränkt möglich. Zusätzlich werden die

Prävalenzen, durch das unterschiedliche Risiko nach einer Autoimmunenzezephalitis eine Epilepsie zu entwickeln, verzerrt (Spatola et al., 2017; Spotala und Dalmau, 2017; van Sonderen et al., 2016).

Für Epilepsiepatienten sind neben einigen kleineren Studien vor allem die Ergebnisse von Brenner et al., 2013 und Dubey et al., 2017a, (Studien mit jeweils um die 400 Patienten) von großer Bedeutung, welche bei 11-25% der Patienten neuroAK detektierten. Ähnlich wie in den Studien zu LE-Patienten, konnten anti-VGKC- bzw. anti-LGI1-Autoantikörper als häufigste Autoantikörper in beiden Kohorten identifiziert werden. Autoantikörper gegen die Antigene GAD65 oder NMDAR konnten nur in wenigen Patienten nachgewiesen werden. Unterschiede, allen voran die sehr viel höhere Prävalenz von anti-GAD65-Autoantikörpern, aber auch die relativ hohe Prävalenz von anti-NMDA- Autoantikörpern bei niedriger Prävalenz von VGKC- Autoantikörpern, sind sicherlich dem speziellen Patientenkollektiv bestehend aus Patienten mit im Erwachsenenalter aufgetretener TLE zuzuschreiben. Anti-GAD65-Autoantikörpern zeigen, wie bereits häufig beschrieben, eine starke Assoziation zur TLE (Brenner et al., 2013, Errichiello et al., 2009; Liimatainen et al., 2010). Dies spiegelt sich auch in dieser Studie wider und ist eine mögliche Erklärung für die stark abweichende Prävalenz, verglichen zu den anderen Studien in unselektierten Epilepsie-Kohorten. Ein weiterer Faktor könnte das bekannterweise schlechte Therapieansprechen von Patienten mit anti-GAD65-Autoantikörpern sein, da diese therapierefraktären Patienten häufiger in tertiären Zentren vorstellig werden (Frisch et al., 2013; Hansen et al., 2016; Hansen et al., 2018a; Malter et al., 2015). Bemerkenswerterweise konnten anti-NMDAR-Autoantikörper nicht nur mit klassischen Formen der NMDAR-Enzephalitis (Dalmau et al., 2008), sondern auch mit im Erwachsenenalter aufgetretenen Epilepsien (Niehusmann et al., 2009) in Verbindung gebracht werden. In unserer Studie stellten diese Patienten sogar die Mehrzahl der Patienten mit Autoantikörpern gegen Oberflächenstrukturen. Auch wenn die Titer dieser Patienten durchweg niedrig ausfielen, ist eine klinische Relevanz der Antikörper wahrscheinlich (Zandi et al., 2015).

Bezüglich der onkoneuronalen Autoantikörper ergaben sich weitestgehend Parallelen zu früheren Studien. Erstaunlicherweise waren auch bei 8 Patienten mit anti-Yo bzw. anti-Zic4 Autoantikörpern klassische Symptome einer autoimmun bedingten Epilepsie

erkennbar. Diese Autoantikörper wurden lediglich in einzelnen Fallberichten mit Anfällen (Adam et al., 2013; Kay et al., 2018), häufig jedoch mit anderen paraneoplastischen Syndromen (Bataller et al., 2002; Schwenkenbacher et al., 2018), in Verbindung gebracht. Größere Fallstudien sind nötig, um die Assoziation dieser Autoantikörper mit LE oder autoimmun bedingter Epilepsie zu bestätigen.

Das Screening auf Autoantikörper, welche sich gegen bisher unbekannte neuronale Antigene richten, beinhaltet zwei Methoden. Mithilfe des IIFTs gelingt es Autoantikörper zu detektieren, welche an Proteine in einer fast nativen Umgebung binden. Screening-Tests an murinen Gehirnschnitten oder primären Neuronen wurden auch zuvor durchgeführt und ergaben Prävalenzen von bis zu 44% (**Tab. 1**). Diese Studien wurden jedoch häufig vor der Identifizierung von vielen Oberflächenantigenen, wie beispielsweise NMDAR, durchgeführt (Bataller et al., 2007; Graus et al. 2008; Gultekin et al., 2000). Neuere Untersuchungen in einer Epilepsie- und LE-Kohorte hingegen konnten mit den jeweils gewählten Methoden in nur 0 - 3% der untersuchten Patientenproben Hinweise auf Autoantikörper gegen bisher unbekannte neuronale Antigene finden (Graus et al., 2018; von Podewils et al., 2017). Immunoblots ergänzen das Screening, indem hier Antigene in linearisierter Form vorliegen, an die wiederum andere Autoantikörper bevorzugt binden. Auf diese Weise ergänzen sich die Methoden und erhöhen die Sensitivität des Screenings. Basierend auf dieser Screening-Methode konnte in 4 der neuroAK-/screening⁺ Patienten, der gegen das intrazelluläre synaptische Protein Drebrin gerichtete Autoantikörper identifiziert und charakterisiert werden (Pitsch et al., 2020). Im Verlauf zeigten weitere Untersuchungen die intrazelluläre Aufnahme von anti-Drebrin-Antikörper, über einen bisher ungeklärten Mechanismus. Eine erhöhte Spontanaktivität von hippocampalen Neuronen mit erhöhten Feuer- und Burst-Raten, welche eine Hyperexzitabilität des neuronalen Netzwerks nahelegt, konnte bei Exposition mit anti-Drebrin-Autoantikörpern nachgewiesen werden.

Auch die immunzytochemisch nachweisbaren postsynaptischen Veränderungen in Anwesenheit von anti-Drebrin-Antikörpern bestärken die Vermutung einer pathogenetischen Relevanz des Autoantikörpers (Pitsch et al., 2020).

Tabelle 1

STUDIE	UNTERSUCHTE KOHORTE ^A	GRÖßE KOHORTE ^B	KONTROLL GRUPPE ^C	UNTERSUCHTE AUTOANTIKÖRPER	SCREENING ^D	PRÄVALENZ AUTOANTIKÖRPER ^E
BRENNER ET AL., 2013	Epilepsie, >16LJ Multi-Center-Studie	n=416	n=148	GAD, NMDAR, VGKC, VGCC, GlyR, AChR, AQP4, LGI1, CASPR2	-	neuroAK ⁺ : 11%; VGKC 4,8% (LGI1 0,2%), GlycinR 2,6%, NMDAR 1,7%, GAD 1,7%
DUBEY ET AL. 2017A	Epilepsie, autoimmune Ursache vermutet Multi-Center-Studie	n=387	n=125	Hu, Ri, ANNA3, Yo, Tr, CV2, GFAP, NMDAR, AMPAR, DPPX, mGluR1, GABA _b R, GABA _A R, VGKC, AChR, VGCC, GAD65, LGI1, CASPR2	-	neuroAK ⁺ : 25%; LGI1 4,4%, GAD65 3,1%, NMDA 1,5%, Hu 0,5%, AMPAR 0,5%, GFAP 0,5%, CASPR2 0,2%, CV2 0,2%, Ri 0,2%
ELISAK ET AL. 2018	TLE, >1 Jahr Single-Center-Studie	n=163	-	NMDAR, AMPAR, GABA _b R, CASPR2, LGI1, GAD65, Hu, Yo, Ro, CV2, Amphiphysin, Ma2, SOX1, Tr, Zic4	-	neuroAK ⁺ : 5,5%; GAD65 1,8%, CASPR2 1,2%, LGI1 1,2%, GABA _b R 0,6%, onconeuronal 0,6%
MCKNIGHT ET AL. 2005	Epilepsie, autoimmune Ursache vermutet oder therapie-refraktär Multi-Center-Studie	n=139	n=150	VGKC, VGCC, GAD, GM1, GluR3, ANA	-	neuroAK ⁺ : 15,8%; VGKC 11,5%, GAD 3,6%, GM1 0,7%, ANA 25%
DUBEY ET AL. 2017B	Epilepsie, unbekannte Ursache Multi-Center-Studie	n=112	-	NMDAR, VGKC, LGI1, GAD65, GABA _b R, AMPAR, Hu, PCA2, Amphiphysin, CV2, Yo, Ri, ANNA3, Tr, AGNA, AChR, VGCC, TPO	-	neuroAK ⁺ : 34,9%; TPO 13,4%, GAD65 12,5%, VGKC 10,7% (LGI1 3,6%), NMDAR 3,6%, VGCC/AChR 2,7%
BOZZETTI ET AL., 2020	Epilepsie Multi-Center-Studie	n=92	-	GAD65, Hu, Ri, Yo, CV2, Ma2/Tr, SOX1, Zic4, Amphiphysin, NMDAR, AMPAR, LGI1, CASPR2, DPPX, GABA _A /bR, GlyR, MOG, GFAP	Primär Neurone	neuroAK ⁺ : 31,5%; NMDAR 9,8%, LGI1 8,7%, GlyR 5,4%, CASPR2 3,3%, Hu 3,3%, Ma2/Ta 2,2%, GABA _b 2,2%, GAD65 2,2%, SOX1 2,2%, GFAP 1,1%

VON PODEWILS ET AL. 2017	neu aufgetretene Epilepsie, >55LJ, keine zerebrale Läsion Single-Center-Studie	n=66	-	GAD65, NMDAR, GABA _B R, AMPAR, DPPX, VGKC, LGI1, CASPR2, mGluR5, GlyR	Mausgehirn-schnitte	neuroAK+: 6,1%; VGKC 6,1% (CASPR2 4,5%), neuropil 3%
GRAUS ET AL. 2018	LE nach Graus et al. 2016 Single-Center-Studie	n=163	-	Hu, Yo, Ri CV2, Amphiphysin, Ma1, Ma2, Tr, Zic4, SOX1, GAD, NMDAR, AMPAR, GABA _A R, GABA _B R, IgLON5, CASPR2, LGI1, DPPX, Neurexin, mGluR1/5	Rattengehirn-schnitte, primäre Neurone	neuroAK+: 93%; LGI1:47%; GABA _B 17,22%, AMPAR 7,9%, Ma2 8,6%, Hu 7,2%, CASPR2 6,6%, SOX 2%, mGluR5/ Amphiphysin/ Neurexin 0,6%, nicht charakterisierte AK 0%
GULTEKIN ET AL. 2000	paraneoplastische LE Multi-Center-Studie	n=50	-	HuD, CDR62, Nova-1, Ma1, Ma2, CV2	Rattengehirn-schnitte	neuroAK+: 60%; Hu 36%, Ma2 20%, Ma1 4%
GRAUS ET AL. 2008	LE nach Graus et al. 2004 Multi-Center-Studie	n=45	-	Hu, Yo, Ri, CV2, Ma2, Amphiphysin, Tr, ZIC4, ANNA3, PCA2, NMDAR, VGKC, GAD	Rattengehirn-schnitte, primäre Neurone	neuroAK+: 88%; VGKC 28,9%, NMDA 11%, Ma2 2,2%, GAD 4,4%, Hu 13,3%, Amphiphysin 8,8%, SOX1 4,4%, CV2 2,2%, neue AK gegen Oberflächenantigene 24,4%
BATALLA ET AL. 2007	LE Multi-Center-Studie	n=39	-	Hu, Ma1, Ma2, CRMP5, Amphiphysin, VGKC	Rattengehirn-schnitte, primäre Neurone	neuroAK+: 48,7%; Hu:14,6%, Ma2 15,4%, VGKC 11,1%, nicht charakterisierte AK 43,6%

Tabellarische Darstellung von Publikationen, die die Prävalenz und Verteilung von Autoantikörpern in definierten Kollektiven (Epilepsie oder LE) beschreiben. ^APatientenkohorte, in der die Prävalenz von neuroAK bestimmt wurde. Einschlusskriterien sind verkürzt dargestellt. ^BAnzahl der eingeschlossenen Patienten. ^CAnzahl der Patienten/Probanden, die als Kontrollkollektiv verwendet wurden. ^DUntersuchung auf Autoantikörper mit bisher unbekanntem Antigen. Es wurden verschiedene Protokolle der Immunhisto- und Immunzytochemie an Gehirnschnitten oder primären neuronalen Zellkulturen verwendet. ^EPrävalenzen der untersuchten Autoantikörper. Alle %-Angaben beziehen sich auf die Anzahl der Patienten in „Größe Kohorte“. Werte in Klammern geben die Prävalenz von anti-LGI1- oder anti-CASPR2-Autoantikörpern an, wenn diese bereits in der Prävalenz für anti-VGKC-Autoantikörpern eingeflossen sind.

Für viele weitere Autoantikörper wird eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie von Anfällen angenommen (Geis et al., 2019; Hara et al., 2017; Malviya et al., 2017; Werner et al., 2016). Andererseits ergaben sich sowohl mithilfe von FACS-Analysen (Golombeck et al., 2016; Hansen et al., 2020; Helmstaedter et al., 2020; Langenbruch et al., 2020) als auch von histopathologischen Untersuchungen Hinweise auf T-Zell-vermittelte Mechanismen und die Aktivierung des Komplementsystems in der Pathophysiologie von Autoimmunenzephalitiden (Bien et al., 2012; Geis et al., 2019; Kerling et al., 2008). Auch ein im Rahmen dieser Arbeit entstandener Fallbericht ergab entsprechende Hinweise in einem Fall von anti-LGI1-Autoantikörper-Enzephalitis (Kuehn et al., 2020a). Außerdem konnte ein vermutlich dadurch bedingter Verlust von neuronalen Zellen in der Cornu Ammonis (CA)4-Region des Hippocampus nachgewiesen werden (Kuehn et al., 2020a).

Das Zusammenfassen von verschiedenen neuroAK in die Gruppe der neuroAK⁺ Patienten stellt eindeutig eine starke Vereinfachung der Situation dar. Bei der Vielfalt von untersuchten neuroAK und der daraus resultierenden geringen Prävalenz für jeden einzelnen neuroAK wäre eine statistische Analyse jedoch anders kaum sinnvoll. Auch die neuroAK⁻/screening⁺ Gruppe setzt sich vermutlich aus Patienten mit verschiedensten Autoantikörpern zusammen.

In einem sehr interessanten Ansatz gelang es Dubey et al., 2017 und 2019 einen APE-Score zu entwickeln, welcher als prädiktiver Marker anhand klinischer Kriterien die Wahrscheinlichkeit einen autoAK im Biomaterial zu detektieren angibt. Der Score wurde anhand Epilepsie-Kohorten erstellt und validiert, die sich hinsichtlich des Autoantikörper-Spektrums von unserer TLE Kohorte deutlich unterscheiden. Eine Übertragbarkeit ist aufgrund der teilweise stark auf einige neuroAK abzielenden Kriterien daher fraglich, auch konnte die hohe Sensitivität und Spezifität dieses Scores nur bedingt in einem europäischen Kollektiv reproduziert werden.

In unserer Studie ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen neuroAK⁺ und neuroAK⁻/screening⁻ Patienten in Bezug auf hippocampale MRT-Veränderungen, die Lateralisation des EEG-Fokus, inflammatorische Liquorbefunde und motorischer Begleitsymptomatik. Eine Studie von Elisak et al., 2018 konnte bezüglich klinischer Eigenschaften hingegen keine Unterschiede zwischen seropositiven und seronegativen

Patienten mit chronischer TLE finden. Die fälschliche Zuordnung zur seronegativen Gruppe von Patienten mit Autoantikörpern, die nicht durch die gewöhnliche diagnostische Prozedur erkannt werden, und eine damit einhergehende Verwässerung der Gruppenunterschiede könnte dies erklären. Entsprechende Patienten werden in unserer Studie durch die Gruppe der neuroAK⁻/Screening⁺ Patienten berücksichtigt. Diese wiesen in allen untersuchten klinischen Aspekten, mit Ausnahme der hippocampalen MRT-Veränderungen, keine Unterschiede im Vergleich mit den neuroAK⁺ Patienten auf. Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen MRT-Befunde könnte die längere Zeit zwischen Symptombeginn und Diagnosezeitpunkt sein, in dem die akute hippocampale Entzündungsreaktion bereits abgeklungen und so bildmorphologisch nicht mehr nachweisbar ist (Urbach et al., 2006; Wagner et al., 2015).

Autoimmunerkrankungen waren eine häufige Komorbidität bei Patienten mit im Erwachsenenalter aufgetretener TLE. So scheint eine Prädisposition für autoimmunologische Erkrankungen auch autoimmun bedingte Epilepsien zu beinhalten, was möglicherweise auch mit HLA-Prädispositionen bei diesen Patienten zusammenhängen könnte (Binks et al., 2018; Mueller et al., 2018). Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Assoziation von Epilepsie und Autoimmunerkrankungen aus Populationsbasierten-Studien (Lin et al., 2016; Ong et al., 2014). Wie bereits in Hansen et al., 2018b vorbeschrieben, traten in unserem TLE-Kollektiv ebenfalls kaum Neoplasien auf und es zeigte sich nicht das klassische Neoplasiespektrum (Finke et al., 2017; Gultekin et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Studie leisten einen Beitrag, Patienten mit autoimmun bedingter TLE, vor allem Patienten ohne die bekannten neuroAK, zu stratifizieren und somit frühzeitig einer spezifischen Therapie zuzuführen. Durch das entwickelte Screening-Verfahren ist die Voraussetzung gegeben, Patienten, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit Autoantikörper gegen bisher unbekannte neuronale Antigene vorliegen, zu erkennen und die Charakterisierung dieser Autoantikörper voranzutreiben. Durch Identifizierung der Antigene, wie beispielsweise des Proteins Drebrin, wird es in Zukunft möglich sein, breit anwendbare diagnostische Tests zu etablieren und ein differenzierteres Bild der Vielzahl von verschiedenen autoimmunvermittelten Epilepsien zu erhalten.

1.5 Zusammenfassung

Bei Patienten mit autoimmun bedingter Epilepsie konnten in der letzten Zeit eine Vielzahl von Autoantikörpern gegen neuronale Antigene identifiziert werden. Diese Autoantikörper bilden neben weiteren klinischen Kriterien einen elementaren Bestandteil der Diagnostik. Um die Diagnosestellung einer autoimmun-bedingten Epilepsie zu verbessern, hat diese Studie zum Ziel, 800 Patienten mit potenziell autoimmun bedingter im Erwachsenenalter aufgetretener TLE mithilfe einer Screening-Prozedur zu stratifizieren und dieses Kollektiv serologisch und klinisch zu charakterisieren.

Hierfür wurden Serum- und Liquorproben dieser 800 Patienten auf bekannte anti-neuronale Autoantikörper (neuroAK) untersucht, darüber hinaus Immunoblots mithilfe von Gewebelysaten und indirekte Immunfluoreszenz-Tests (IIFTs) auf verschiedenen zerebralen Schnitten auf Hinweise für Autoantikörper gegen unbekannte neuronale Antigene durchgeführt. Die Patienten wurden anschließend anhand des serologischen Status in drei Gruppen (neuroAK⁺, neuroAK⁻/Screening⁺ und neuroAK⁻/Screening⁻) eingeteilt und bezüglich verschiedener klinischer Parameter gegenübergestellt. Mithilfe von Immunopräzipitation und Massenspektrometrie wurden bisher unbekannte Antigene identifiziert und mithilfe von Immunoblots und Immunzytochemie validiert.

Es konnte gezeigt werden, dass in 13% der Patienten neuroAK nachweisbar waren. Hierbei waren anti-GAD65-Autoantikörper am häufigsten detektierbar. In 62% der Patienten ergaben sich keine Hinweise für Autoantikörper gegen unbekannte neuronale Antigene im Screening. Insgesamt zeigten 29% der neuroAK⁻ Patienten positive Screening Befunde (IIFT: 18%; Immunoblot: 14%). Klinisch glichen sich neuroAK⁺ und neuroAK⁻/Screening⁺ Patienten, mit Ausnahme der MRT-Befunde. Bei neuroAK⁻/Screening⁻ Patienten hingegen konnten im Vergleich zu den neuroAK⁺ Patienten Unterschiede in einigen Parametern festgestellt werden. In der neuroAK⁻/Screening⁺ Patientengruppe gelang es in 4 Patienten Autoantikörper gegen das dendritische Protein Drebrin zu identifizieren.

Mithilfe der beschriebenen Screening-Prozedur ist es möglich, Patienten auszumachen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Autoantikörper gegen unbekannte neuronale Antigene haben. Dies ermöglicht, gezielt diese Antigene zu identifizieren. Dadurch wird erleichtert,

in diesen Patienten eine autoimmun bedingte Epilepsie zu diagnostizieren und die Patienten einer spezifischen Therapie zuzuführen.

1.6 Literaturverzeichnis

Adam VN, Budincevic H, Mrsic V, Stojcic EG, Matolic M, Markic A. Paraneoplastic limbic encephalitis in a patient with adenocarcinoma of the colon: a case report. 2013. *Journal of Clinical Anaesthesia*. 25: 491-495

Baekkeskov S, Aanstoot H, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. 1990. *Nature*. 13: 151-156

Bataller L, Wade DF, Fuller GN, Rosenfeld MR, Dalmau J. Cerebellar degeneration and autoimmunity to zinc-finger proteins of the cerebellum. 2002. *Neurology*. 59: 1985-1987

Bataller L, Kleopa KA, Wu GF, Rossi JE, Rosenfeld MR, Dalmau J. Autoimmune limbic encephalitis in 39 patients: immunophenotypes and outcomes. 2006. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 78: 381-385

Bernal F, Graus F, Pifarre A, Saiz A, Benyahia B, Ribalta T. Immunohistochemical analysis of anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis. 2002. *Acta Neuropathol*. 103: 509-515

Bien CG, Urbach H, Schramm J, Soeder BM, Becker AJ, Voltz R, Vincent A, Elger CE. Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. 2007. *Neurology*. 69:1236-1244

Bien CG, Vincent A, Barnett M, Becker AJ, Blümcke I, Graus F, Jellinger KA, Reuss DE, Ribalta T, Schlegler J, Sutton I, Lassmann H, Bauer J. Immunopathology of autoantibody-associated encephalitis: clues for pathogenesis. 2012. *Brain*. 135: 1622-1638

Bink S, Varley J, Lee W, Makuch M, Elliott K, Gelfand JM, Jacob S, Leite MI, Maddison P, Chen M, Geschwind MD, Grant E, Sen A, Waters P, McCormack M, Cavalleri GL,

Barnardo M, Knight JC, Irani SR. Distinct HLA associations of LGI1 and CASPR2-antibody diseases. 2018. *Brain*. 141: 2263-2271

Bozzetti S, Rossini F, Ferrari S, Delogu R, Cantalupo G, Marchioretto F, Zanette G, Zanoni T, Turatti M, Vitale G, Cadaldini M, Rossi F, Di Tizio L, Zuco C, Maniscalco GT, Soldani F, Monaco S, Trinkka E, Hoefelberger R, Mariotto S. Epileptic seizures of suspected autoimmune origin: a multicentre retrospective study. 2020. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 91(11): 1145-1153

Boronat A, Gelfand JM, Gresa-Arribas N, Jeong H, Walsh M, Roberts K, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Graus F, Rudy B, Dalmau J. Encephalitis and Antibodies to Dipeptidyl-Peptidase-Like Protein-6, a Subunit of Kv4.2 Potassium Channels. 2013. *Ann Neurol*. 73: 120-128

Brenner T, Silis GJ, Hart Y, Howell S, Waters P, Brodie MJ, Vincent A, Lang B. Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy. 2013. *Epilepsia*. 54(6): 1028-1035

Cabezudo-Garcia P, Mena-Vaazquez N, Villagran-Gercia M, Serrano-Castro J. Efficacy of antiepileptic drugs in autoimmune epilepsy: A systematic review. 2018. *Seizure*. 59: 72-76

Dalmau J, Tüzün E, Wu H, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, Baehring M, Schimazaki H, Koide R, King D, Mason W, Sansing LH, Dichter MA, Rosenfeld MR, Lynch D. Paraneoplastic Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis Associated with Ovarian Teratoma. 2007. *Ann Neurol*. 61: 25-36

Dalmau J, Gleichmann AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. 2008. *Lancet Neurol*. 7: 1091-1098

Darnell RB, Posner JB, Paraneoplastic Syndromes Involving the Nervous System. 2003. *N Engl J Med*. 349: 1543-1554

de Bruijn MAAM, van Sonderen A, van Coevorden-Hameete MThijsH, Bastiaansen AEM, Schreuers MWJ, Rouhl RPW, van Donselaar CA, Majoie MHJM, Neuteboom RF, Sillevius Smitt PAE, Thijs RD, Titilaer MJ. Evaluation of seizure treatment in anti-LGI1, anti-NMDAR, and anti-GABA_BR encephalitis. 2019. *Neurology*. 92: e1-e12

Dubey D, Singh J, Britton JW, Pittock SJ, Flanagan EP, Lennon VA, Tillema J, Wirrell E, Shin C, So E, Cascino GD, Wingerchuck DM, Hoerth MT, Shih JJ, Nickels KC, McKeon A. Predictive models in the diagnosis and treatment of autoimmune epilepsy. 2017a. *Epilepsia*. 58(7): 1181-1189

Dubey D, Alqallaf A, Hays R, Freeman M, Chen K, Ding K, Agostini M, Vernino S. Neurological Autoantibody Prevalence in Epilepsy of Unknown Etiology. 2017b. *JAMA Neurol*. 74(4): 397-402

Dubey D, Pittock SJ, McKeon A. Antibody Prevalence in Epilepsy and Encephalopathy Score: Increased Specificity and Applicability. 2019. *Epilepsia*. 60(2) 367-369

Dubey D, Britton J, McKeon A, Gadoth A, Zekeridou A, Lopez Chirboga SA, Devine M, Cerhan JH, Dunlay K, Sager J, Ramberger M, Waters P, Irani SR, Pittock SJ. Randomized Placebo-Controlled Trial of Intravenous Immunoglobulin in Autoimmune LGI1/CASPR2 Epilepsy. 2020. *Ann Neurol*. 87: 313-323

Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM, Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet*. 2006. 367: 1087-1100

Elisak M, Krysl D, Hanzalova J, Volna K, Bien CG, Leyboldt F, Marusic P. The prevalence of neural antibodies in temporal lobe epilepsy and the clinical characteristics of seropositive patients. 2018. *Seizure: European Journal of Epilepsy*. 63: 1-6

Errichiello L, Perruolo G, Pascarella A, Formisano P, Minetti C, Striano S, Zara F, Striano P. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD) in focal and generalized epilepsy: A study on 233 patients. 2009. *Journal of Neuroimmunology*. 211: 120-123

Finke C, Bartels F, Lütt A, Prüss H, Harms L. High Prevalence of Neuronal Surface Autoantibodies Associated With Cognitive Deficits in Cancer Patients. 2017. *J Neurol*. 264(9): 1968-1977

Fosgren L, Beghi E, Oun A, Sillanpää M. The epidemiology of epilepsy in Europe – a systematic review. 2005. *European Journal of Neurology*. 12: 245-253

Frisch C, Malter MP, Elger CE, Helmstaedter C. Neuropsychological course of voltage-gated potassium channel and glutamic acid decarboxylase antibody related limbic encephalitis. 2013. *Eur J Neurol*. 20(9): 1297-1304

Geis C, Planaguma J, Carreno M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. 2019. *J Clin Invest*. 129(3): 926-940

Geraldo S, Khanzada UM, Parson M, Chilton JK, Gordon-Weeks PR. Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neurogenesis. 2008. *Nat Cell Biol*. 10(10): 1181-1189

Golombeck KS, Bönte K, Mönig C, van Loo KM, Hartwig M, Schwindt W, Widman G, Lindenau M, Becker AJ, Glatzel M, Elger CE, Wiendl H, Meuth SG, Lohmann H, Gross CC, Melzer N. Evidence of a pathogenic role for CD8(+) T cells in anti-GABAB receptor limbic encephalitis. 2016. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 3(3): e232

Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Silveira Smitt P, Vedeler C, Verschuur JJJM, Vincent A, Voltz R. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. 2004. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 75: 1135-1140

Graus F, Vincent A, Pozo-Rosich P, Sabater L, Saiz A, Lang B, Dalmau J. Anti-glial nuclear antibody: Marker of lung cancer-related paraneoplastic neurological syndromes. 2005. *Journal of Neuroimmunology*. 165: 155-171

Graus F, Saiz A, Lai M, Bruna J, Lopez F, Sabater L, Blanco Y, Rey MJ, Ribalta T, Dalmau J. Neuronal surface antigen antibodies in limbic encephalitis: Clinical immunologic associations. 2008. *Neurology*. 71: 930-936

Graus F, Titulaer M, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, Cortese I, Dale RC, Gelfand JM, Geschwind M, Glaser CA, Honnorat J, Höftberger R, Iizuka T, Irani SR, Lancaster E, Leypoldt F, Prüss H, Rae-Grant A, Reindl M, Rosenfeld MR, Rotasy K, Saiz A, Venkatesan A, Vincent A, Wandinger K, Waters P, Dalmau J. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. 2016. *Lancet Neurol.* 15: 391-404

Graus F, Escudero D, Oleaga L, Bruna J, Villarejo-Galende A, Ballabriga J, Barcelo MI, Gilo F, Popkirov S, Stourac P, Dalmau J. Syndrome and outcome of antibody-negative limbic encephalitis. 2018. *European Journal of Neurology.* 25: 1011-1016

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. 2000. *Brain.* 123: 1481-1494

Hara M, Arino H, Petit-Pedrol M, Sabater L, Titulaer MJ, Martinez-Hernandez E, Schreurs MWJ, Rosenfeld MR, Graus F, Dalmau J. DPPX antibody-associated encephalitis: Main syndrome and antibody effect. 2017. *Neurology.* 88: 1-9

Hansen N, Widman G, Witt JA, Wagner J, Becker AJ, Elger CE, Helmstaedter C. Seizure control and cognitive improvement via immunotherapy in late onset epilepsy patients with paraneoplastic versus GAD65 autoantibody-associated limbic encephalitis. 2016. *Epilepsy Behav.* 65: 18-24

Hansen N, Ernst L, Rüber T, Widmann G, Becker AJ, Elger CE, Helmstaedter C. Pre- and long-term postoperative courses of hippocampus-associated memory impairment in epilepsy patients with antibody-associated limbic encephalitis and selective amygdalohippocampectomy. 2018a. *Epilepsy Behav.* 79: 93-99

Hansen N, Widman G, Stuff S, Becker AJ, Witt JA, Ahmadzadehfar H, Helmstaedter C, Elger CE. Cancer frequency detected by positron emission tomography-computed tomography in limbic encephalitis. 2018b. *Epilepsy Behav.* 89: 105-111

Hansen N, Schwing K, Önder D, Widman G, Leelaarporn P, Prusseit I, Surges R, Melzer N, Gross C, Becker AJ, Witt JA, Elger CE, Helmstaedter C. Low CSF CD4/CD8+ T-cell

proportions are associated with blood-CSF barrier dysfunction in limbic encephalitis. 2020. *Epilepsy Behav.* 102: 106682

Hauser WA and Kurland LT. The Epidemiology of Epilepsy in Rochester, Minnesota, 135 Through 1967. 1975. *Epilepsia.* 16: 1-66

Helmstaedter C, Hansen N, Leelaarporn P, Schwing K, Oeder D, Widman G, Racz A, Surges R, Becker A, Witt JA. Specific B- and T-cell populations are associated with cognition in patients with epilepsy and antibody positive and negative suspected limbic encephalitis. 2020. *J Neurol.* [https://doi: 10.1007/s00415-020-10158-1](https://doi.org/10.1007/s00415-020-10158-1)

Hutchinson M, Waters P, McHugh J, Gorman G, O’Riordan S, Connolly S, Hager H, Yu P, Becker CM, Vincent A. Progressive Encephalomyelitis, Rigidity, and Myoclonus: A novel Glycine Receptor Antibody. 2008. *Neurology.* 71: 1291-1292

Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, Peles E, Buckley C, Lang B, Vincent A. 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. 2010. *Brain.* 133: 2734-2748

Kay L, Bauer S, Koczulla AR, Librizzi D, Vadasz D, Knake S, Rosenow F, Strzeleczyk A. Ondine’s curse and temporal lobe seizures: anti-Hu and Zic4-associated paraneoplastic brainstem and limbic encephalitis. 2017. *Eur J Neurol.* 25(5): e59-e60

Kerling F, Blümcke H, Stefan H. Pitfalls in diagnosing limbic encephalitis - a case report. 2008. *Acta Neurol Scand.* 118(5): 339-342

Kuehn JC, Scheuerle A, Bauer J, Becker AJ, Wirtz R, Lewerenz J. A 64-Year-Old Patient With a Mesiotemporal Mass and Symptomatic Epilepsy. 2020a. *Brain Pathol.* 30(2): 413-414.

Kuehn JC, Meschede C, Helmstaedter C, Surges R, von Wrede R, Hattingen E, Vatter H, Elger CE, Schoch S, Becker AJ Pitsch J. Adult-onset temporal lobe epilepsy suspicious for autoimmune pathogenesis: Autoantibody prevalence and clinical correlates. 2020b. *PLoS ONE.* 15(10): e0241289

Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichmann AJ, Shu H, Mata S, Kremens D, Vitaliani R, Geschwind MD, Bataller L, Kalb RG, Davis R, Graus F, Lynch DR, Balice-Gordon R, Dalmau J. AMPA Receptor Antibodies in Limbic Encephalitis Alter Synaptic Receptor Location. 2009. *Ann Neurol*. 65: 424-434

Lai M, Huijbers MGM, Lancaster E, Gaus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. 2010. *Lancet Neurol*. 9: 776-785

Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to the GABA_B receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. 2010. *Lancet Neurol*. 9: 67-76

Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Titulaer MJ, Boulos M, Weaver S, Antoine JC, Liebers E, Kornblum C, Bien CG, Honnorat J, Wong S, Xu J, Contractor A, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to metabotropic glutamate receptor 5 in the Ophelia syndrome. 2011. *Neurology*. 77: 1698-1701

Langenbruch L, Bleß L, Schulte-Mecklenbeck A, Sundermann B, Brix T, Elger CE, Melzer N, Wiendl H, Meuth SG, Gross CC, Kovac S. Blood and cerebrospinal fluid immune cell profiles in patients with temporal lobe epilepsy of different etiologies. 2020. *Epilepsia*. 61(10): e153-e158

Leyboldt F, Aramangue T, Dalmau J. Autoimmune encephalopathies. 2015. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1338: 94-114

Liimatainen S, Peltola M, Sabater L, Fallah M, Kharazmi E, Haapala A, Dastidar P, Knip M, Saiz A, Peltola J. Clinical significance of glutamic acid decarboxylase antibodies in patients with epilepsy. 2010. *Epilepsia*. 51(5) 760-767

Lin Z, Si Q, Xiaoyi Z. Association between epilepsy and systemic autoimmune diseases: A meta-analysis. 2016. *Seizure*. 41: 160-166

Malter MP, Helmstader C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to Glutamic Acid Decarboxylase Define a Form of Limbic Encephalitis. 2010. *Ann Neurol*. 67: 470-478

Malter MP, Frisch C, Zeitler H, Surges R, Urbach H, Helmstader C, Elger CE, Bien CG. Treatment of immune-mediated temporal lobe epilepsy with GAD antibodies. 2015. *Seizure*. 2015. 30: 57-63

Malviya M, Barman S, Golombeck KS, Planagumà J, Mannara F, Strutz-Seebohm N, Wrzos C, Demir F, Baksmeier C, Steckel J, Falk KK, Gross CC, Kovac S, Bönke K, Johnen A, Wandinger KP, Martín-García E, Becker AJ, Elger CE, Klöcker N, Wiendl H, Meuth SG, Hartung HP, Seebohm G, Leypoldt F, Malonado R, Stadelmann C, Dalmau J, Melzer N, Goebels N. NMDA encephalitis: passive transfer from man to mouse by recombinant antibody. 2017. *Ann Clin Transl Neurol*. 4(11): 768-783

McKnight K, Jiang Y, Hart Y, Cavey A, Wroe S, Blank M, Shoenfeld Y, Vincent A, Palace J, Lang B. Serum antibodies in epilepsy and seizure-associated disorders. 2005. *Neurology*. 65: 1730-1736

Mueller SH, Färber A, Prüss H, Melzer N, Golombeck KS, Kümpfel T, Thaler F, Elisak M, Lewerenz J, Kaufmann M, Sühs KW, Ringelstein M, Kellinghaus C, Bien CG, Kraft A, Zettl UK, Ehrlich S, Handreka R, Rostásy K, Then Bergh F, Faiss JH, Lieb W, Franke A, Kuhlenbäumer G, Wandinger KP, Leypoldt F, (GENERATE). Genetic predisposition in anti-LGI1 and anti-NMDA receptor encephalitis. 2018. *Ann Neurol*. 83(4): 863-869

Niehusmann P, Dalmau J, Rudlowski C, Vincent A, Elger CE, Rossi JE, Bien CG. Diagnostic Value of N-methyl-D-aspartate Receptor Antibodies in Women With New-Onset Epilepsy. 2009. *Arch Neurol*. 66(4): 458-464

Ong M, Kohane IS, Cai T, Gorman MP, Mandl KD. Population-Level Evidence for an Autoimmune Etiology of Epilepsy. 2014. *JAMA Neurology*. 71(5): 569-574

Petit-Pedrol M, Aramngue T, Peng X, Bataller L, Cellucci T, Davis R, McCracken L, Martinez-Hernandez E, Mason WP, Kruer MC, Ritacco DG, Grisold W, Meaney BF, Alcalá C, Silveira-Smitt P, Titulaer MJ, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABA_A receptor: a case

series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. 2014. *Lancet Neurol.* 13: 276-286

Pitsch J, Kamalizade D, Brain A, Kuehn JC, Gulakova PE, Rüber T, Lubec G, Dietrich D, von Wrede R, Helmstaedter C, Surges R, Elger CE, Hattingen E, Vatter H, Schoch S, Becker AJ. Drebrin Autoantibodies in Patients with Seizures and Suspected Encephalitis. 2020. *Ann Neurol.* 87: 869-884

Quek AML, Britton JW, McKeon A, So E, Lennon VA, Shin C, Klein CJ, Watson RE, Kotsenas AL, Lagerlund TD, Cascino GD, Worrell GA, Wirrell EC, Nickels KC, Aksamit AJ, Noe KH, Pittock SJ. Autoimmune Epilepsy Clinical Characteristics and Response to Immunotherapy. 2012. *Arch Neurol* 69(5): 582-593

Rada A, Birnbacher R, Gobbi C, Kurthen M, Ludolph A, Naumann M, Neirich U, von Oertzen TJ, Ransmayr G, Riepe M, Schimmel M, Schwartz O, Surges R, Bien CG. Seizures associated with antibodies against cell surface antigens are acute symptomatic and not indicative of epilepsy: insights from long-term data. 2020. *J Neurol.* <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10250-6>

Saiz A, Blanco Y, Sabater L, Gonzalez F, Bataller L, Casamitjana R, Romio-Tarranta L, Graus F. Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. 2008. *Brain.* 131: 2553-2563

Scharf M, Miske R, Kade S, Hahn S, Denno Y, Bergemann N, Rochow N, Radzimski C, Brakopp S, Probst C, Teegen B, Stöcker W, Komorowski L. A Spectrum of Neuronal Autoantigens, Newly Identified by Histo-Immunoprecipitation, Mass Spectrometry, and Recombinant Cell-Based Indirect Immunofluorescence. 2018. *Front Immunol.* 9: 1447

Schwenkenbecher P, Chacko L, Pul R, Sühs K, Wegner F, Wurster U, Stangel M, Skripuletz T. Paraneoplastic cerebellar syndromes associated with antibodies against Purkinje cells. 2018. *Int J Neurosci.* 128(8): 721-728

Soeder BM, Gleissner U, Urbach H, Clusmann H, Elger CE, Vincent A, Bien CG. Causes, presentation and outcome of lesional adult onset mediotemporal lobe epilepsy. 2009. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 80: 894-899

Spatola M and Dalmau J. Seizures and risk of epilepsy in autoimmune and other inflammatory encephalitis. 2017. *Curr Opin Neurol*. 30: 345-353

Spatola M, Petit-Pedrol M, Simabukuro MM, Armangue T, Castro FJ, Artigues MIB, Benique MRJ, Benson L, Gorman M, Felipe A, Oblitas RLC, Rosenfeld MR, Graus F, Dalmau J. Investigations in GABA_A receptor antibody-associated encephalitis. 2017. *Neurology*. 88: 1-9

Thijs RD, Surges R; O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. 2019. *Lancet*. 393(10172): 689-701

Urbach H, Soeder BM, Jeub M, Klockgether T, Meyer B, Bien CG. Serial MRI of limbic encephalitis. 2006. *Neuroradiology*. 48: 380-386

van Loo KMJ, Rummel CK, Pitsch J, Müller JA, Bikbaev AF, Martinez-Chavez E, Blaess S, Dietrich D, Heinen M, Becker AJ, Schoch S. Calcium Channel Subunit Is Regulated by Early Growth Response 1 and Facilitates Epileptogenesis. 2019. *J Neurosci*. 39(17): 3175-3187

van Sonderen A, Thijs RD, Coenders EC, Jiskoot LC, Sanchez E, de Bruijn MAAM, van Coevorden-Hameete MH, Wirtz PW, Schreurs MWJ, Sillevis Smitt PAE, Titulaer MJ. Anti-LGI1 encephalitis: Clinical syndrome and long-term follow-up. 2016. *Neurology*. 87: 1-8

van Sonderen A, Petit-Pedrol M, Dalmau J, Titulaer MJ. The value of LGI1, Caspr2 and voltage-gated potassium channel antibodies in encephalitis. 2017. *Nature Reviews*. 11: 290-301

von Podewils F, Suesse M, Geirhner J, Gaida B, Wang ZI, Lange J, Dressel A, Grothe M, Kessler C, Langner S, Runge U, Bien CG. Prevalence and outcome of late-onset seizures due to autoimmune etiology: A prospective observational population-based cohort study. 2017. *Epilepsia*. 58(9): 1542-1550

Wagner J, Witt JA, Helmstaedter C, Malter MP, Weber B, Elger CE. Automated volumetry of the mesiotemporal structures in antibody-associated limbic encephalitis. 2015. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 86(7): 735-742

Werner C, Pauli M, Doose S, Weishaupt A, Haselmann H, Grünwald B, Sauer M, Heckmann M, Toyka KV, Asan E, Sommer C, Geis C. Human autoantibodies to amphiphysin induce defective presenaptic vesicle dynamics and composition. 2016. *Brain*. 139: 365-379

Zandi MS, Paterson RW, Ellul MA, Jacobson L, Al-Diwani A, Jones JL, Cox AL, Lennox B, Stamelou M, Bhatia KP, Schott JM, Coles AJ, Kullmann DM, Vincent A. Clinical relevance of serum antibodies to extracellular N-methyl-D-aspartate receptor epitopes. 2015. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 86: 708-713

RESEARCH ARTICLE

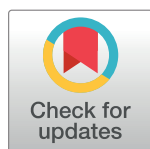
Adult-onset temporal lobe epilepsy suspicious for autoimmune pathogenesis: Autoantibody prevalence and clinical correlates

Julia C. Kuehn¹, Carolin Meschede², Christoph Helmstaedter^{2,3}, Rainer Surges^{2,3}, Randi von Wrede^{2,3}, Elke Hattingen⁴, Hartmut Vatter⁵, Christian E. Elger^{2,3}, Susanne Schoch^{1,2}, Albert J. Becker¹, Julika Pitsch^{1,2}*

1 Section for Translational Epilepsy Research, Dept. of Neuropathology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany, **2** Dept. of Epileptology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany, **3** Center for Rare Diseases Bonn (ZSEB), University Hospital Bonn, Bonn, Germany, **4** Dept. of Neuroradiology, University Clinic of Frankfurt, Frankfurt, Germany, **5** Clinic for Neurosurgery, University Hospital Bonn, Bonn, Germany

☞ These authors contributed equally to this work.

* jpitsch@uni-bonn.de



OPEN ACCESS

Citation: Kuehn JC, Meschede C, Helmstaedter C, Surges R, von Wrede R, Hattingen E, et al. (2020) Adult-onset temporal lobe epilepsy suspicious for autoimmune pathogenesis: Autoantibody prevalence and clinical correlates. *PLoS ONE* 15(10): e0241289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241289>

Editor: Giuseppe Biagini, University of Modena and Reggio Emilia, ITALY

Received: July 9, 2020

Accepted: October 13, 2020

Published: October 29, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241289>

Copyright: © 2020 Kuehn et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Abstract

Temporal lobe adult-onset seizures (TAOS) related to autoimmunity represent an increasingly recognized disease syndrome within the spectrum of epilepsies. In this context, certain autoantibodies (autoABs) were often associated with limbic encephalitis (LE). Here, we aimed to gain insights into (a) the distribution of ‘neurological’ autoABs (neuroABs, defined as autoABs targeting neuronal surface structures or ‘onconeuroal’ ABs or anti-glutamate acid decarboxylase 65 (GAD65) autoABs) in a large consecutive TAOS patient cohort, to characterize (b) clinical profiles of seropositive versus seronegative individuals and to find (c) potential evidence for other autoABs. Blood sera/cerebrospinal fluid (CSF) of TAOS patients (n = 800) and healthy donors (n = 27) were analyzed for neuroABs and screened for other autoABs by indirect immunofluorescence on hippocampal/cerebellar sections and immunoblots of whole brain and synaptosome lysates. Serological results were correlated with clinico-neuropsychological features. 13% of TAOS patients (n = 105) were neuroAB⁺, with anti-GAD65 and anti-N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) as most frequent autoABs in this group. In our screening tests 25% of neuroAB⁻ patients (n = 199) were positive (screening⁺), whereas all control samples were negative (n = 27). Intriguingly, key clinico-neuropsychological characteristics including magnetic resonance imaging (MRI) findings, epileptiform electroencephalographic (EEG) activity, and inflammatory cellular infiltrates in CSF were shared to a greater extent by neuroAB⁺ with neuroAB⁻/screening⁺ patients than with neuroAB⁻/screening⁻ patients. Serological testing in a large consecutive TAOS patient series revealed seropositivity for anti-GAD65 autoABs as the most frequent neuroAB. Intriguingly, neuroAB⁺ individuals were virtually indistinguishable from neuroAB⁻/screening⁺ patients in several major clinical features. In contrast, neuroAB⁻/screening⁻ TAOS patients differed in many parameters. These data support the potential presence of so far unrecognized autoABs in patients with TAOS.

Funding: This work was supported by Else Kröner-Fresenius-Stiftung (2016_A05 to JP, MD-stipend EKFS-Promotionskolleg 'Neuroimmunology' to JCK, AJB), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 1089 to AJB, SS; FOR 2715 to AJB, SPP 1757 to SS) & the BONFOR program (AJB, SS, JP) and a Junior Researcher Group (JP) of the University of Bonn Medical Faculty.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Several neurological syndromes are linked to autoantibodies (autoABs) in serum and/or cerebrospinal fluid (CSF) targeting different proteins [1, 2]. These include the disease spectrum of limbic encephalitis (LE), the definition of which encompasses temporal lobe seizures, subacute early adult-onset memory impairment and/or affective disturbances [3–6]. Clinical findings in LE are associated with characteristic magnetic resonance imaging (MRI) changes involving amygdaloid and hippocampal structures as well as a range of neuropathological alterations comprising lymphocytic inflammation of limbic structures and hippocampal sclerosis (HS) [7].

LE variants relate to the presence of specific autoABs in serum and/or CSF [8] and can develop as paraneoplastic [9] or non-paraneoplastic conditions [10, 11]. LE-patients are stratified according to the presence of non-paraneoplastic autoABs directed against neuronal surface structures involving N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs), voltage-gated potassium channel complex (VGKC) components including Leucine-rich glioma inactivated 1 (LG1) and Contactin associated protein 2 (CASPR2), A-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) and C-aminobutyric acid receptor A/B (GABA_{A/B}Rs) [11–16]. Onco-neuronal autoABs include anti-amphiphysin, -CV2 and -PNMA2 (Ma2/Ta; paraneoplastic antigen Ma2) autoABs [17]. Anti-glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) autoABs occur in a generally non-paraneoplastic condition and target intracellular protein structures [18].

The criteria of 'limbic syndrome' have been recently defined in a strict manner [19]. Compared to patient cohorts from general neurological or neuro-oncological institutions studied for autoAB-related encephalitis, tertiary epileptology centers are subject to a different patient series selection bias. Epileptologists are mainly confronted with adult patients presenting difficult to explain new onset temporal lobe epilepsies as leading symptom. Those patients share many, but not all features of what currently is declared as essential for the diagnosis of LE. Here, we report on a large consecutive series of patients newly referred to a large Epilepsy Center over more than three years suffering from temporal lobe adult-onset seizures (TAOS) with clinical findings suggestive of an autoimmune origin. Compared to previous studies on ABs in highly selected epilepsy patient cohorts [20–23], here, we have assessed for the first time the clinical results in a patient group, in which the presence of autoABs is suspected but has not been identified yet, and compared this group to patients positive for 'neuroABs'.

Materials and methods

Patients, serum and CSF samples

Biofluids of 800 patients with TAOS (youngest patient included was 18 years of age), presented in the Department of Epileptology, University Hospital Bonn, a tertiary epilepsy centre (visited by ~1000 inpatients and ~5000 outpatients per year), between 11/2013 and 12/2016, were included in this study. We only included patients in this study, which fulfilled the following criteria: (a) temporal lobe seizures of unknown etiology with onset in adulthood and (b) at least one other feature predicting autoimmune caused epilepsy including impaired episodic memory, substantial affective disturbances, characteristic MRI and/or CSF changes.

With respect to relevant MRI changes, a large fraction of patients showed otherwise unexplained medio-temporal Fluid-attenuate inversion recovery (FLAIR)/T2 signal increase and/or increased volume in mesial structures of one or both temporal lobes [19]. 966 serum and 434 CSF samples were analyzed. For TAOS patients with repetitive tests at our center, the biological sample with the highest autoAB titer has been considered in this study. Serological testing comprised established diagnostic procedures as well as additional tests for other autoAB than previously known neuroABs. Initially, sera/CSF-samples were tested for neuroABs using cell-based

assays as well as immunoblots described elsewhere in detail [19]. Furthermore, we developed an integrated screening paradigm that combined immunoblotting and indirect immunofluorescence tests (IIFT) in order to scrutinize for the presence of further autoABs. Serum samples from 27 healthy donors (male: $n = 13$; female: $n = 14$; mean age: 34 years \pm 10.6 SD) were used as controls. All control samples were handled and tested parallel to the patient biosamples. Sera from four healthy controls that showed reactivity to HEp2 cell assays indicating the presence of anti-nuclear antibodies (ANA) were excluded from further analysis as these autoantibodies are apparently not relevant to LE since in these individuals any neurological symptoms are lacking. Positive and negative controls for commercial assays were provided by the manufacturer.

Ethics statement

All procedures were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Ethical Commission of University Hospital Bonn (222/16). Informed written consent was obtained from every patient. We strictly adhered to the legal provisions governing the admissibility of the handling of personal data.

Collection of clinical data

Relevant clinical information was extracted from medical reports. Clinical data of three groups was collected retrospectively. Prior to further analysis, all personal data was anonymized. We analyzed patients (a) seropositive for neuroAB (neuroAB⁺), (b) seronegative for well-known neuroABs at the time point of data collection but with positive results in either one screening test pointing to potentially novel autoABs (neuroAB⁻/screening⁺) and (c) entirely seronegative for autoAB (neuroAB⁻/screening⁻). With respect to MRI alterations, patients were stratified according to changes suspicious for LE including mesio-temporal volume and/or FLAIR/T2 signal increase [19, 24], hippocampal sclerosis (HS) [25] and “other lesions” comprising cavernoma, cortical atrophy, arachnoid cyst or vascular lesions. All MRI images were reviewed by an experienced neuro-radiologist. Patients with electroencephalographic (EEG) analyses revealing a defined focus at least at one time point were classified as ‘EEG focus’-positive. Lateralization of this focus was included in the analyses. The seizure type was classified by an experienced epileptologist according to the recent classification of the International League Against Epilepsy (ILAE) [26]. Inflammatory CSF parameters comprised elevated protein level (>400 mg/l), pleocytosis (>5 cells/ μ l) as well as oligoclonal bands (OCB) or intrathecal Immunoglobulin G (IgG) synthesis (according to the ‘Reiber scheme’). Memory impairment was assessed by standardized neuropsychological tests of the verbal and figural memory described elsewhere in detail [27] conducted by psychologists of the Department of Epileptology. Values one standard deviation below average were classified as memory impairment.

Detailed information concerning comorbidities including autoimmune disorders, malignancies, psychosis, motoric symptoms as well as depression were retrospectively collected from clinical reports psychosis comprised symptoms of delusion, significant impairment of perception and/or ‘ego’-disturbances according to the ‘ADMP’-system. In order to define depression, the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (ICD10) F32 criteria were applied as standard. Motor symptoms unrelated to seizures included stiff-person-syndrome, neuromyotonia, ataxia and spasticity.

Semiquantitative immunoblotting and cell-based indirect immunofluorescence tests for neuroABs

Using commercial diagnostic kits for, all analyzed serum and CSF samples were screened for neuroABs known to be associated with LE or other neuroimmunological syndromes. In detail,

we tested for ‘onconeural’ autoABs against Amphiphysin, CV2, PNMA2 (Ma2/Ta; paraneoplastic antigen Ma2), Ri, Yo, Hu, Recoverin, SOX1, Titin, Zic4 (Zinc finger protein Zic4), GAD65 (Glutamate acid decarboxylase 65) and Tr (DNER) using semiquantitative immunoblots according to the manufacturer’s guidelines (EUROLINE PNS 12, Euroimmun, DL 1111-1601-7 G) coated with recombinant antigen or antigen fragments with serum diluted 1:100 and CSF 1:1 (sensitivity: 89–100%; specificity: 99%, according to the manufacturer’s specifications). Complementarily, indirect immunofluorescence was performed using on HEK293T-cells (Human Embryonic Kidney 293) overexpressing of the individual antigens on the cell-surface (IIFT: ‘Autoimmune-Enzephalitis-Mosaik1’, Euroimmun, FA 1120-1005-1; GAD65-IIFT, Euroimmun, FA 1022-1005-50) for anti-NMDAR, anti-CASPR2, anti-LGI1, anti-GABA_AR, anti-GABA_BR, anti-AMPA and anti-GAD65 autoABs (dilution: serum 1:10; CSF 1:1) following the manufacturer’s protocol (sensitivity: 82–100%; specificity: 98,3–100%, according to the manufacturer’s specifications). The evaluator was blinded to the particular clinical phenotype. A positive result in one of the commercial assays was sufficient to classify the patient seropositive for neuroAB. NeuroABs with targets previously described as relevant in other neuroimmunological syndromes including myasthenia (anti-Titin) or retinopathy (anti-Recoverin) [28, 29] were excluded from our analyses.

Screening for potentially novel autoABs in sera/CSF

In parallel to the analyses outlined above, we have established a screening approach for the presence of novel autoABs using immunoblots. To this end, lysates of rat and mouse brain extracts, of human hippocampal tissue from pharmacoresistant temporal lobe epilepsy (TLE) patients undergoing epilepsy surgery for seizure relief [30] and of murine crude synaptosomes (see [S1 File](#)) were prepared, separated by electrophoresis and blotted. After blocking [2% bovine serum albumin (BSA), 2% fetal calf serum (FCS), 0.2% cold water fish gelatin in phosphate-buffered saline (PBS)], blots were incubated with patient’s serum (1:500) or CSF (1:100) in a total volume of 7 ml overnight, washed with PBS with Tween 20 (PBST), incubated with goat anti-human IRDye 800CW (Odyssey, 926–32232) for 45 minutes and imaged with the Odyssey Imaging System (LI-COR) after another washing step.

For corresponding IIFT screenings, we used a custom-made biochip-based-assay (IIFT: ‘Neurologie-Mosaik28’, Euroimmun, FA 111-1005-28) including rat and simiiform slices of cerebellum and hippocampus in order to screen for binding patterns of potential autoABs to neuronal tissue (dilution: serum 1:10, CSF 1:1) according to the manufacturer protocol. The custom-made assays were only available after the first 295 biosamples of the present series. These samples have already been analyzed by a highly similar approach relying on permeabilized human hippocampal, rat forebrain and cerebellar 10 μm sections (see [S1 File](#)). All sera suspicious for autoAB binding in one of the screening assays were subsequently tested on HEp2 (Human epithelioma 2)-cell-assays (IIFT: HEp2; Euroimmun; FA 1520–1005) for reactivity with non-neuronal antigens (dilution 1:100) according to the manufacturer’s instructions. Images of the IIFT assays were taken with an epifluorescence microscope (Observer.A1; Zeiss). All immunoblots and IIFT-assays were analyzed by an experienced examiner (AJB).

Statistical analysis

Statistical comparisons with respect to individual clinical features (categorical variables) between neuroAB⁺, neuroAB⁻/screening⁺, neuroAB⁻/screening⁻ and healthy controls were performed using Chi-square test or Fisher’s exact test (GraphPad Prism, Version 6.07, GraphPad Software, Inc.). P-values were adjusted by Bonferroni correction (Microsoft Excel 2010). Values were considered significantly at p<0.05. Power-analysis was carried out using the g-power

software. All clinical parameters to be examined were determined prior to data acquisition and statistical testing.

Results

Distribution of neuroABs in TAOS patients

We analyzed 1400 biological samples of 800 TAOS patients (male: $n = 402$; female: $n = 398$; mean age: $44.5 \text{ years} \pm 16 \text{ SD}$) collected during a time period of three years (11/2013-12/2016). In 13% of all patients at least one neuroAB was detected (neuroAB⁺). 23.8% of these patients had neuroABs targeting cell-surface associated antigens including NMDAR with the highest prevalence (16.2%) as well as LGI (4.8%) or CASPR2 (2.9%; Table 1, Fig 1A). NeuroABs against intracellular GAD65 were detected in 46.7% of all neuroAB⁺ patients representing the highest prevalence within the spectrum of all neuroABs (Table 1). 55.1% of these anti-GAD65 autoAB positive patients had high titers ($\geq 1:100$) representing 25.7% of all neuroAB⁺ patients (Fig 1A). 29.5% of neuroAB⁺ patients were positive for neuroABs with reactivity to other intracellular antigens including amphiphysin, CV2, Ma2/Ta and SOX1. We detected five anti-Yo and three anti-Zic4 autoAB positive patients in the present series; all of them presented focal impaired awareness seizures (up to five per day) and only one patient had a mild ataxic gait in addition to seizures. Five of them had imaging findings showing the involvement of mesio-temporal structures. The majority of sera (31 out of 32) from patients with neuroABs had been detected in CSF was also tested positive. We detected only one exception, i.e. an anti-Ri autoAB patient was only CSF-positive. None of the control sera showed evidence for the presence of neuroABs.

Hippocampus and cerebellum-based IIFT screening in neuroAB- TAOS patients. 62% of all patients were seronegative for neuroABs and did not show any reactivity in screening assays, neither IIFT nor immunoblots (neuroAB⁻/screening⁻). IIFTs revealed binding patterns in 18.5% (122 out of 661) of neuroAB⁻ patients' biomaterial (Fig 1B and 1C). This observation suggests that autoABs distinct from neuroABs might be present in CSF or serum samples of

Table 1. Presence and distribution of neuroABs in 800 TAOS patients.

Target	Patients	Percentage ^a	Age ^b limbic (mean \pm SD)	Sex (m:f)	CSF ^c	Titer Serum ^d	Titer CSF ^d
LGI1	5	4.76%	60.8 \pm 13.55	4:1	1/3	1:10–1:320	1:10
CASPR	3	2.86%	51 \pm 5.72	1:2	1/1	1:10–1:1000	1:1
NMDAR	17	16.19%	41.24 \pm 13.5	4:13	2/11	1:10–1:320	1:10
Amphi-physin	3	2.86%	38.33 \pm 23.44	0:3	0	+	-
CV2	2	1.90%	30 \pm 9.89	2:0	0	+	-
Ma2/Ta	12	11.43%	45.83 \pm 15.78	4:8	5/8	+	(+)
Ri	2	1.89%	47.5 \pm 2.12	1:1	1/1	+	+
SOX1	4	3.81%	47 \pm 21.18	1:3	1/2	+	+
Yo	5	4.76%	52.8 \pm 19.79	2:3	0	+	-
Zic4	3	2.86%	61 \pm 13.75	2:1	1/1	++	+++
GAD 65	49	46.67%	44.06 \pm 16.12	18:31	20/30	1:10–1:3200	1:1–1:100

SD = standard deviation; m = male; f = female; Metric variables are given as mean values; non-metric data are presented as medians.

^a Percentage of neuroAB⁺ patients ($n = 105$).

^b Age (years) at diagnosis

^c number of positively tested CSF samples of all tested CSF samples which were available in parallel to sera

^d range of titers, lowest titer considered positive was 1:10 for serum and 1:1 for CSF, semiquantitative analyses of immunoblots range from (+) = marginal positive, + = positive, ++ = strongly positive to +++ = extremely positive.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241289.t001>

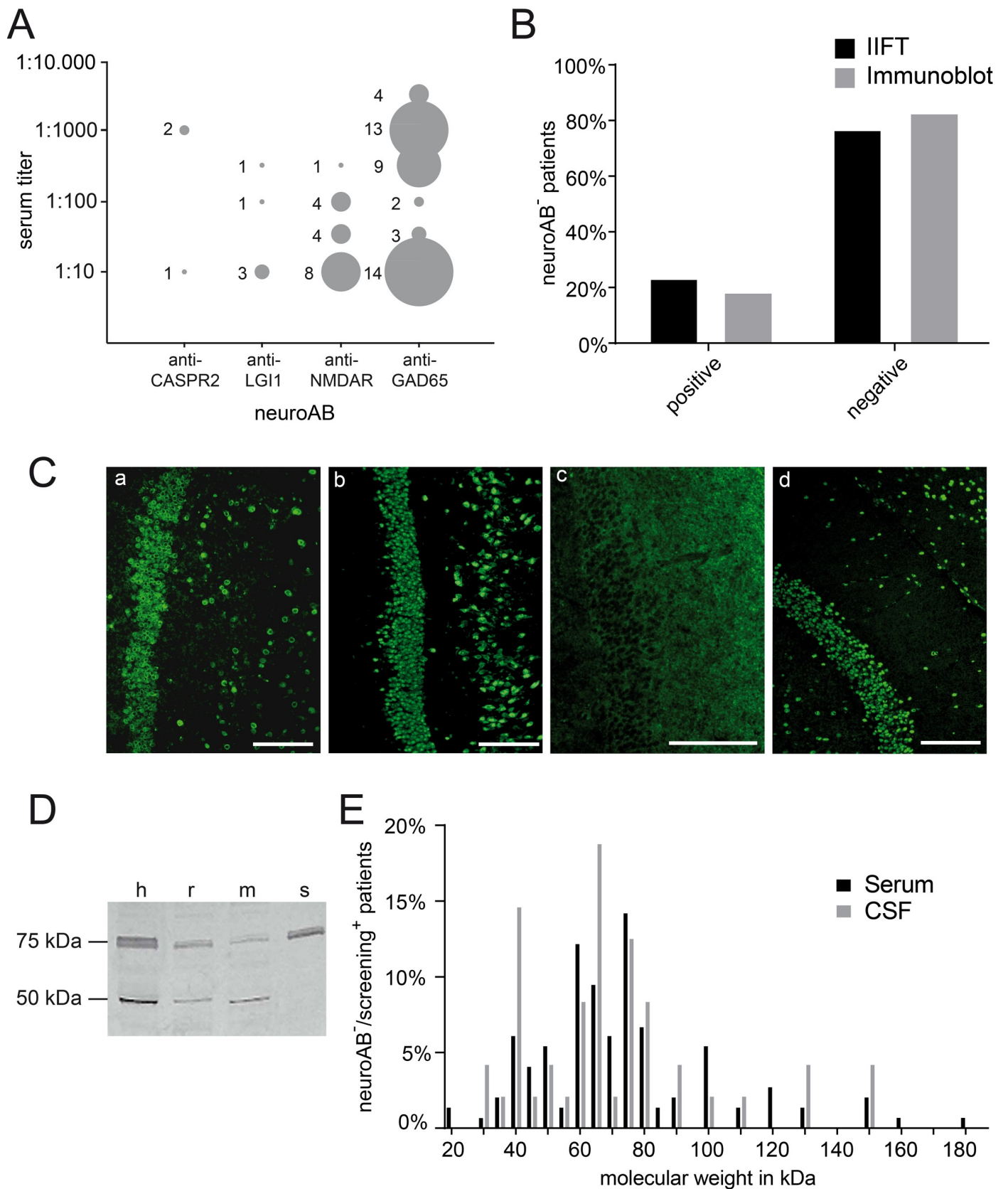


Fig 1. Representative indirect immunofluorescence Test (IIFT) and immunoblotting results. (A) Distribution of autoAB titers in neuroAB⁺ patients. Circle sizes are proportional to the number of patients with the respective titres (1:10, 1:32, 1:100, 1:320, 1:1000 or 1:3200). (B) ~20% of neuroAB⁻ patients are positive either with immunoblot and/or IIFT screening indicating the presence for so far unknown autoABs. (C) Binding patterns of serum samples of neuroAB⁻ patients on representative simiiform hippocampal sections: (a) neuronal cytoplasmatic (b) general neuronal (c) neuropil and (d) neuronal nuclear binding pattern (all scale bars: 100 μ m). (D) Representative immunoblot of serum from a neuroAB⁻ patient. Reactivity with lysate of brain from different species is illustrated (h = human, r = rat, m = mouse, s = murine synaptosomes). Two bands (75 kDa and 50 kDa) occur in human, rat and mouse brain lysates. The synaptic fraction shows a band at 75 kDa but not at 50 kDa identifying the putative autoAB-target within the 75 kDa band as component of the synaptic compartment. (E) Distribution of the molecular weight of bands observed in immunoblots of neuroAB⁻/screening⁺ patients' sera and CSF samples. Note the clustering of bands in the 40–80 kDa range (serum: n = 145, CSF: n = 47).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241289.g001>

these TAOS patients. In 12 patients only CSF samples but not the corresponding sera were IIFT positive. This finding may be in line with an intrathecal synthesis of immunoglobulins. Many patients had a similar IIFT pattern in paired serum and CSF samples. The IIFT pattern was distinguished in neuropil (n = 36), general neuronal (n = 44), and neuronal nuclear versus cytoplasmatic (n = 21, each) binding patterns of serum/CSF samples (Fig 1C a-d). Most of the patients' biomaterial showed specific reactivity in limbic structures (50.4% of samples were IIFT-positive *only* in hippocampal tissue); positivity in both, cerebellum *and* hippocampus, was less frequent (24.6% of all IIFT-positive samples). None of the control sera were positive in the IIFT screening test.

Whole brain and synaptosome based immunoblot screening in neuroAB⁻ TAOS patients. Complementarily, we analyzed 876 sera and 310 CSF samples of 662 neuroAB⁻ patients by immunoblotting. In biological samples of 100 neuroAB⁻ TAOS patients at least one additional band was detected compared to control serum samples (Fig 1B). In 88% of these blots the patient specific additional band was found in the mouse synaptosome lysate, suggesting the presence of autoABs targeting synaptic molecules (rightmost lane, Fig 1D). More than 53% of the corresponding CSF samples paralleled the positive findings in sera. For 73% of sera with reactivity in the immunoblot screening the signal was observed in the human hippocampal lysate (leftmost lane, Fig 1D).

The molecular weight of the majority of proteins revealed by incubation with patient sera was in the ranges of 40–80 kDa (Fig 1E). Two or more patient specific bands in immunoblots were present in sera of 10% of neuroAB⁻ TAOS patients positive in immunoblot screening. In contrast, in CSF samples multiple bands occurred only in 2%. Most bands detected after incubation with CSF exhibited a similar size spectrum (Fig 1E). 28.6% (n = 199) neuroAB⁻ TAOS patients were positive in one screening test, either IIFT or immunoblot (neuroAB⁻/screening⁺ patients). 12% of these 199 patients revealed positive results in *both* screening assays. Immunoblotting as well as IIFT screenings serologically distinguished controls from neuroAB⁺ patients (see S1 Fig; healthy donors n = 27, neuroAB⁺ patients n = 105, Fisher's exact test: immunoblot: ***p < 0.0001; IIFT: ***p < 0.0001). Additionally, none of the control samples was positive in the immunoblot screening test.

Sera from patients with positive test results in one of the above mentioned screening assays were examined by immunofluorescence of non-neuronal cells (HEp2-cells) to identify antibodies against ubiquitously expressed proteins. In those patients, the seroprevalence of antibodies binding HEp2-cells was 44.6%. The prevalence of a positive assay did not differ among the groups of neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁺ patients (44.4% vs. 44.7%, neuroAB⁺: n = 72, neuroAB⁻/screening⁺: n = 172; chi square test group comparison: p = 0.766). 42.3% of sera from patients with positive results in the immunoblot screening and 50.5% of patients with positive results in the IIFT showed HEp2-cell reactivity.

Correlation of clinico-pathological and serological findings in TAOS patients. All patients of the present series had a disease onset in adult life defined by temporal lobe seizures and at least one of the following features including (a) disturbance of memory, (b) affective

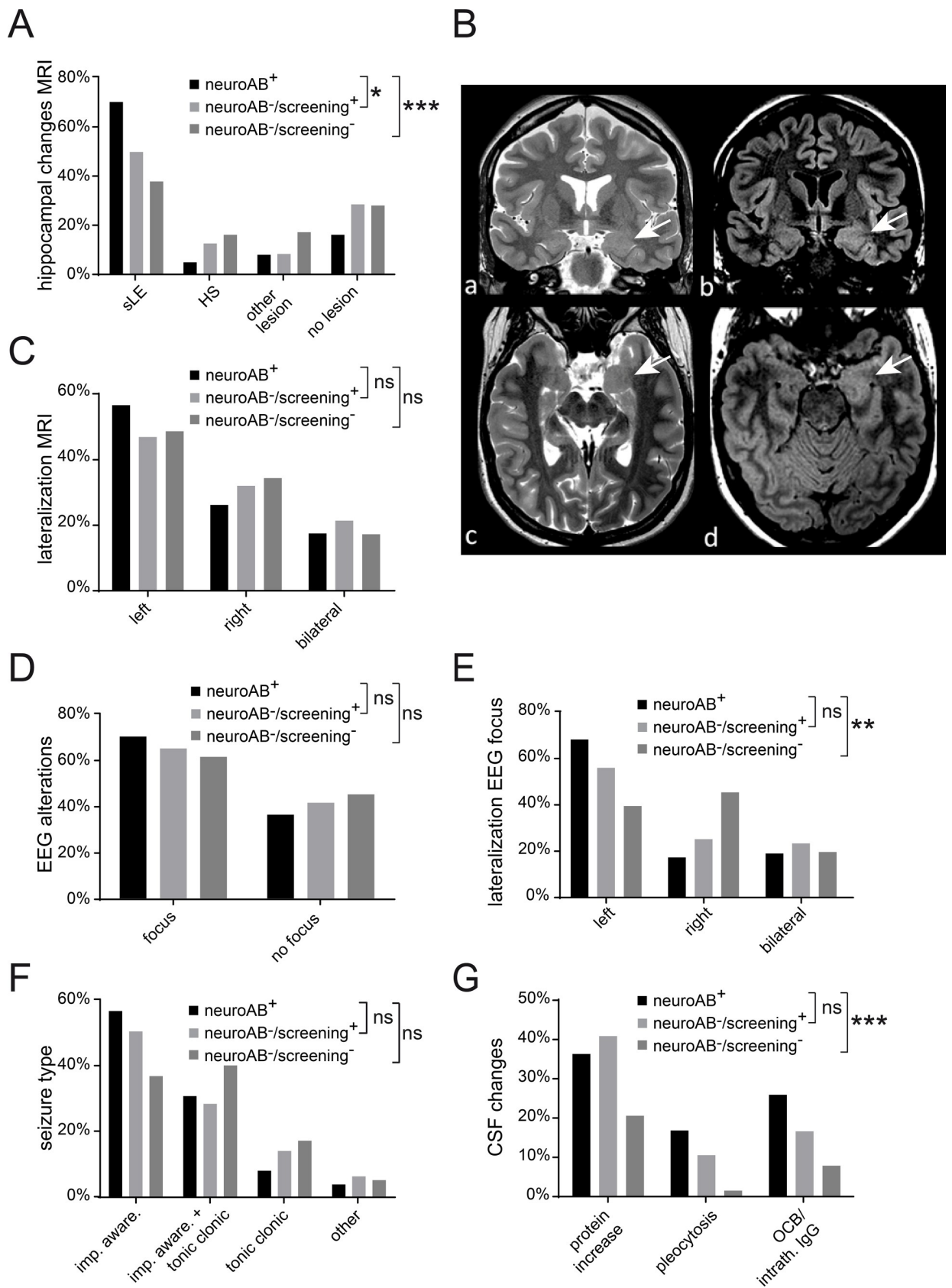


Fig 2. Imaging, semiological and serological parameters of TAOS patients stratified according to autoAB-test status. (A) NeuroAB⁺ patients have substantially more frequent LE suspicious MRI changes (sLE) comprising signs of edema in amygdala and hippocampus than neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁺ patients (Chi-square-test group comparison: * $p < 0.025$; *** $p < 0.0005$; neuroAB⁺ $n = 98$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 94$, neuroAB⁻/screening⁻ $n = 92$). (B) Representative MRI in a patient with limbic encephalitis and anti-GAD65 autoAB. Coronal T2-weighted MRI (a) and FLAIR (b) shows swelling and signal increase of the left hippocampus (see white arrows) compared to the contralateral hippocampus. The temporal angulated axial T2-weight image (c) and the axial FLAIR (d, ac-pc angulation) confirms the increase in volume and size of the left compared to the right hippocampus (see white arrows). (C) The lateralization of MRI changes does not differ between neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁺ (Chi-square-test group comparison: $p = 0.589$) or neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁻ (Chi-square-test group comparison: $p = 0.79$; neuroAB⁺ $n = 69$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 47$, neuroAB⁻ $n = 35$). (D) In most of the patients an EEG focus is detectable with no significant differences between the neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁺ (Chi-square-test group comparison: $p = 0.544$) or neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁻ (Chi-square-test group comparison: $p = 0.288$; neuroAB⁺ $n = 91$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 95$, neuroAB⁻/screening⁻ $n = 92$). (E) A difference concerning affected hemisphere is observed in neuroAB⁺ patients compared to neuroAB⁻/screening⁻ patients (Chi-square-test group comparison: ** $p < 0.005$) but not between neuroAB⁺ patients and neuroAB⁻/screening⁺ (Chi-square-test group comparison: $p = 0.424$; neuroAB⁺ $n = 60$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 60$, neuroAB⁻/screening⁻ $n = 53$). (F) Most neuroAB⁺ patients have focal impaired awareness seizures in some patients also focal to bilateral tonic clonic seizures occur (Chi-square-test group comparison: neuroAB⁺ compared to neuroAB⁻/screening⁺ $p = 0.477$; neuroAB⁺ compared to neuroAB⁻/screening⁻ $p = 0.039$; neuroAB⁺ $n = 97$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 91$, neuroAB⁻/screening⁻ $n = 92$). (G) In comparison to neuroAB⁺ patients typical CSF changes [elevated protein level (protein increase), pleocytosis, oligoclonal bands and intrathecal IgG synthesis (intrath. IgG)] are present in a similar frequency in neuroAB⁻/screening⁺ patients (Chi-square-test group comparison: $p = 0.866$). In contrast neuroAB⁻/screening⁻ patients have significantly less inflammatory CSF changes (Chi-square-test group comparison: *** $p < 0.0005$; neuroAB⁺ $n = 77$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 66$, neuroAB⁻/screening⁻ $n = 63$). sLE—limbic encephalitis suspicious, HS—hippocampal sclerosis, imp. aware—impaired awareness, OCB—oligoclonal bands.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241289.g002>

disturbances, or (c) characteristic temporal findings on MRI or in CSF. The time from symptom-onset to the detection of a specific neuroAB was 6.3 ± 8 SD years. This parameter strongly differed among the different neuroAB⁺ subgroups. Whereas all anti-LGI1 or anti-CASPR2 autoAB positive patients were diagnosed within the first year, patients with anti-GAD65 autoABs experienced substantially longer delays (6.1 ± 5 SD years). The time period between the onset of symptoms and the testing for neuroABs was 7.9 ± 10 SD years in neuroAB⁻/screening⁺ patients and 9.7 ± 10 SD years in neuroAB⁻/screening⁻ patients. In this time period temporal lobe epilepsy with no obvious cause was diagnosed in the majority of these patients (neuroAB⁻/screening⁺: 58%; neuroAB⁻/screening⁻: 68%).

In approximately 70% of neuroAB⁺ TAOS patients, characteristic MRI alterations were present including increased volume and T2-signal intensity of the mesio-temporal structures (representative MRI scan in Fig 2B), but the presence differed significantly between the groups (Chi-square-test group comparison: * $p < 0.025$; *** $p < 0.0005$). Whereas limbic encephalitis suspicious (sLE) MRI findings comprising signs of edema in amygdala and hippocampus were substantially less frequent in neuroAB⁻/screening⁺ and neuroAB⁻/screening⁻ patients, HS was more frequent in the two latter groups than in neuroAB⁺ patients (Fig 2A). No differences were found with respect to MRI-lateralization (Fig 2C) as well as the presence of an EEG focus (Fig 2D). However, the lateralization analysis of EEG alterations revealed a significant difference between neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁻ patients (Fig 2E, Chi-square-test group comparison: ** $p < 0.005$). Semiologically, most neuroAB⁺ patients suffered from focal seizures. With respect to seizure types no differences were found between the groups (Fig 2F). In CSF pleocytosis, oligoclonal bands (OCB), and intrathecal IgG synthesis was substantially more frequent in neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁺ patients compared to neuroAB⁻ individuals (Fig 2G, Chi-square-test group comparison: *** $p < 0.0005$).

Most patients of the present series (70.7%) had memory impairment based on standardized neuropsychological testing (Fig 3A). In neuropsychological tests of figural as well as verbal memory, no lateralization predominance of cognitive impairment was present. Nevertheless, these tests were overall below the average of healthy individuals in all groups of patients. A subset of neuroAB⁺ patients (34.3%) suffered from neuropsychiatric impairment including psychosis (Fig 3B), depression (Fig 3C), or motoric disorders (Fig 3D). NeuroAB⁻/screening⁻ patients were significantly less affected from motor impairment than neuroAB⁺ individuals

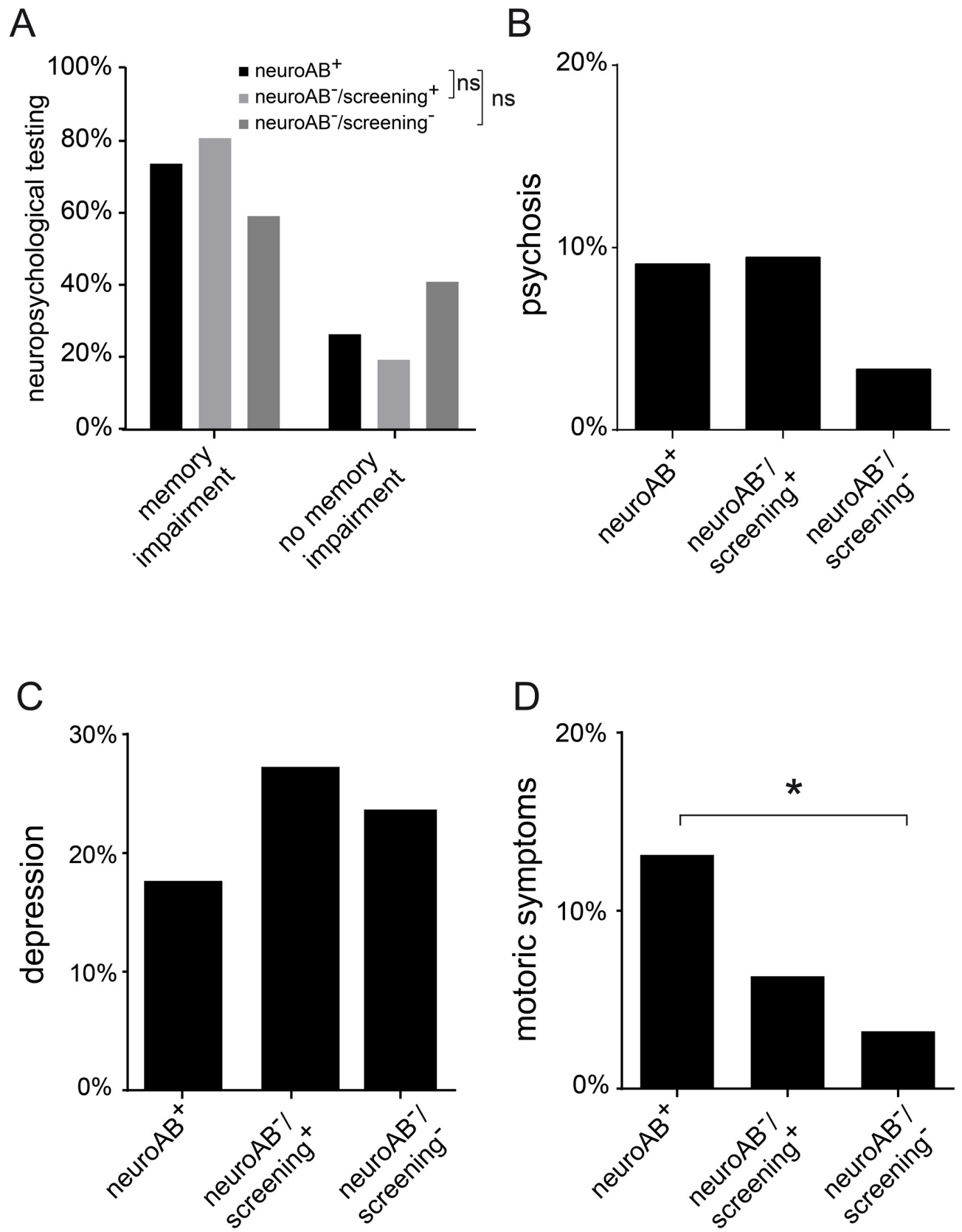


Fig 3. Neurological and psychiatric co-morbidities in TAOS patients. (A) Memory disturbance, i.e. neuropsychological test results below average, is a common feature throughout the patients stratified according to the serological status with no significant differences between the groups (Chi-square-test group comparison: neuroAB⁺ compared to neuroAB⁻/screening⁺ $p = 0.284$; neuroAB⁺ compared to neuroAB⁻/screening⁻ $p = 0.044$ neuroAB⁺ $n = 95$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 78$, neuroAB⁻/screening⁻ $n = 93$) (B, C) Remarkably, psychosis and depression are not substantially different in frequency between the three groups of patients (Chi-square-test group comparison: psychosis: neuroAB⁺ compared to neuroAB⁻/screening⁺ $p = 1$; neuroAB⁺ compared to neuroAB⁻/screening⁻ $p = 0.136$ / depression: neuroAB⁺ compared to neuroAB⁻/screening⁺ $p = 0.461$; neuroAB⁺ compared to neuroAB⁻/screening⁻ $p = 0.209$; neuroAB⁺ $n = 99$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 95$, neuroAB⁻/screening⁻ $n = 93$). (D) In contrast, motoric symptoms are substantially more abundant in neuroAB⁺ than in neuroAB⁻/screening⁻ patients (Chi-square-test group comparison: $*p < 0.025$). No significant differences in the presence of these symptoms are discovered between the neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁺ group (Chi-square-test group comparison: $p = 0.147$; neuroAB⁺ $n = 99$, neuroAB⁻/screening⁺ $n = 95$, neuroAB⁻/screening⁻ $n = 93$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241289.g003>

(Chi-square-test group comparison: $*p < 0.025$), whereas neuroAB⁻/screening⁺ patients were similar to the neuroAB⁺ patients (Fig 3D).

With respect to systemic disorders in the present series of TAOS patients, we focused on the presence of general autoimmune syndromes as well as neoplastic disorders. Intriguingly, systemic autoimmunity was more abundant than neoplastic disorders (Fig 4A) with a significant abundance for the neuroAB⁺ group (Fisher's exact test: $*p < 0.016$). The frequency of tumors was similar in patients with onconeural autoABs (13.3%; $n = 4$) and patients with autoABs against neuronal surface proteins (12%; $n = 3$; Fig 4A). Malignant tumors of different entities were observed in all analyzed groups (Table 2). We found an association with additional extracerebral autoimmune-mediated syndromes including autoimmune thyroiditis, chronic inflammatory bowel diseases and collagenosis/chronic polyarthritis (Fig 4B).

Discussion

In this study we investigated the presence of established neuroABs and screened for the potential incidence of novel autoABs in patients with TAOS of suspected autoimmune pathogenesis but no presence of known neuroABs. So far, studies with a focus related to our present approach have put emphasis on the prevalence of established 'neurological' autoABs related to different, utmost important clinical aspects including new or established epilepsy. Whereas only patients fulfilling a battery of clinico-serological criteria were included in former series [6, 19, 22, 31, 32], the common clinical denominator of our present study is given by adult onset seizures that represent a vigorous clinical challenge for epileptologists. Nevertheless, there are forms of TLE which do not need to be tested for autoABs. Those include patients in which TLE can be clearly linked to by causes not related to autoimmune mechanisms including tumors or cortical dysplasias in the temporal lobe.

Our present study goes beyond serological testing for 'neurological' ABs by analyzing neuroAB negative patients but screening positive for autoABs putatively targeted against not yet characterized protein structures. The use of additional screening tests (IIFT / immunoblots) may be regarded supportive and complementary to specific autoAB tests in individuals with clinical characteristics of possible autoimmune encephalitis seropositive in screening assays but negative for specific neuronal or onconeural autoABs with the perspective to define new forms of autoAB related (limbic) encephalitis [19]. Recently, this strategy has led to the observation of a novel autoAB targeting the intracellular dendritic spine scaffolding protein Drebrin in so far neuroAB⁻/screening⁺ patients [33].

Individual autoABs have been analyzed in depth for sensitivity with respect to the particular type of biofluid, i.e. serum or CSF. In particular, for anti-NMDAR autoABs it has been demonstrated that there is higher 'clinical sensitivity' in CSF than in serum. Generally, antibody titers in CSF and serum were reported as higher in patients with poor outcome or teratoma than in patients with good outcome or no tumor. Intriguingly, titer change in CSF more closely reflected relapses than one in sera [34].

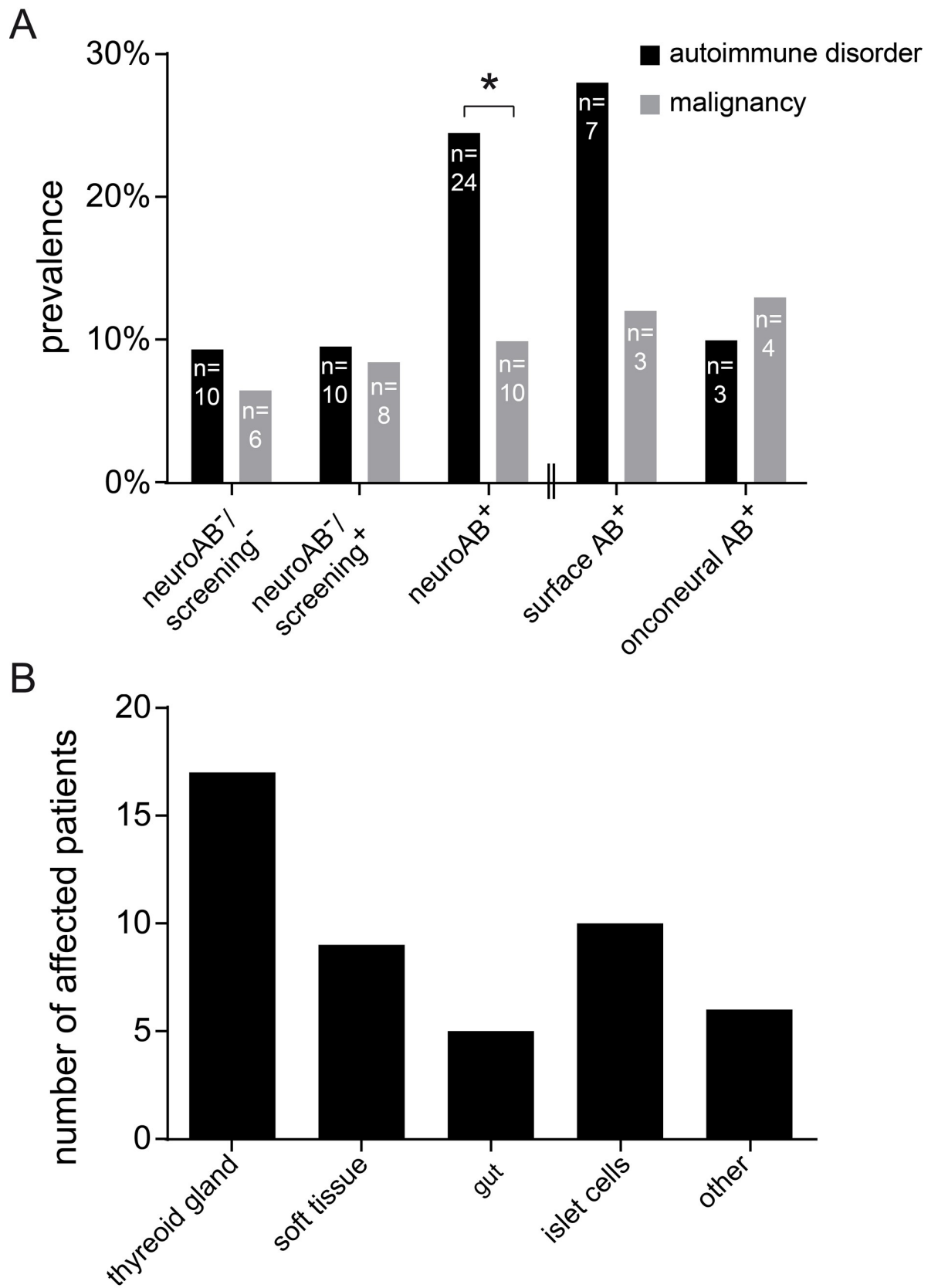


Fig 4. Co-morbidities of TAOS patients. (A) Systemic autoimmune syndromes are more abundant than neoplasia in all groups. The neuroAB⁺ group has significant more autoimmune syndromes compared to neoplasia of different entities (Fisher's exact test: * $p < 0.016$; neuroAB⁺ $n = 101$). This difference in abundance is not significant in the neuroAB⁻/screening⁻ or neuroAB⁻/screening⁺ group (Fisher's exact test: neuroAB⁻/screening⁺ patients: $p = 0.805$, $n = 95$; neuroAB⁻/screening⁻ patients: $p = 0.434$, $n = 93$). No significant difference is present comparing co-morbidities of seropositive patients with autoABs targeting neuronal surface structures to patients with onconeural autoABs (Fisher's exact test: $p = 0.393$; surface AB⁺ $n = 25$, onconeural AB⁺ $n = 30$). (B) Systemic autoimmunity comprises thyroiditis as most abundant disorder followed by chronic inflammatory bowel disease, collagenosis/chronic polyarthritis and diabetes mellitus type 1 as well as individual autoimmune disorders grouped under 'other' (overall $n = 47$ affected patients).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241289.g004>

In the context of previous studies, two large epilepsy cohorts with either established or newly diagnosed untreated epilepsy were compared regarding the prevalence of key neurological autoABs in adult patients [20]. 11% of these patients had autoABs and such targeting VGKC complex proteins were most abundant (5%). As the data of Brenner and colleagues [20] as well as our present data were collected from patients referred to a tertiary center, it cannot be ruled out that the influence of certain selection biases influences the distribution of individual neuroABs in different cohorts. Nevertheless, the previously described significantly higher prevalence of anti-GAD65 autoABs in TLE in comparison to other seizure syndromes [35] is well in line with the higher prevalence of these autoABs in our study focusing solely on TAOS patients. Moreover, Dubey et al. reported on a higher prevalence for autoABs against VGKC complex molecular structures in a series of 112 epilepsy patients with recent onset or unknown etiology [36], which may be due to differences in patient cohorts.

In limbic encephalitis, the autoAB spectrum comprises 'onconeural' ABs including amphiphysin (anti-AMPH), BMP binding endothelial regulator (anti-BMPER; anti-CV2), paraneoplastic Ma antigen 2 (anti-Ma2; anti-PNMA2) as well as further anti-glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65)9, all of them targeted against intracellular protein structures. GAD65 as molecule with intracellular localization as well as the neuropathological observation of an admixture of neurodegenerative changes with invasion of T-lymphocytes in the biopsy tissue of patients [18] may suggest analogies of the present disease pattern with paraneoplastic neurological syndromes. Within our current patient cohort, anti-Ma2/Ta autoAB positive patients had the highest prevalence within the 'onconeural' autoAB-positive group of patients. Here, specific onconeural antigens including Ta/M proteins are expressed constitutively in neurons and ectopically in the associated tumors. In brain lesions, neurodegeneration is accompanied by perivascular infiltrates constituted of CD4⁺ T-cells and B-cells, whereas CD8⁺ T-cells predominate within the CNS parenchyma [37, 38]. Purely onco-

Table 2. Distribution of malignancies in TAOS patients.

Group	Patients ^a	Malignancy
Anti-LGI1-autoAB	1/5	colorectal carcinoma
Anti-NMDAR-autoAB	2/17	colorectal carcinoma, medulloblastoma, basal cell carcinoma
Anti-Ma2/Ta-autoAB	2/12	ALL, acini cell carcinoma
Anti-Yo-autoAB	1/5	breast cancer
Anti-Zic4-autoAB	1/3	AML, prostate carcinoma
Anti-GAD65-autoAB	3/49	breast cancer, cervical carcinoma, multiple myeloma
neuroAB ⁻ /screening ⁺	9/95	breast cancer, multiple myeloma, ALL, bladder cancer, oesophageal cancer, neuroendocrine tumour, oligoastrocytoma, astrocytoma
neuroAB ⁻ /screening ⁻	6/93	breast cancer, prostate carcinoma, Hodgkin lymphoma, renal cell carcinoma, glioblastoma multiforme

^a number of patients affected by malignancies in relation to total number of patients in this autoAB group. ALL = acute lymphoblastic leukemia; AML = acute myeloid leukemia.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241289.t002>

neuronal antibody-dependent pathogenetically relevant mechanisms are doubtful in view of the intracellular localization of most onconeural antigens and a consistent failure to replicate the CNS pathology of paraneoplastic neurological syndromes by antibody transfer in an animal model [39–41]. More recently, pathological and immunological investigations implicate the T-cell component of the lesions as the primary pathogenic principle in these disorders [37, 42–44]. In an exemplary fashion, it was shown that by adoptive transfer, T-cells specific for the autologous onco-neuronal antigen Pnma1 elicited a strong neuroimmunological reaction in contrast to minor pathology by anti-Pnma1 antibodies induced by protein immunization. These data indicate that in paraneoplastic neurological syndromes pathogenetically critical T-lymphocytes can target identical molecules such as the corresponding onconeural antibody does [45]. Significant effects of anti-GAD65 antibodies on neuronal function or synaptic transmission have not been found under experimental conditions [46, 47]. In contrast to our data, a recent study on patients with paraneoplastic LE revealed higher anti-Hu autoAB prevalence [9]. Although autoABs targeting Yo and Zic4 are mainly known for their association with paraneoplastic ataxia, individual cases of patients presenting features of LE have been described [48, 49]. This applies also to all anti-Yo as well as anti-Zic4 autoAB positive patients in this study presenting clinically typical LE findings.

Intriguingly, we found systemic autoimmune disorders in parallel to TAOS more frequent than tumors with a significant increase in the neuroAB⁺ group. In none of the patients, systemic lupus erythematosus was diagnosed, which in fact represents a differential diagnosis of autoimmune-mediated epilepsy. Moreover, antinuclear antibodies (ANAs) including anti-double-stranded deoxyribonucleic acid (anti-dsDNA) or anti-Smith (anti-SM) were not detected in any of the patients' biomaterial. Patients having collagenosis as comorbidity have mixed connective tissue disease, scleroderma, and Sjögren's syndrome. The general predisposition of developing autoimmune disorders in some individuals apparently includes autoimmune seizure-related clinical manifestations. This aspect may affirm the previously described correlation between epilepsy and autoimmune diseases in a population-based study [50].

We further grouped patients that were neuroAB⁻ but positive in at least one of our screening assays as neuroAB⁻/screening⁺ and compared neuroAB⁺ to those as well as to neuroAB⁻/screening⁻ patients. We are fully aware of the fact that this stratification has limitations and represents a simplified approach since patients with pathogenetically different neuroABs are grouped. Despite these constraints, several clinical parameters including signs of inflammation in CSF, MRI findings and additionally lateralization of the EEG focus support a difference between neuroAB⁺ and neuroAB⁻/screening⁻ patients. neuroAB⁻/screening⁺ patients were only different from neuroAB⁺ when referring to hippocampal MRI characteristics. This difference may be due to the fact, that neuroAB⁺ individuals are diagnosed with LE rather early in the disease process.

In a sophisticated approach, Dubey et al. have established an "APE" score that reports on symptoms and clinical signs predictive of autoantibody positivity [36]. However, our present study has a fundamentally different focus by in depth comparisons of different patient groups according to the described battery of specific neuroAB tests as well as autoAB screenings. The International League Against Epilepsy 'Autoimmunity and Inflammation Taskforce' has recently suggested to differentiate between 'acute symptomatic seizures secondary to autoimmune encephalitis' and 'autoimmune-associated epilepsy' [51]. Clinically, this conceptual distinction may be also helpful to learn about differences of the clinical course of neuroAB⁻/screening⁺ patients. Clearly, the results of autoAB testing have to be carefully interpreted in the context of clinical symptoms in individual patients.

The present data point to the importance of considering autoimmune mechanisms in patients with the leading symptom of adult onset temporal seizures may encourage further research on this topic and the development of tailored treatments.

Supporting information

S1 Fig. Screening for autoABs in TOAS patients and healthy donors. Healthy donors had significantly less positive (A) immunoblot and (B) IIFT results in comparison to the TAOS patient cohort (TAOS patients n = 765, healthy donors n = 27, Chi-square-test group comparison: *p<0.05).

(TIF)

S1 File. Supplemental methods.

(DOCX)

S2 File.

(DOCX)

S3 File.

(PDF)

S1 Raw image.

(TIF)

Acknowledgments

We thank Indra Prusseit for excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Christoph Helmstaedter, Rainer Surges, Randi von Wrede, Christian E. Elger, Susanne Schoch, Albert J. Becker, Julika Pitsch.

Formal analysis: Julia C. Kuehn, Carolin Meschede, Christoph Helmstaedter, Elke Hattingen, Julika Pitsch.

Funding acquisition: Susanne Schoch, Albert J. Becker, Julika Pitsch.

Investigation: Julia C. Kuehn, Carolin Meschede, Christoph Helmstaedter, Rainer Surges, Randi von Wrede, Elke Hattingen, Hartmut Vatter, Christian E. Elger, Susanne Schoch, Julika Pitsch.

Methodology: Julia C. Kuehn, Albert J. Becker, Julika Pitsch.

Project administration: Albert J. Becker, Julika Pitsch.

Resources: Carolin Meschede, Rainer Surges, Randi von Wrede, Elke Hattingen, Hartmut Vatter, Christian E. Elger, Susanne Schoch, Albert J. Becker, Julika Pitsch.

Supervision: Albert J. Becker, Julika Pitsch.

Visualization: Julia C. Kuehn, Julika Pitsch.

Writing – original draft: Julia C. Kuehn, Susanne Schoch, Albert J. Becker, Julika Pitsch.

Writing – review & editing: Julia C. Kuehn, Rainer Surges, Randi von Wrede, Elke Hattingen, Susanne Schoch, Albert J. Becker, Julika Pitsch.

References

- Leypoldt F, Armangue T, Dalmau J. Autoimmune encephalopathies. *Ann N Y Acad Sci*. 2015; 1338:94–114. <https://doi.org/10.1111/nyas.12553> PubMed Central PMCID: PMC4363225. PMID: 25315420
- Vincent A, Bien CG, Irani SR, Waters P. Autoantibodies associated with diseases of the CNS: new developments and future challenges. *Lancet Neurol*. 2011; 10(8):759–72. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70096-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70096-5) PMID: 21777830
- 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(5):892–900. <https://doi.org/10.1002/ana.22307> PMID: 21416487
- Irani SR, Bien CG, Lang B. Autoimmune epilepsies. *Curr Opin Neurol*. 2011; 24(2):146–53. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3283446f05> PMID: 21358545
- Saiz A, Blanco Y, Sabater L, Gonzalez F, Bataller L, Casamitjana R, et al. Spectrum of neurological syndromes associated with glutamic acid decarboxylase antibodies: diagnostic clues for this association. *Brain*. 2008; 131(Pt 10):2553–63. <https://doi.org/10.1093/brain/awn183> PMID: 18687732
- Soeder BM, Gleissner U, Urbach H, Clusmann H, Elger CE, Vincent A, et al. Causes, presentation and outcome of lesional adult onset mediotemporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009; 80(8):894–9. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.165860> PMID: 19357127
- Bauer J, Bien CG. Neuropathology of autoimmune encephalitis. *Handb Clin Neurol*. 2016; 133:107–20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63432-0.00007-4> PMID: 27112674
- Bien CG, Urbach H, Schramm J, Soeder BM, Becker AJ, Voltz R, et al. Limbic encephalitis as a precipitating event in adult-onset temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2007; 69(12):1236–44. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000276946.08412.ef> PMID: 17875912
- 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 (Pt 7):1481–94. <https://doi.org/10.1093/brain/123.7.1481> PMID: 10869059
- Bien CG, Schulze-Bonhage A, Deckert M, Urbach H, Helmstaedter C, Grunwald T, et al. Limbic encephalitis not associated with neoplasm as a cause of temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2000; 55(12):1823–8. <https://doi.org/10.1212/wnl.55.12.1823> PMID: 11134380
- 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(Pt 3):701–12. <https://doi.org/10.1093/brain/awh077> PMID: 14960497
- Irani SR, Vincent A. NMDA receptor antibody encephalitis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011; 11(3):298–304. <https://doi.org/10.1007/s11910-011-0186-y> PMID: 21331529
- Vincent A, Crino PB. Systemic and neurologic autoimmune disorders associated with seizures or epilepsy. *Epilepsia*. 2011; 52 Suppl 3:12–7. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03030.x> PMID: 21542840.
- Bien CG, Scheffer IE. Autoantibodies and epilepsy. *Epilepsia*. 2011; 52 Suppl 3:18–22. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03031.x> PMID: 21542841
- Boronat A, Gelfand JM, Gresa-Arribas N, Jeong HY, Walsh M, Roberts K, et al. Encephalitis and antibodies to dipeptidyl-peptidase-like protein-6, a subunit of Kv4.2 potassium channels. *Ann Neurol*. 2013; 73(1):120–8. PubMed Central PMCID: PMC3563722. <https://doi.org/10.1002/ana.23756> PMID: 23225603
- 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(1):67–76. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70324-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70324-2) PubMed Central PMCID: PMC2824142. PMID: 19962348
- 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(8):1135–40. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.034447> PubMed Central PMCID: PMC1739186. PMID: 15258215
- Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol*. 2010; 67(4):470–8. <https://doi.org/10.1002/ana.21917> PMID: 20437582
- Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, et al. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol*. 2016; 15(4):391–404. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00401-9) PubMed Central PMCID: PMC5066574. PMID: 26906964
- Brenner T, Sills GJ, Hart Y, Howell S, Waters P, Brodie MJ, et al. Prevalence of neurologic autoantibodies in cohorts of patients with new and established epilepsy. *Epilepsia*. 2013; 54(6):1028–35. <https://doi.org/10.1111/epi.12127> PMID: 23464826

21. Vinke AM, Schaper F, Vlooswijk MCG, Nicolai J, Majoie M, Martinez Martinez P, et al. Anti-GAD antibodies in a cohort of neuropsychiatric patients. *Epilepsy Behav.* 2018; 82:25–8. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2018.03.004> PMID: 29579551
22. Graus F, Escudero D, Oleaga L, Bruna J, Villarejo-Galende A, Ballabriga J, et al. Syndrome and outcome of antibody-negative limbic encephalitis. *Eur J Neurol.* 2018; 25(8):1011–6. PubMed Central PMCID: PMC6037545. <https://doi.org/10.1111/ene.13661> PMID: 29667271
23. von Podewils F, Suesse M, Geithner J, Gaida B, Wang ZI, Lange J, et al. Prevalence and outcome of late-onset seizures due to autoimmune etiology: A prospective observational population-based cohort study. *Epilepsia.* 2017; 58(9):1542–50. <https://doi.org/10.1111/epi.13834> PMID: 28681401
24. Urbach H, Soeder BM, Jeub M, Klockgether T, Meyer B, Bien CG. Serial MRI of limbic encephalitis. *Neuroradiology.* 2006; 48(6):380–6. <https://doi.org/10.1007/s00234-006-0069-0> PMID: 16586118
25. Huppertz HJ, Wagner J, Weber B, House P, Urbach H. Automated quantitative FLAIR analysis in hippocampal sclerosis. *Epilepsy Res.* 2011; 97(1–2):146–56. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2011.08.001> PMID: 21873031
26. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017; 58(4):522–30. <https://doi.org/10.1111/epi.13670> PMID: 28276060
27. Grote A, Witt JA, Surges R, von Lehe M, Pieper M, Elger CE, et al. A second chance—reoperation in patients with failed surgery for intractable epilepsy: long-term outcome, neuropsychology and complications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016; 87(4):379–85. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-310322> PMID: 25855399
28. Braithwaite T, Vugler A, Tufail A. Autoimmune retinopathy. *Ophthalmologica.* 2012; 228(3):131–42. <https://doi.org/10.1159/000338240> PMID: 22846442
29. Stergiou C, Lazaridis K, Zouvelou V, Tzartos J, Mantegazza R, Antozzi C, et al. Titin antibodies in "seronegative" myasthenia gravis—A new role for an old antigen. *J Neuroimmunol.* 2016; 292:108–15. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.01.018> PMID: 26943968
30. Blumcke I, Spreafico R, Haaker G, Coras R, Kobow K, Bien CG, et al. Histopathological Findings in Brain Tissue Obtained during Epilepsy Surgery. *N Engl J Med.* 2017; 377(17):1648–56. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703784> PMID: 29069555
31. 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(12):1091–8. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70224-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70224-2) PubMed Central PMCID: PMC2607118. PMID: 18851928
32. Bozzetti S, Rossini F, Ferrari S, Delogu R, Cantalupo G, Marchioretto F, et al. Epileptic seizures of suspected autoimmune origin: a multicentre retrospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2020-323841> PMID: 32859745
33. Pitsch J, Kamalizade D, Braun A, Kuehn JC, Gulakova PE, Ruber T, et al. Drebrin Autoantibodies in Patients with Seizures and Suspected Encephalitis. *Ann Neurol.* 2020. <https://doi.org/10.1002/ana.25720> PMID: 32196746
34. Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2014; 13(2):167–77. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70282-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70282-5) PubMed Central PMCID: PMC4006368. PMID: 24360484
35. Liimatainen S, Peltola M, Sabater L, Fallah M, Kharazmi E, Haapala AM, et al. Clinical significance of glutamic acid decarboxylase antibodies in patients with epilepsy. *Epilepsia.* 2010; 51(5):760–7. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02325.x> PMID: 19817821
36. Dubey D, Alqallaf A, Hays R, Freeman M, Chen K, Ding K, et al. Neurological Autoantibody Prevalence in Epilepsy of Unknown Etiology. *JAMA Neurol.* 2017; 74(4):397–402. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.5429> PMID: 28166327
37. Voltz R, Dalmau J, Posner JB, Rosenfeld MR. T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology.* 1998; 51(4):1146–50. <https://doi.org/10.1212/wnl.51.4.1146> PMID: 9781545
38. Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J. Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins. *Ann Neurol.* 2001; 50(3):339–48. PMID: 11558790
39. Tanaka M, Tanaka K, Onodera O, Tsuji S. Trial to establish an animal model of paraneoplastic cerebellar degeneration with anti-Yo antibody. 1. Mouse strains bearing different MHC molecules produce antibodies on immunization with recombinant Yo protein, but do not cause Purkinje cell loss. *Clin Neurol Neurosurg.* 1995; 97(1):95–100. [https://doi.org/10.1016/0303-8467\(95\)00005-5](https://doi.org/10.1016/0303-8467(95)00005-5) PMID: 7788981

40. Sillevs Smitt PA, Manley GT, Posner JB. Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. *Neurology*. 1995; 45(10):1873–8. <https://doi.org/10.1212/wnl.45.10.1873> PMID: 7477985
41. Carpentier AF, Rosenfeld MR, Delattre JY, Whalen RG, Posner JB, Dalmau J. DNA vaccination with HuD inhibits growth of a neuroblastoma in mice. *Clin Cancer Res*. 1998; 4(11):2819–24. PMID: 9829748
42. Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med*. 1998; 4(11):1321–4. <https://doi.org/10.1038/3315> PMID: 9809559
43. 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(2):162–7. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199902\)45:2<162::aid-ana5>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199902)45:2<162::aid-ana5>3.0.co;2-r) PMID: 9989617
44. Plonquet A, Gherardi RK, Creange A, Antoine JC, Benyahia B, Grisold W, et al. Oligoclonal T-cells in blood and target tissues of patients with anti-Hu syndrome. *J Neuroimmunol*. 2002; 122(1–2):100–5. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00452-0](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00452-0) PMID: 11777548
45. Pellkofer H, Schubart AS, Hoftberger R, Schutze N, Pagany M, Schuller M, et al. Modelling paraneoplastic CNS disease: T-cells specific for the onconeural antigen PNMA1 mediate autoimmune encephalomyelitis in the rat. *Brain*. 2004; 127(Pt 8):1822–30. <https://doi.org/10.1093/brain/awh205> PMID: 15201193
46. Stemmler N, Rohleder K, Malter MP, Widman G, Elger CE, Beck H, et al. Serum from a Patient with GAD65 Antibody-Associated Limbic Encephalitis Did Not Alter GABAergic Neurotransmission in Cultured Hippocampal Networks. *Front Neurol*. 2015; 6:189. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00189> PubMed Central PMCID: PMC4551833. PMID: 26379623
47. Hackert JK, Muller L, Rohde M, Bien CG, Kohling R, Kirschstein T. Anti-GAD65 Containing Cerebrospinal Fluid Does not Alter GABAergic Transmission. *Front Cell Neurosci*. 2016; 10:130. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00130> PubMed Central PMCID: PMC4870265. PMID: 27242441
48. Kay L, Bauer S, Koczulla AR, Librizzi D, Vadasz D, Knake S, et al. Ondine's curse and temporal lobe seizures: anti-Hu- and Zic4-associated paraneoplastic brainstem and limbic encephalitis. *Eur J Neurol*. 2018; 25(5):e59–e60. <https://doi.org/10.1111/ene.13629> PMID: 29667352
49. Adam VN, Budincevic H, Mrcic V, Stojic EG, Matolic M, Markic A. Paraneoplastic limbic encephalitis in a patient with adenocarcinoma of the colon: a case report. *J Clin Anesth*. 2013; 25(6):491–5. <https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2013.03.014> PMID: 23965208
50. Ong MS, Kohane IS, Cai T, Gorman MP, Mandl KD. Population-level evidence for an autoimmune etiology of epilepsy. *JAMA Neurol*. 2014; 71(5):569–74. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.188> PubMed Central PMCID: PMC4324719. PMID: 24687183
51. Steriade C, Britton J, Dale RC, Gadoth A, Irani SR, Linnoila J, et al. Acute symptomatic seizures secondary to autoimmune encephalitis and autoimmune-associated epilepsy: Conceptual definitions. *Epilepsia*. 2020. <https://doi.org/10.1111/epi.16571> PMID: 32544279

Weitere im Rahmen der Promotion entstandene Publikationen:

Kuehn JC, Scheuerle A, Bauer J, Becker AJ, Wirtz R, Lewerenz J. A 64-Year-Old Patient With a Mesiotemporal Mass and Symptomatic Epilepsy. 2020. *Brain Pathol.* 30(2): 413-414

Pitsch J, Kamalizade D, Braun A, **Kuehn JC**, Gulakova PE, Rüber T, Lubec G, Dietrich D, von Wrede R, Helmstaedter C, Surges R, Elger CE, Hattingen E, Vatter H, Schoch S, Becker AJ. Drebrin Autoantibodies in Patients with Seizures and Suspected Encephalitis. 2020. *Ann Neurol.* 87(6): 869-884

Pitsch J, **Kuehn JC**, Gnatkovsky V, Müller JA, van Loo KMJ, de Curtis M, Vatter H, Schoch S, Elger CE, Becker AJ. Anti-epileptogenic and Anti-convulsive Effects of Fingolimod in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. 2019. *Mol Neurobiol.* 56(3): 1825-1840.

3. Danksagung

Mein Dank gilt der kompletten AG Schoch/Becker für die tatkräftige Unterstützung und Geduld. Ich bin dankbar für die schöne und anregende Zeit im Labor, in der die Mitglieder der Arbeitsgruppe nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde geworden sind. Im Besonderen danke ich Indra Prusseit, ohne deren Zutun diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke Frau Dr. Julika Pitsch und Frau Prof. Dr. Susanne Schoch-McGovern für die große Unterstützung bei jeglichen Fragen und Problemen.

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Albert Becker meinen Dank dafür aussprechen, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten zu entdecken und eigene Ideen zu entwickeln. Die Erfahrungen, die ich machen durfte, werden mich weiterhin prägen.

Dem Zweitgutachter möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit danken.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie.