

DISSERTATION

Prävalenz neuronaler Autoantikörper bei Patientinnen und Patienten mit Erstanfällen oder Epilepsie unbekannter Ätiologie

Prevalence of Neuronal Autoantibodies in Patients with Seizures or Epilepsy of Unknown Etiology

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Marie Paulina Schulz

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Harald Prüß

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	3
1. Einleitung	5
1.1 Einführung in das Thema	5
1.2 Immunvermittelte Epilepsie, Autoimmunencephalitis und Bedeutung der Autoantikörperdiagnostik in der Epilepsiediagnostik	6
1.3 Ziel der vorliegenden Dissertation	11
1.4 Relevanz und klinische Implikationen.....	11
1.5 Fragestellung	12
2. Methodik	13
2.1 Studienpopulation.....	13
2.2 Auswertung der klinischen Daten	14
2.3 Autoantikörper-Diagnostik	14
3. Ergebnisse	17
3.1 Auswertung der klinischen Daten	17
3.2 Autoantikörper-Befunde.....	22
4. Diskussion.....	28
4.1 Zusammenfassung	28
4.2 Prävalenz von Autoantikörpern und die Diagnose einer autoimmun-assoziierten Epilepsie	28
4.3 Die Bedeutung von Liquor in der Epilepsiediagnostik bei unklarer Ätiologie.....	31
4.4 Tumor-Häufigkeit bei Autoantikörper-positiven Fällen und die Frage nach paraneoplastischen neurologischen Syndromen (PNS).....	32

4.5 Stärken und Schwächen der Studie	34
5. Schlussfolgerungen	36
Literaturverzeichnis	38
Eidesstattliche Versicherung	47
Anteilerklärung	48
Druckexemplar der Publikation	50
Lebenslauf.....	59
Komplette Publikationsliste	62
Danksagung	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demografische Daten, Anfalls- und Epilepsieklassifikation, EEG, kranielle Bildgebung und Komorbiditäten nach dem initialen Epilepsie-Assessment.....	21
Tabelle 2: Detaillierte Ergebnisse der indirekte Immunfluoreszenz und der Zell-basierten Assays für alle positiv-getesteten Personen sowie deren Diagnose vor und nach der Langzeituntersuchung.....	25

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign, durchgeführte Testverfahren und diagnostische Klassifikation vor und nach der Langzeitnachuntersuchung	18
Abbildung 2: Autoantikörperfrequenz in den unterschiedlichen diagnostischen Gruppen	24
Abbildung 3: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz an unfixierten Hirnschnitten von Mäusen.....	27

Abkürzungsverzeichnis

AIE: Autoimmunenzephalitis/Autoimmunenzephalitiden

AK: Autoantikörper

AMPA-R: alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid--Rezeptoren

CASPR2: Contactin-assoziiertes Protein 2

cCT: kranielle Computertomographie

cMRI: kranielle Magnetresonanztomographie

CSF: cerebrospinal fluid

EEG: Electroencephalography

GABA_A-R: Gamma aminobutyric acid-A-Rezeptor

GABA_B-R: Gamma aminobutyric acid-B-Rezeptor

GAD65: Glutaminsäure-Decarboxylase: Glutamic Acid Decarboxylase 65

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

HEK-Zellen: Human Embryonic Kidney – Zellen

IIF: Indirekte Immunfluoreszenz

ILAE: International League Against Epilepsy

IgG: Immunglobulin Gamma

LG11: Leucine-rich Glioma Inactivated Protein 1

NMDA-R: N-Methyl D-Aspartat Rezeptor

PFA: Paraformaldehyd

PBS: phosphatgepufferter Salzlösung: Phosphate Buffered Saline

PNS: Paraneoplastisches Syndrom: Paraneoplastic Syndrome

VGKC-Komplex: Voltage Gated Potassium Channel-Komplex

WHO: Weltgesundheitsorganisation

ZBA: zellbasierte Assay/s

ZNS: Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Epilepsie ist eine häufige Erkrankung, an der weltweit etwa 50 Millionen Menschen leiden. Die frühzeitige Erkennung der Ursache ist für die Diagnose und die Therapie von entscheidender Bedeutung, dennoch bleibt bei ungefähr der Hälfte aller Epilepsiefälle die Ätiologie unbekannt.

Jüngste Entdeckungen spezifischer Autoantikörper gegen neuronale Antigene haben 2017 zur Einführung der ätiologischen Gruppe der „immunvermittelten Epilepsien“ durch die ILAE geführt und damit das ätiologische Spektrum und die damit verbundenen Therapiemöglichkeiten bei Epilepsien unbekannter Ätiologie erweitert.

Obwohl die Identifizierung und Charakterisierung von autoimmun-assoziierten Epilepsien neue immuntherapeutische Behandlungsstrategien ermöglicht, sind die zugrundeliegenden Autoantikörper und der genaue Anteil dieser Art von Epilepsie noch nicht vollständig erfasst. Ebenso ist die Rolle der Liquor-Untersuchung in der Diagnostik bei ätiologisch unbekanntem Anfällen und Epilepsien nicht vollständig verstanden und in nur wenigen Studien untersucht worden.

Im Rahmen meiner Dissertation wurde die Häufigkeit von Autoantikörpern bei 39 Patientinnen und Patienten mit neu aufgetretenen Anfällen oder Epilepsie unbekannter Ätiologie untersucht. Dafür wurden bei allen Personen Serum- und Liquorproben sowie Serumproben bei 24 Kontrollpersonen gesammelt und auf Autoantikörper mittels zellbasierter Assays und indirekter Immunfluoreszenz an Ratten- sowie Maushirnschnitten untersucht. Zusätzlich erfolgte eine umfangreiche retrospektive Datenanalyse über die Dauer von im Durchschnitt 7,8 Jahren, um den klinischen Verlauf dieser Patienten zu erfassen und zu charakterisieren.

Autoantikörper wurden im Liquor bei 30,8 % der Patientinnen und Patienten nachgewiesen. Bei den zugrunde liegenden Antigenen handelte es sich um GFAP, GAD65, NMDA-Rezeptor, aber auch um eine Reihe von noch unbestimmten Epitopen auf Neuronen, Glia- und Gefäßzellen. Während Tumore bei Autoantikörper-positiven Personen häufiger auftraten, unterschied sich diese Gruppe nicht von Autoantikörper-negativen Personen in Bezug auf die Art der Anfälle, das EEG, das cMRT, neuropsychiatrische Komorbiditäten oder bestehende Autoimmunkrankheiten. Darüber hinaus führten die Ergebnisse bei 5,1% der Patientinnen und Patienten zur Diagnose einer autoimmun-assoziierten Epilepsie, was größtenteils auf den Liquorbefunden beruhte und die entscheidende Rolle der Liquoranalyse bei der Bestimmung der Ätiologie unterstreicht.

Die Ergebnisse tragen dazu bei, das Verständnis für die Prävalenz von Autoantikörpern bei Personen mit Anfällen oder Epilepsie unbekannter Ätiologie zu erweitern, die Charakterisierung der Gruppe von autoimmun-assoziierten Epilepsien zu verbessern und die diagnostische Rolle der Liquoranalyse bei dieser Gruppe zu vertiefen, was letztlich zu optimierten Behandlungsergebnissen, einer verbesserten Prognose und höherer Lebensqualität der Betroffenen führen kann.

Künftige prospektive Studien sind erforderlich, um den diagnostischen Beitrag des Liquors zu klären, zugrunde liegende Autoantigene zu identifizieren und die Pathomechanismen aufzudecken, um letztlich die Behandlung dieser komplexen Patientinnen- und Patientengruppe zu verbessern.

Abstract

Epilepsy is a common disorder affecting approximately 50 million people worldwide. Early identification of the cause is critical for diagnosis and treatment, yet the etiology remains unknown in approximately half of all epilepsy cases.

Recent discoveries of specific autoantibodies to neuronal antigens led to the introduction of the etiologic group of "immune-mediated epilepsies" by the ILAE in 2017, expanding the etiologic spectrum and associated therapeutic options for epilepsies of unknown etiology.

Although the identification and characterization of autoimmune-associated epilepsies allows new immunotherapeutic treatment strategies, the underlying autoantibodies and the exact proportion of this type of epilepsy are not yet fully understood. Similarly, the role of cerebrospinal fluid (CSF) analysis in the diagnosis of seizures and epilepsies of unknown etiology is not fully understood and has been investigated in only a few studies.

In our research, we explored the presence of autoantibodies in a group of 39 individuals presenting with initial seizures or epilepsy of unknown etiology. For this purpose, serum and CSF samples were collected from all participants as well as serum samples from 24 control subjects and tested for autoantibodies using both cell-based assays and indirect immunofluorescence on rat and mouse brains. In addition, an extensive retrospective data analysis was performed over an average of 7.8 years to record and characterize the clinical course of these patients.

We found autoantibodies in the CSF of nearly a third of the patients, specifically 30.8%. The primary antigens identified were GFAP, GAD65, and NMDA-receptor. Additionally, unidentified epitopes on neuronal, glial, and vascular cells were detected. Subjects with detected autoantibodies had a higher incidence of tumors. However, when compared to those without autoantibodies, there wasn't a notable difference in aspects like seizure classification, EEG, cMRI, neuropsychiatric comorbidities, or prevalent autoimmune diseases. In addition, the results led to a diagnosis of autoimmune-associated epilepsy in 5.1% of patients, largely based on CSF findings, underscoring the crucial role of CSF analysis in determining etiology.

These results contribute to the understanding of the prevalence of autoantibodies in individuals with seizures or epilepsy of unknown etiology, improve the characterization of the group of autoimmune-associated epilepsies, and enhance the diagnostic role of CSF

analysis in this group, which may ultimately lead to optimized treatment outcomes, improved prognosis, and higher quality of life for affected individuals.

Future prospective studies are needed to clarify the diagnostic contribution of CSF, identify underlying autoantigens, and uncover the pathomechanisms to ultimately improve the treatment of this complex patient group.

1. Einleitung

1.1 Einführung in das Thema

Epilepsie ist eine weit verbreitete neurologische Erkrankung, die weltweit 0,5-1% der Gesamtbevölkerung betrifft (1) und durch das Auftreten mindestens eines epileptischen Anfalls und eine erhöhte Neigung zu weiteren epileptischen Anfällen gekennzeichnet ist (2). Bei vielen Patientinnen und Patienten kann die Ursache der Anfälle in der klinischen Diagnostik eindeutig identifiziert werden. Dies ist wichtig, um eine adäquate Therapie gewährleisten zu können und stellt den wichtigsten prognostischen Faktor dar (3). Die ILAE unterteilt in der offiziellen Klassifikation von 2017 die Ätiologie in strukturell, genetisch, metabolisch, infektiös, immunvermittelt und unbekannt, wobei alle gemeinsam haben, dass wiederkehrende epileptische Anfälle das zentrale Symptom darstellen (4).

Die Identifikation der Ursache bestimmt die Therapie, diese ist in den meisten Fällen (5) symptomatisch anti-krampfhaft mit dem Ziel der Anfallskontrolle, da Epilepsie unbehandelt mit erhöhter Mortalität einhergeht (3). Für einen Großteil (6) der Patientinnen und Patienten kann durch eine kontinuierliche Einnahme der Medikation eine lebenslange Anfallsfreiheit gewährleistet werden, diese geht jedoch häufig mit Nebenwirkungen einher (7, 8). Aber auch anderer therapeutische Verfahren wie neurochirurgische Maßnahmen oder die genaue Behandlung der Ursache wie zum Beispiel die gezielte Erregerbekämpfung bei einer infektiösen Ursache können als Therapiemaßnahmen infrage kommen (9). Bei jedoch schätzungsweise 50% der Fälle weltweit bleibt die Ursache der Anfälle ungeklärt (10, 11).

Patientinnen und Patienten mit Epilepsie unbekannter Ätiologie stellen eine besondere Herausforderung für Ärzte und Neurologen dar, da diese Gruppe trotz adäquater Einstellung der antikonvulsiven Medikation häufig therapie-refraktär bleibt und somit die Lebensqualität der Patienten durch sich wiederholende epileptische Anfälle stark eingeschränkt bleibt (12).

Daher ist besonders bei dieser Kohorte die Identifikation der ätiologischen Ursachen von entscheidender Bedeutung, um eine gezielte Behandlung der Grunderkrankung zu ermöglichen und damit eine bessere Prognose für die betroffenen Patientinnen und Patienten zu gewährleisten.

1.2 Immunvermittelte Epilepsie, Autoimmunencephalitis und Bedeutung der Autoantikörperdiagnostik in der Epilepsiediagnostik

Seit Beginn der 2000er Jahre und der erstmaligen Beschreibung der Anti-NMDA-R-Enzephalitis 2007 (13-15) stehen Autoimmunenzephalitiden (AIE) zunehmend im Fokus der neurologischen Forschung (16). Hierbei handelt es sich um eine Gruppe neurologischer Erkrankungen, die durch das Auftreten von Autoantikörpern gegen spezifische neuronale Zielstrukturen im Zentralnervensystem gekennzeichnet sind. Diese Autoantikörper lösen eine pathologische Immunantwort aus, die eine Entzündung und Schädigung des Gehirns verursacht. Die genauen Mechanismen, die zu dieser Autoimmunreaktion führen, sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren wie Infektionen eine Rolle spielen können (17). Auch können diese AIE in Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung als sogenanntes paraneoplastisches Syndrom auftreten.

Eine Vielzahl von Autoantikörpern ist im Zusammenhang mit Autoimmunencephalitiden beschrieben worden, welche sich je nach Autoantikörper in verschiedenen Symptomen äußern können; häufig dabei sind kognitive Defizite, psychiatrische Störungen sowie Anfälle (18).

Diese Autoantikörper können sowohl gegen extrazelluläre (z.B. NMDA-R, LGI1) als auch intrazelluläre Antigene (z.B. Hu, Yo, Ri, CRMP5, Ma2) gerichtet sein, wobei die häufigsten Autoantikörper gegen neuronale Oberflächenantigene gerichtet sind; insbesondere gegen ionotrope Rezeptoren (15).

Die häufigsten und bisher gut untersuchten Oberflächen-Autoantikörper und deren klinische Manifestationen sind (19, 20):

- 1. Anti-NMDA-Rezeptor-Antikörper:** Die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis ist eine der bekanntesten Formen der Autoantikörper-vermittelten Enzephalitis. Autoantikörper gegen NMDA-Rezeptoren können eine Vielzahl von Symptomen verursachen, einschließlich Gedächtnisverlust, psychiatrische Störungen wie Wahnvorstellungen und Halluzinationen, Bewegungsstörungen, epileptische Anfälle und manchmal auch autonome Dysfunktionen (19-22). Diese Form der AIE kann mit Tumoren assoziiert sein; am häufigsten sind hier ovarielle Teratome bei jungen Frauen (23).

2. VGKC-Komplex:

Dies umschreibt eine Gruppe von Proteinen, die mit dem VGKC-Komplex assoziiert sind und sich je nach Subtyp in ihrem klinischen Erscheinungsbild unterscheiden können. Inzwischen werden nur noch die Subtyp-Antikörper bestimmt, dazu zählen (24):

- I. **Anti-LGI1-Antikörper:** leucine-rich glioma-inactivated 1 (LGI1) ist ein Protein, das mit dem Kaliumkanal assoziiert ist und erstmals 2010 beschrieben wurde (25, 26). Autoantikörper gegen LGI1 sind mit limbischer Enzephalitis assoziiert, die durch Veränderungen im Verhalten, der räumlichen Orientierung und im Erinnerungsvermögen einhergeht. Typisch für diese Form der AI sind faziobrachiale dystone Anfälle sowie eine Hyponatriämie, beides tritt jedoch nur bei knapp der Hälfte der Patientinnen und Patienten auf (26, 27). Eine Tumorassoziation ist möglich, am häufigsten wurden bisher Thymome und kleinzelliges Lungenkarzinom im Zusammenhang mit einer LGI1-AIE beschrieben (28-30).
- II. **Anti-CASPR2-Antikörper:** Ebenso wie LGI1 wurde contactin-associated protein-like 2 (CASPR2) 2010 zum ersten Mal identifiziert und ist auch mit den spannungsabhängigen Kaliumkanal assoziiert. Autoantikörper gegen CASPR2 sind unter anderem mit Morvan-Syndrom, Neuromyotonie sowie limbischer Enzephalitis assoziiert. Das klinische Bild ist durch eine Kombination von neurologischen und psychiatrischen Symptomen gekennzeichnet ist, einschließlich Gedächtnisstörungen, epileptischen Anfällen, Bewegungsstörungen und manchmal auch Schlafstörungen. Auch Caspr2-Autoantikörper können mit einer Tumorerkrankung assoziiert sein; am häufigsten sind Thymome (30-33).

3. Anti-GABA_B-Rezeptor-Antikörper:

AIE, die in Zusammenhang mit Autoantikörpern gegen den GABA_B-Rezeptor stehen, wurden erstmals 2010 beschrieben (34). Diese Form der AIE betrifft häufig das limbische System und äußert sich in epileptischen Anfällen, kognitiver Dysfunktion, Gedächtnisverlust und psychiatrischen Symptomen (35), wobei epileptische Anfälle die vorherrschende Symptomatik darstellen (36). Darüber hinaus steht diese Erkrankung häufig im Zusammenhang mit kleinzelligen Lungenkarzinom (34).

4. Anti-AMPA-Rezeptor-Antikörper:

Diese Autoantikörper zielen auf die Untereinheit (Glu1 oder Glu2) des AMPA-Rezeptors ab, einer Untergruppe der Glutamatrezeptoren ab. Diese insgesamt seltenere Form der AIE wurde erstmals 2009 beschrieben (37) und stellt sich meistens limbische Enzephalitis dar, die mit kognitiven und psychischen Veränderungen einhergeht, außerdem sind Gedächtnisstörungen und epileptische Anfälle häufig (38, 39). Auch eine Tumorassoziation tritt häufig (schätzungsweise bei mehr als der Hälfte (39)) in dieser Patientengruppe auf; meistens in Form eines kleinzelligen Lungenkarzinoms, eines Mammakarzinoms oder Ovarialkarzinoms (16, 37, 39).

5. Anti-GABA_A-Rezeptor-Antikörper:

Diese seltene Form einer AIE ist neben einem positiven Anti-GABA_A-R-AK-Titer durch Therapie-refraktäre epileptische Anfälle und Status epilepticus gekennzeichnet (17, 40, 41) und wurde 2014 das erste Mal beschrieben (41). Ebenso können bei Betroffenen kognitive Beeinträchtigungen, Bewegungsstörungen und Bewusstseinsveränderungen auftreten (40). Eine Tumorassoziation ist auch hier bekannt; mögliche Tumore sind Thymome, kleinzelliges Lungenkarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom (16, 41)

Die Identifizierung und Charakterisierung dieser Autoantikörper, deren klinische Relevanz und das Verständnis über die zugrunde liegenden Pathomechanismen sind Gegenstand der aktuellen Forschung und werden kontinuierlich durch neue Erkenntnisse erweitert.

Der Verlauf der Autoantikörper-vermittelten Enzephalitis kann von Person zu Person stark variieren und hängt von Faktoren wie der Art des beteiligten Autoantikörpers, dem Schweregrad der Symptome und der Geschwindigkeit der Behandlung ab (16, 42, 43). Generell beginnt die AIE oft akut oder subakut mit neurologischen oder psychiatrischen Symptomen, die sich im Laufe von Tagen bis Wochen entwickeln. Diese können Gedächtnisstörungen, Verwirrtheit, Halluzinationen, epileptische Anfälle, Bewegungsstörungen und manchmal auch Fieber oder andere Zeichen einer systemischen Entzündung umfassen (44, 45).

Ohne Behandlung können die Symptome fortschreiten und zu einem ernsthaft bedrohlichen Zustand führen, der stationär behandelt werden muss, einschließlich Bewusstseinsstörungen oder sogar Koma (46). In einigen Fällen können auch lebensbedrohliche Komplikationen wie Atemversagen auftreten (23).

Mit geeigneter Behandlung, die in der Regel eine Kombination aus Immunsuppression und -modulation und symptomatischer Behandlung umfasst, können die Symptome oft signifikant verbessert werden (16, 23). Die Erholung kann jedoch langsam und unvollständig sein, mit anhaltenden neurologischen oder kognitiven Beeinträchtigungen bei einigen Patienten (42). Weil AIE häufig rezidivieren können, benötigen die meisten Patienten eine langfristige immunmodulatorische Therapie sowie regelmäßige Nachuntersuchungen, um den klinischen Verlauf zu überwachen und eventuelle Rückfälle frühzeitig zu erkennen (17).

Die Diagnose wird neben dem klinischen Erscheinungsbild durch den Nachweis der spezifischen Autoantikörper im Blut oder im Liquor der Patientinnen und Patienten gestellt, da die Erstsymptome allein oft unspezifisch sind (17, 45).

Hierbei hat sich gezeigt, dass eine frühe Identifikation dieser Autoantikörper eine rechtzeitige Diagnose ermöglicht, was zu einer schnellen Initiierung einer gezielten Immuntherapie führt und damit direkten, positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Prognose der Patientinnen und Patienten hat (30, 45).

Wie oben bereits erwähnt, stellen epileptische Anfälle eines der häufigsten Symptome von Autoimmunencephalitiden dar (16, 17), was 2017 zur Erweiterung der offiziellen Epilepsie-Klassifikation um das ätiologische Konzept der „immunvermittelten Epilepsie“ durch ILAE führte (10, 47). Eine immunvermittelte Epilepsie liegt dann vor, „wenn die Epilepsie direkte Folge einer Störung des Immunsystems ist, bei der epileptische Anfälle ein Hauptsymptom darstellen“ (4, 47).

„Im Jahr 2020 hat die ILAE-Taskforce "Autoimmunität und Entzündung" dieses Konzept weiter präzisiert (48). Deren Vorschlag bestand darin, eine klare Abgrenzung der immunvermittelten Epilepsien durch die Einführung einer konzeptuellen Definition zu erreichen, die auf zwei wesentlichen diagnostischen Entitäten beruht. Die ILAE-Taskforce differenziert dabei zwischen akuten symptomatischen Anfällen, die auf eine Autoimmunenzephalitis zurückgeführt werden können, und der autoimmun-assoziierten Epilepsie, die durch eine dauerhafte Prädisposition für Anfälle gekennzeichnet ist. Diese Unterscheidung ist notwendig, da die Definition der immunvermittelten Epilepsie von 2017 (4, 47) keine ausreichende Berücksichtigung des klinischen Verlaufs der Anfallssymptomatik ermöglicht. Daher wurde das Konzept der autoimmun-assoziierten Epilepsie als Erweiterung und Präzisierung der "immunvermittelten Epilepsie" eingeführt (48).

Die Identifizierung und Charakterisierung der autoimmun-assoziierten Epilepsie eröffnen somit neue Perspektiven für das Verständnis und die Behandlung von Epilepsien unbekannter Ätiologie, da hier eine gezielte Immuntherapie möglich ist, die über die Anfallskontrollierende, antikonvulsive Behandlung hinausgeht (49).

Analog zur AIE-Diagnostik spielt auch hier die Autoantikörperanalyse hier eine entscheidende Rolle, indem sie über den Nachweis spezifischer Autoantikörper im Blut oder Liquor von Patientinnen und Patienten mit Epilepsie unklarer Ätiologie in Zusammenschau mit der Klinik die Diagnose eine zugrunde liegende AIE ermöglicht und damit auch Aufschluss über eine autoimmun-assoziierte Epilepsie gibt.

Obwohl die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen und der beteiligten Autoantikörper in der letzten Dekade zugenommen hat (45, 50-52), ist der genaue Anteil von autoimmun-assoziierten Epilepsien und das Spektrum der zugrundeliegenden Autoantikörper immer noch nicht vollständig bekannt und wird laufend durch neue Erkenntnisse ergänzt. Eine 2019 durchgeführte umfassende Metaanalyse konnte zeigen, dass die Prävalenz von Autoantikörpern bei Epilepsiepatientinnen und -patienten schätzungsweise zwischen 0-24% liegt, wovon die der Autoantikörperfrequenz bei Epilepsien unklarer Ursache zwischen 3,4-16,7% lag- abhängig vom Studiendesign und den Einschlusskriterien der Kohorte (53).

Eine genaue Angabe über den Anteil von autoimmun-assoziierten Epilepsien lässt sich schwer treffen, da zwischen den einzelnen Studien hierzu starke Unterschiede bestehen. Diese stehen teilweise im Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von Serum- und Liquorproben, die oft auf Serum beschränkt bleiben, der begrenzten Anzahl untersuchter Autoantikörper, der Charakterisierung und dem epileptogenen Potential der zugrundeliegenden Autoantikörper (z.B. solche, die gegen neuronale Oberflächen binden), mangelnder Nachbeobachtung und diagnostischen Inkonsistenzen in der Unterscheidung zwischen sekundären Anfällen bedingt durch AIE und autoimmun-assoziierten Epilepsien (53).

Ebenso ist die Rolle der Liquor-Untersuchung in der Diagnostik bei ätiologisch unbekanntem Anfällen und Epilepsien nicht vollständig verstanden und in nur wenigen Studien untersucht worden (53).

Dies steht im Kontrast zur Empfehlung einiger Studien (45), die eine routinemäßige Liquor-Diagnostik nahelegen, um eine autoimmune Ätiologie nicht zu übersehen. Diese Empfehlung beruht darauf, dass bestimmte Autoantikörper nur im Liquor nachweisbar

sind, der klinische Verlauf mit Liquor-Titern korreliert, wie z.B. bei Anti-NMDAR-Autoantikörper-vermittelter Encephalitis, und darüber hinaus für einige Autoantikörper eine besondere Liquor-Relevanz (GAD65) nachgewiesen werden konnte (17, 50, 54).

Daher sind die genaue Bestimmung des Anteils von autoimmun-assoziierten Epilepsien und die Identifikation der zugrundeliegenden Autoantikörper von großer klinischer Bedeutung. Die Fähigkeit, diese autoimmun-assoziierten Epilepsien frühzeitig diagnostizieren zu können, bedeutet auch frühzeitig die Behandlungsstrategien anzupassen und somit rechtzeitig die bestmögliche Therapie einzuleiten. Aufgrund der erheblichen Unterschiede zwischen den bisherigen Studien und den Herausforderungen, die mit der Erkennung und Quantifizierung dieser Autoantikörper verbunden sind, besteht ein dringender Bedarf an weiterer Forschung, um eine genauere Einschätzung des Anteils von autoimmun-assoziierten Epilepsien zu ermöglichen. Weiterhin kann ein besseres Verständnis der spezifischen Autoantikörper und ihrer Rolle bei der Pathogenese von Epilepsien neue Therapieansätze ermöglichen und zur Entwicklung von personalisierten, zielgerichteten Behandlungen beitragen. Daher unterstreicht die aktuelle Datenlage die Notwendigkeit, die Verfügbarkeit von geeigneten diagnostischen Tests zu erhöhen und das Bewusstsein für diese wichtige Untergruppe von Epilepsien zu schärfen.

1.3 Ziel der vorliegenden Dissertation

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Serum- und Blutproben von Patientinnen und Patienten mit neu aufgetretenen ätiologisch unbekanntem Anfällen oder Epilepsie unbekannter Ätiologie gesammelt. Diese wurden retrospektiv analysiert und auf das Vorhandensein von Autoantikörpern im Liquor geprüft mit der Frage nach dem zusätzlichen Nutzen einer umfangreichen Liquordiagnostik sowie Identifikation von bisher unbekanntem Autoantikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz an Ratten- und Maushirnschnitten. Darüber hinaus wurde mittels einer langfristigen klinischen Nachbeobachtung über 6-8 (im Mittel 7,8) Jahre der Anfallsverlauf und somit die Epilepsiediagnose aller Patientinnen und Patienten nachverfolgt und überprüft.

1.4 Relevanz und klinische Implikationen

Die Ergebnisse dieser Studie tragen dazu bei, das Verständnis der Prävalenz von Autoantikörpern bei Patientinnen und Patienten mit ätiologisch unklarem Anfällen oder unbekannter Epilepsie zu erweitern, die Gruppe von autoimmun-assoziierten Epilepsien zu

charakterisieren sowie die Rolle der Liquoruntersuchung in der Diagnostik und Charakterisierung autoimmun-assoziiierter Epilepsien genauer zu untersuchen. Die klinische Anwendung gezielter immuntherapeutischer Ansätze und gezielter Therapie setzt die genaue Identifizierung autoimmun-assoziiierter Epilepsien voraus.

Ebenso bedingt eine gezielte klinische Diagnostik das frühzeitige Erkennen von autoimmun-assoziierten Epilepsien, was durch eine nachfolgende, prompte Therapieeinleitung die Behandlungsergebnisse optimiert und die prognostischen Aussichten sowie die Lebensqualität der betroffenen Patientinnen und Patienten verbessern kann.

1.5 Fragestellung

Daher werden die folgenden zentralen Fragen tiefergehend untersucht:

1. Wie häufig ist die Frequenz von Autoantikörpern bei Patientinnen und Patienten mit Anfällen oder Epilepsie unbekannter Ätiologie?
2. Welche Autoantikörper stehen im Zusammenhang mit der autoimmun-assoziierten Epilepsie und könnten potenzielle diagnostische Marker sein?
3. Welche Rolle spielt der Liquor bei der Diagnostik und Charakterisierung von autoimmun-assoziierten Epilepsien?

2. Methodik

2.1 Studienpopulation

In diese retrospektive Studie wurden 39 erwachsene Patientinnen und Patienten (Durchschnittsalter 45 Jahre, ± 16.4 SD) eingeschlossen, die sich mit neu aufgetretenen epileptischen Anfällen oder Epilepsie unklarer Ätiologie in der Notaufnahme aller drei Campi der Charité - Universitätsmedizin Berlin vorstellten und infolgedessen auf die Neurologiestation der Charité - Universitätsmedizin Berlin zwischen 2012 und 2014 eingewiesen wurden (55).

Patientinnen und Patienten, deren Anfalls- oder Epilepsieursachen bei der Aufnahme in der Notaufnahme oder in der klinischen Untersuchung geklärt werden konnten oder bereits bekannt waren ($n=49$), wurden von der Studie ausgeschlossen (55).

Die Diagnosen wurden von den behandelnden Neurologen nach den Richtlinien der ILAE (47) gestellt.

Nach der Entlassung aus dem Krankenhaus wurden die Patientenakten über das elektronische System (SAP) der Charité-Universitätsmedizin alle zwei Jahre bis Dezember 2021 weiterverfolgt, um das Wiederauftreten von Anfällen zu dokumentieren (55).

Neben der klinischen Routinediagnostik wurden zusätzlich von allen Patientinnen und Patienten während des stationären Aufenthalts Serum- und Liquorproben entnommen.

Die Serum- und Liquorproben wurden kodiert, asserviert und für die spätere Analyse bei -80 °C gelagert (55).

Als Kontrolle für die Prävalenz von Serum-Autoantikörpern wurden Serum-Proben von 24 gesunden Personen (Durchschnittsalter = 47,5 Jahre, $\pm 19,7$) alters- und geschlechtsgleich mit der Patientenkohorte in die Studie aufgenommen. Aufgrund der invasiven Technik war die Entnahme von Liquor von gesunden Kontrollpersonen nicht verfügbar. Autoimmunität, psychiatrischen Komorbiditäten oder früheren epileptische Anfälle wurden bei der Kontrollkohorte amnestisch ausgeschlossen (55).

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Charité genehmigt (EA1/096/12) (55).

Alle Teilnehmerinnen und Teilnehmer gaben vor der Probenentnahme ihr schriftliches Einverständnis.

2.2 Auswertung der klinischen Daten

Zur Bewertung der Epilepsiediagnose und zur Überwachung des individuellen klinischen Verlaufs wurden die klinischen Daten aller Probandinnen und Probanden am Ende des Krankenhausaufenthalts erfasst und über einen Zeitraum von sechs bis acht Jahren (durchschnittlich 7,8 Jahre) zweijährlich nachverfolgt (55).

Dazu gehörten Informationen über die routinemäßige Epilepsiediagnostik (Anfallsanamnese, Anfallsklassifizierung, Routine-EEG und kraniale Bildgebung (cMRI oder cCT), demografische Merkmale (Alter, Geschlecht) sowie weitere selektierte klinische Befunde, die auf einen Zusammenhang mit einer Autoimmunerkrankung hinweisen könnten (immunsuppressive Medikation und Komorbiditäten [Autoimmun-erkrankungen, psychiatrische, neurologische Erkrankungen und Krebs]).

Dem initialen Krankenhausaufenthalt folgte eine Nachbeobachtung des klinischen Verlaufs mithilfe der elektronischen Patientendatenbank der Charité Berlin, wobei der Schwerpunkt auf dem Wiederauftreten von Anfällen und/oder der Entwicklung einer ZNS- oder einer systemischen Autoimmunerkrankung lag.

Für die statistischen Analysen wurde Microsoft Excel (Microsoft Excel 2023, Redmond, WA, USA) verwendet, wobei Signifikanz als $p < 0,05$ definiert wurde (55).

2.3 Autoantikörper-Diagnostik

Nach vollständigem Abschluss der Patientinnen- und Patientenrekrutierung wurden alle Serum- und Liquorproben parallel analysiert, um die Vergleichbarkeit der Testergebnisse zu optimieren und Bias zu reduzieren. Für den Nachweis von Autoantikörpern wurden zwei Methoden verwendet. Bei der ersten Methode wurde indirekte Immunfluoreszenz auf Ratten- und anschließend Maushirnschnitten verwendet, um neue anti-neuronale, anti-gliale und anti-vaskuläre Autoantikörper zu identifizieren (55).

Bei der zweiten Methode wurden zellbasierte Assays (ZBA) verwendet, um bereits etablierte IgG-Autoantikörper zu identifizieren.

2.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Alle Serumproben von Patientinnen und Patienten und Kontrollen sowie Liquorproben der Patientinnen- und Patientenkohorte wurden auf das Vorhandensein von IgG-Autoantikörpern untersucht, die an Ratten- und Maushirngewebe binden.

Erwachsene Wistar-Ratten wurden durch tiefe Narkose getötet und ihre Gehirne anschließend entnommen und mit 2-Methylbutan tiefgefroren. Für die Immunhistochemie wurden Kryostatschnitte von 20 µm aus Kleinhirn und Hippocampus angefertigt.

Diese Schnitte wurden zunächst 8 Minuten lang mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend 15 Minuten lang mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Vorinkubation mit einer Blockierungslösung, die 4% Pferdeserum und 0,5% Triton X-100™ in PBS enthielt. Anschließend wurden Serumverdünnungen von 1:200 und Liquorverdünnungen von 1:1 oder 1:2 aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach einem weiteren Waschvorgang zwei Stunden lang mit dem sekundären Antikörper, einem Cy3-markierten Esel-Antihuman-IgG-Antikörper (1:500, Dianova), inkubiert.

Schließlich wurde das Färbeverfahren wie in den Methoden von Lütt et al. 2018 beschrieben durchgeführt (56).

In Fällen, in denen eine Probe eine Reaktivität auf Rattenhirnstrukturen zeigte, wurde die Reproduzierbarkeit durch eine zweite Färbung an nicht-fixierten Mausgehirnschnitten überprüft. Hier wurde eine Blockierung mit 5% normalem Ziegenserum und 2% Rinder-serumalbumin ohne jegliche Permeabilisierung durchgeführt. Als Sekundärantikörper diente Alexa Fluor 488-markiertes Ziegen-Anti-Human-IgG (1:1000, Dianova, Hamburg). Die Fluoreszenzsignale wurden daraufhin mit einem Olympus CKX41 Zellkulturmikroskop mit verschiedenen Filterkombinationen untersucht. Die Bilder wurden mit einem LEICA DMI8 Mikroskop aufgenommen. Zwei erfahrene Histolog*innen bewerteten die Färbungen, wobei zunächst ein halbquantitativer Fluoreszenz-Score (0-3) verwendet wurde, um die Färbungen mit dem ausgeprägtesten Signal zu identifizieren (55). In diesem Punktesystem entspricht "0" keiner Fluoreszenzreaktivität, ähnlich wie bei einer repräsentativen Negativkontrolle, während "1" für eine schwache, "2" für eine mäßige und "3" für eine sehr hohe Reaktivität steht, vergleichbar mit einer repräsentativen Antikörper-positiven Kontrolle. Färbungen mit einer Punktzahl von 2 oder höher wurden als Antikörper-positiv eingestuft und für die weitere Auswertung nach primär qualitativen Kriterien ausgewählt.

2.3.2 Zell-basierte Assays

Zellbasierte Tests wurden von der AG Euroimmun (Lübeck, SH, Deutschland) unter Verwendung transfizierter HEK-293-Zellen durchgeführt, um gängige IgG-Autoantikörper zu bestimmen.

Dazu gehörten Antikörper gegen alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure(AMPA)-Rezeptor 1+2, Amphiphysin, Aquaporin-4 (AQP4), Natrium/Kalium-transportierende ATPase-Untereinheit alpha-3 (ATP1A3), CARP VIII, Caspr2, Collapsing response mediator protein 5 (CRMP5/CV2), Delta-and-notch-like-epidermal-growth-factor-related-receptor (DNER), Dipeptidyl-peptidase-like-protein-6 (DPPX), ELKS/rab6-interacting/CAST-family member 1 (ERC1), Flotillin 1, Gamma-Aminobuttersäure(GABA)-A+B-Rezeptor, GAD65, GFAP, ionotroper Glutamatrezeptor, Untereinheit 2 vom Delta-Typ (GluRD2), metabotroper Glutamatrezeptor(GRM) 1+5, Glycinrezeptor (GlyR), Homer-Protein-Homolog 3 (Homer3), Hu (Anna1), IgLON-Familienmitglied 5 (IgLON5), Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor Typ 1 (ITPR1), LGI1, Ma2, Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), NMDA-R, Neurexin, Neurochondrin, Recoverin, Ri (Anna2), ras-homologue-GTPase (Rho-GTPase), Yo und Zink-Finger-Protein-4 (Zic4) (55).

Um das Auftreten falsch-positive Fälle zu minimieren, wurden Liquorproben mit einem Titer $\geq 1:1$ und Serumproben mit einem Titer $\geq 1:100$ als positiv definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der klinischen Daten

3.1.1 Demografische Merkmale der Patienten- und Kontrollkohorte

Die Patientinnen- und Patientenkohorte bestand aus 39 erwachsenen Patientinnen und Patienten (Durchschnittsalter $45 \pm 16,4$ Jahre [SD]) zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme. Frauen machten 38,5 % dieser Gruppe aus, insgesamt 15, und waren im Durchschnitt 37,7 Jahre alt (SD ± 16). Die übrigen 61,5 % waren Männer mit 24 Teilnehmern und einem Durchschnittsalter von 50,2 Jahren (SD ± 15). Die Kontrollgruppe mit einem Durchschnittsalter von 47,5 Jahren (SD ± 19) umfasste 7 Frauen (29% der Gruppe) mit einem Durchschnittsalter von 40,3 Jahren (SD ± 20) und 17 Männer (71% der Gruppe) mit einem Durchschnittsalter von 50,5 Jahren (SD ± 18) (55).

3.1.2 Anfallsklassifikation Epilepsiediagnose und Art der Epilepsie

Die routinemäßige Epilepsiediagnostik, durchgeführt während des initialen stationären Aufenthalts, ergab bei der Mehrheit (28, 71,8%) der Patientinnen und Patienten (39) die Diagnose eines Anfalls unbekannter Ätiologie, gefolgt von der Diagnose einer Epilepsie unbekannter Ätiologie bei 10 Patientinnen und Patienten (23,3%). Bei einer Person (2,6%) wurde ein psychogener nicht-epileptischer Anfall (PNES) diagnostiziert (Abb. 1) (55).

Ätiologisch unbekannte Anfälle wurden weiter unterteilt in generalisiert, und fokal (nicht bewusst erlebt fokal, bewusst fokal und fokal mit Übergang zu bilateral tonisch-klonisch) und unklassifiziert. Ebenso wurden Epilepsien unbekannter Ätiologie weiter unterteilt in generalisiert, kombiniert generalisiert, fokal (nicht bewusst erlebt fokal, bewusst fokal und fokal mit Übergang zu bilateral tonisch-klonisch) und unklassifiziert.

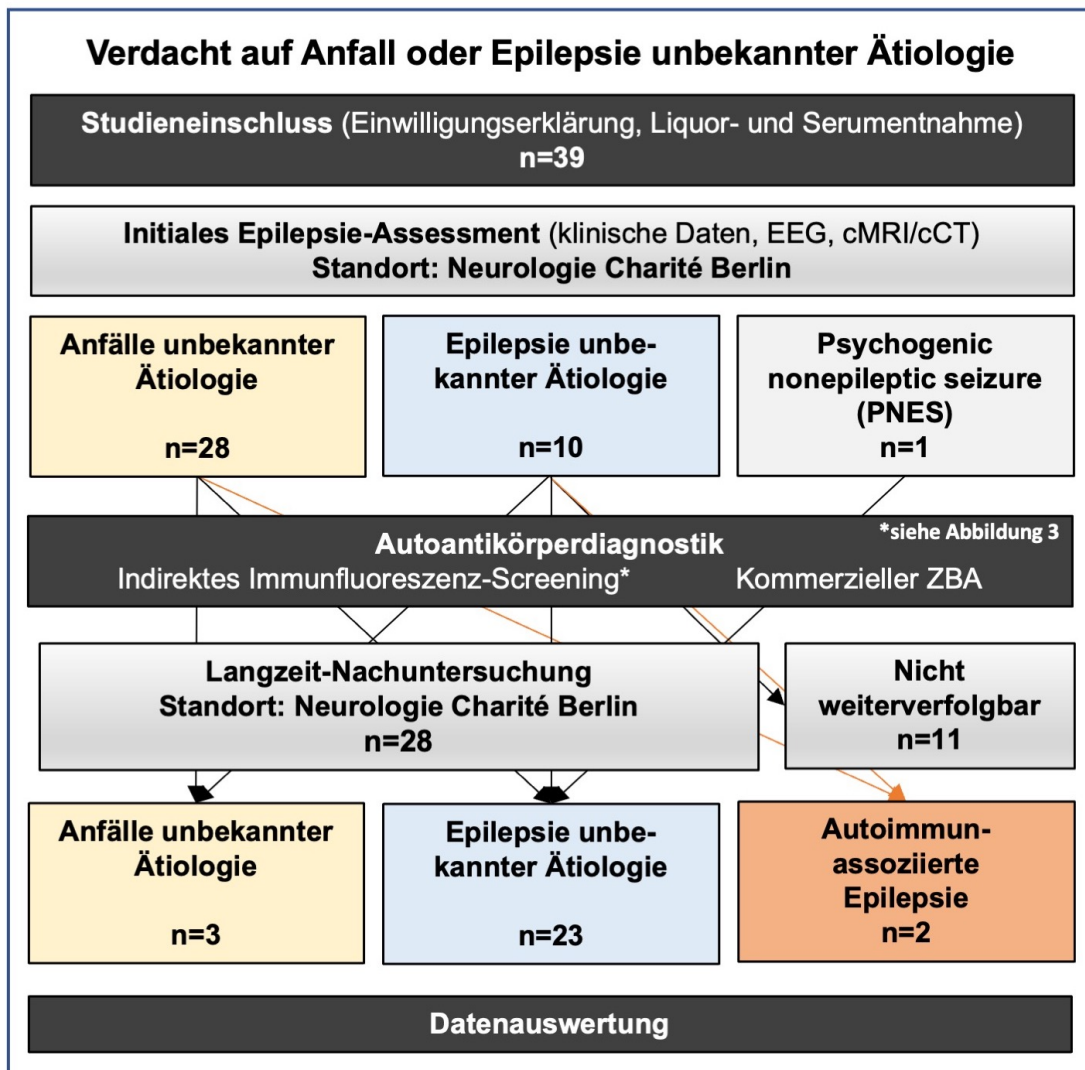


Abbildung 1: Studiendesign, durchgeführte Testverfahren und diagnostische Klassifikation vor und nach der Langzeitnachuntersuchung. Quellenangabe: (55); übersetzt durch die Autorin

Die Mehrheit der Anfälle unbekannter Ätiologie wurde als generalisiert ($n=15$; 53,6%) dokumentiert, gefolgt von nicht bewusst erlebt fokal ($n=9$; 32,1%) und fokalen mit Übergang zu bilateral tonisch-klonischen Anfällen ($n=4$; 14,3%) (Tabelle 1).

Epilepsien unbekannter Ätiologie ($n=10$) wurden am häufigsten als nicht bewusst erlebt fokal ($n=3$; 30%) und fokale bis bilaterale tonisch-klonische Anfälle ($n=3$; 30%) beschrieben (55).

Das Auftreten von kombinierten fokalen und generalisierten Anfällen ($n=2$; 20%) und generalisierten Anfällen ($n=2$; 20%) war bei den Epilepsien gleichmäßig verteilt.

Für beide Diagnosegruppen wurden keine bewussten fokalen Anfälle erfasst. Alle Anfälle und Epilepsien konnten klassifiziert werden, sodass keine unklassifizierten Epilepsien dokumentiert wurden (Tabelle 1).

Für 28 Patientinnen und Patienten (71,8%) waren Nachverfolgungsdaten über die elektronischen Patientenakten zugänglich.

Nach Abschluss des Nachbeobachtungszeitraums war die häufigste Diagnose für diese Kohorte Epilepsie unbekannter Ätiologie (n=23; 59%), während ätiologisch unbekannte epileptische Anfälle (n=3) bei 10,2 % lagen (Abb. 1).

Zwei Personen (5,1%) wurden durch die elektronische Nachverfolgung sowie die Autoantikörper-Testergebnisse reklassifiziert als autoimmun-assoziierte Epilepsie. Bei der Person A23 (2,6%) zeigte die Nachverfolgung, dass im klinischen Verlauf eine Anti-NMDA-R-Enzephalitis diagnostiziert worden war, die sich zunächst als fokale mit Übergang zu bilateral tonisch-klonischen Anfällen unbekannter Ätiologie darstellte. Bei der anderen Person B1 (2,6%) wurde zunächst ein generalisierter Anfall unbekannter Ursache diagnostiziert. Die Autoantikörper-Testverfahren ergaben jedoch sowohl im Liquor als auch im Serum hohe Titer von GFAP-Autoantikörpern (Liquor 1:3,2; Serum 1:1000), sodass aufgrund der Titer retrospektiv eine Neueinstufung dieser zwei Personen als autoimmun-assoziierte Epilepsie erfolgte (55).

3.1.3 EEG und Bildgebung des Gehirns

Als Teil der stationären Epilepsiediagnostik wurde bei allen 39 Probandinnen und Probanden ein Routine-EEG aufgezeichnet, wobei bei 10 Patientinnen und Patienten (25,6%) Anomalien festgestellt wurden. Zu den Befunden gehörten regionale Verlangsamung (n=7), generalisierte epileptiforme Entladungen (n=2) und periodische lateralisierte epileptiforme Entladungen (n=1) (**Tabelle 1**). Bei 38 Probandinnen und Probanden wurde ein kraniales MRT und bei einer Person ein cCT durchgeführt, während bei einer weiteren Person keine kraniale Bildgebung durchgeführt wurde. Elf Personen (31%) wiesen sichtbare Veränderungen auf, der häufigste Befund war eine mikrovaskuläre Leukenzephalopathie (n=8). Drei Patientinnen und Patienten (21,4%) zeigten ein leichtes, vermutlich postiktiales hippocampales Ödem (55).

3.1.4 Weitere klinische Daten

Informationen zu Begleiterkrankungen (Autoimmunerkrankungen, neuro-psychiatrische Erkrankungen, Tumorerkrankungen) und zur immunsuppressiven Medikation wurden für

alle 39 Personen dokumentiert (Tabelle 1). Lediglich drei (11,1%) Patientinnen und Patienten hatten Autoimmunerkrankungen, darunter ein Fall von Multipler Sklerose, ein Fall von Hashimoto-Thyreoiditis und ein Fall von Diabetes mellitus Typ 1.

Neuropsychiatrische Komorbiditäten traten bei einem Drittel der Patientinnen und Patienten auf (n=13; 33,3%), darunter Polytoxikomanie (n=3), Alkoholabhängigkeit (n=2), Panikstörung (n=2), Depression (n=1), Schizophrenie (n=1), Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS; n=1), dissoziative Anfälle (n=1), multiple Sklerose (n=1) und Dysosmie (n=1). Keine der Personen hatte in den sechs Monaten vor seiner Aufnahme einer Immuntherapie erhalten (55).

Bei der stationär-klinischen Untersuchung konnte bei drei Patientinnen und Patienten (7,7%) ein Tumor diagnostiziert werden. Hierbei handelte es sich um ein kleinzelliges Lungenkarzinom (A8), ein großzelliges Lungenkarzinom (A19) und ein ovarielles Teratom (A23).

In der Gegenüberstellung der positiv-getesteten Patientinnen und Patienten zu Autoantikörper-negativen Patientinnen und Patienten fiel auf, dass das Auftreten von Tumoren bei der positiven Kohorte statistisch signifikant war ($p=0,007$; Chi-Quadrat-Test) (55).

Tabelle 1: Demografische Daten, Anfalls- und Epilepsieklassifikation, EEG, kranielle Bildgebung und Komorbiditäten nach dem initialen Epilepsie-Assessment. Quellenangabe: (55); übersetzt und angepasst durch die Autorin.

<i>Klinische Daten</i>	<i>Positive Kohorte n (%)</i>	<i>Negative Kohorte n (%)</i>	<i>Gesamtkohorte n (%)</i>	<i>p-Wert (T-Test or Chi-Quadrat Test)</i>
1) Gesamtanzahl	12 (30,8)	27 (69,2)	39	-
2) Durchschnittsalter (± Standardabweichung)	51 ± 17,1	43 ± 15,9	45 ± 16,4	0,11
3) Weiblich:Männlich	3:9	12:14	15:24	0,25
4) Anfalls- und Epilepsieklassifikation				
<u>4.1.) ätiologisch unklare Anfälle</u>	10 (83,3)	18 (66,67)	28 (71,8)	0,29
a. Bewusst fokal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
b. Nicht bewusst erlebt fokal	2 (20)	7 (38,9)	9 (32,1)	
c. Fokal mit Übergang zu bilateral tonisch-klonisch	2 (20)	2 (11,1)	4 (14,3)	
d. Generalisiert	6 (60)	9 (50)	15 (53,6)	
<u>4.2.) Epilepsie unklarer Ätiologie</u>	2 (16,7)	8 (29,6)	10 (23,3)	0,01
a. Bewusst fokal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
b. Nicht bewusst erlebt fokal	1 (50)	2 (25)	3 (7)	
c. Fokal mit Übergang zu bilateral tonisch-klonisch	0 (0)	3 (37,5)	3 (7)	
d. kombiniert fokal und generalisiert	1 (50)	1 (12,5)	2 (4,7)	
e. Generalisiert	0 (0)	2 (25)	2 (4,7)	
<u>4.3) Psychogener nicht-epileptischer Anfall (PNES)</u>	0 (0)	1 (3,7)	1 (2,3)	0,5
5) Abnormales EEG	2 (16,7)	8 (29,6)	10 (25,6)	0,15
a. Regionale Verlangsamungen	1 (50)	6 (75)	7 (70)	
b. Generalisierte epileptiforme Entladungen (GED)	1 (50)	1 (12,5)	2 (20)	
c. Periodische lateralisierte epileptische Entladungen (PLED)	0 (0)	1 (12,5)	1 (10)	
6) Abnormales cMRT/cCT	2 (16,7)	9 (34,6) (n=26)	11 (31) (n=38)	0,26
a. Mikrovaskuläre Leukoencephalopathie	1 (50)	7 (77,8)	8 (72,7)	
b. Leichtes postiktales hippocampales Ödem	1 (50)	2 (22,2)	3 (27,3)	

7) Immunosuppressiva	0 (0)	1 (3,7) (Dimethylfumarat)	1 (2,6)	0,5
8) Autoimmune Nebenerkrankungen	0	3 (11,11) (Hashimoto Thyroiditis, Diabetes mellitus Typ1, multiple Sklerose)	3 (7,7)	0,3
9) Tumorerkrankungen	3 (25) (Großzelliges Lungenkarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Teratom)	0 (0)	3 (7,7)	0,007
10) Neuro-psychiatrische Nebenerkrankungen	4 (33,3)	9 (33,3)	13 (33,3)	1,0
a. Polytoxikomanie	1 (25)	2 (22,2)	3 (23,1)	
b. Alkoholabhängigkeit	2 (50)	0 (0)	2 (15,4)	
c. Panikstörung	0 (0)	2 (22,2)	2 (15,4)	
d. Depression	0 (0)	1 (11,1)	1 (7,7)	
e. Schizophrenie	0 (0)	1 (11,1)	1 (7,7)	
f. Aufmerksamkeitsdefizit Hyperaktivitätsstörung	0 (0)	1 (11,1)	1 (7,7)	
g. Dissoziative Anfälle	0 (0)	1 (11,1)	1 (7,7)	
h. Multiple Sklerose	0 (0)	1 (11,1)	1 (7,7)	
i. Dysosmie	1 (25)	0 (0)	1 (7,7)	

3.2 Autoantikörper-Befunde

Von den 39 Patientinnen und Patienten wiesen 12 Personen (30,8 %) Autoantikörper im Liquor cerebrospinalis auf. Bei sieben wurden Autoantikörper ausschließlich durch IIF nachgewiesen, bei einem hingegen ausschließlich durch den ZBA und bei vier Patientinnen und Patienten durch beide Tests (Tabelle 2). Hier fiel auf, dass der IIF-Test im Serum von nur vier der 12 Liquor-positiven Patientinnen und Patienten (33,3%) positive Ergebnisse lieferte, was auf eine höhere Häufigkeit oder bessere Sensitivität von Autoantikörpern im Liquor im Vergleich zum Serum hinweist ($p=0,054$; Chi-Quadrat-Test). Eine Serumprobe (4,2%) aus der Kontrollgruppe wies eine starke Bindung an neuronale Zell-

kernantigene auf und erfüllte damit die Positiv-Kriterien der IIF. Von gesunden Probandinnen und Probanden waren keine Liquorproben, sondern nur Seren verfügbar. Beim Vergleich der Häufigkeit von Serum-Autoantikörpern zwischen der Kontrollgruppe und den Patientinnen- und Patientenkohorte wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt ($p=0,39$) (55).

Fünf Probandinnen und Probanden wiesen etablierte Autoantikörper auf, die mittels ZBA in ihrem Liquor oder Serum oder beidem nachgewiesen wurden (Tabelle 2). Hierzu zählten Autoantikörper gegen NMDA-Rezeptoren (A23 und A24: Liquor: $n=2$ mit Titern zwischen 1:10 und 1:32; Serum: $n=1$ bei 1:1000), GFAP (A36, B1: Liquor: $n=2$ bei 1:3,2; Serum: $n=2$ zwischen 1:1000 und 1:3200) und GAD65 (A31: Liquor: $n=1$ bei 1:1; Serum: $n=1$ bei 1:320). Eine Person (A8) wies im ZBA niedrige Serum-Autoantikörper gegen Caspr2 auf (1:32), was unter dem in der Studie festgelegten Schwellenwert von 1:100 lag und daher als negativ gewertet wurde. Autoantikörper gegen AMPAR1+2, Amphiphysin, AQP4, AT1A3, CARPVIII, CV2, DNER, DPPX, ERC1, Flotillin 1, GABAAR, GABABR, GluRD2, GlyR, GRM1, GRM5, Homer3, Hu (Anna1), IgLON5, ITPR1, LGI1, Ma2, MOG, Neurexin, Neurochondrin, Recoverin, Ri (Anna2), RhoGTPase, Yo, und Zic4 wurden nicht nachgewiesen (55).

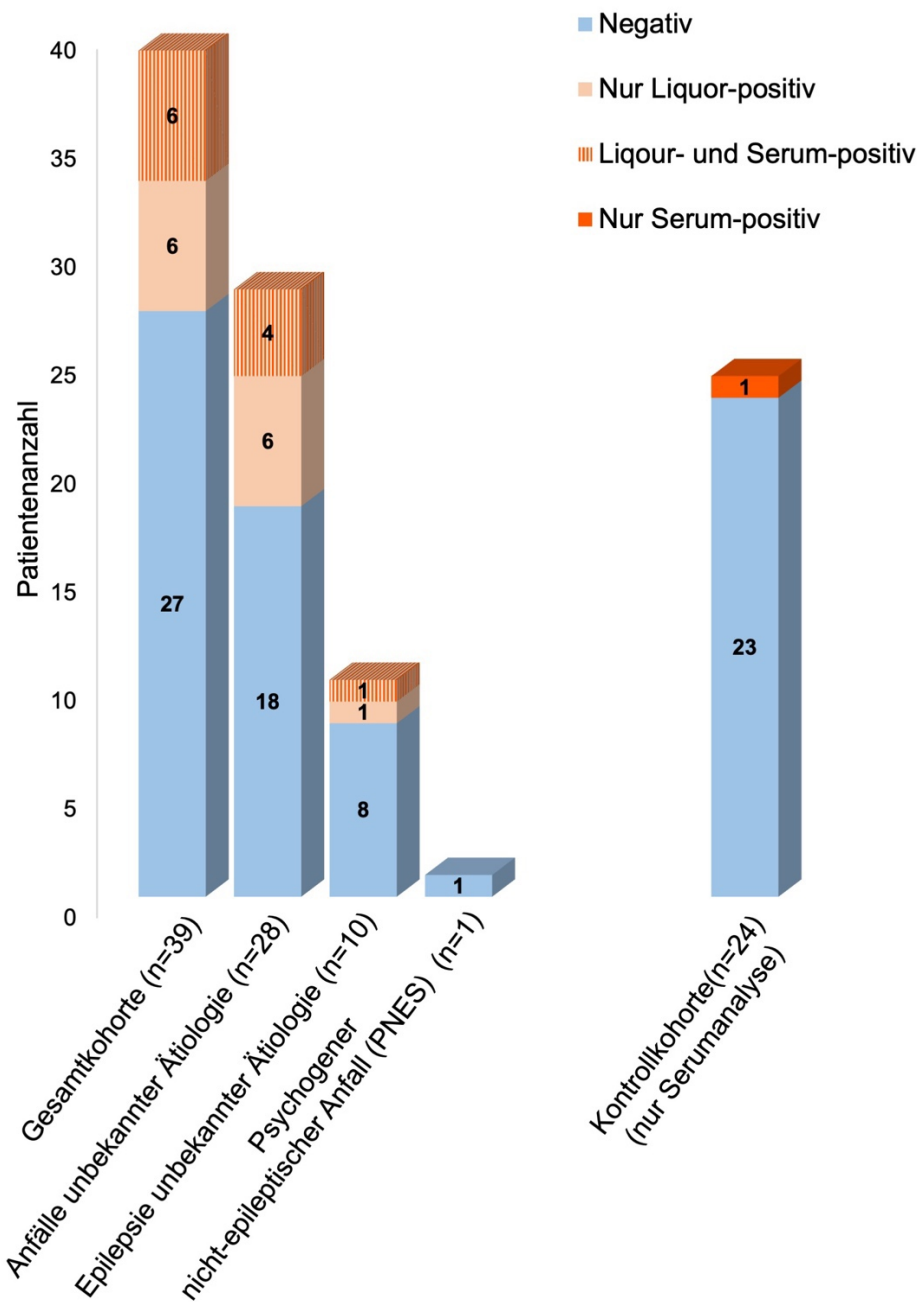


Abbildung 2: Autoantikörperfrequenz in den unterschiedlichen diagnostischen Gruppen. Quellenangabe: (55); übersetzt durch die Autorin.

Tabelle 2: Detaillierte Ergebnisse der indirekte Immunfluoreszenz und der Zell-basierten Assays für alle positiv-getesteten Personen sowie deren Diagnose vor und nach der Langzeituntersuchung. Autoantikörper-positive Befunde sind fett hervorgehoben. Quellenangabe: (55); übersetzt und angepasst durch die Autorin.

Patientennummer	Färbemuster IIF Liquorprobe	Färbemuster IIF Serumprobe	ZBA: Liquortiter	ZBA: Seruntiter	Diagnose nach Erstaufnahme	Dauer der Nachuntersuchung (in Jahren)	Diagnose nach der Nachuntersuchung	Tumor-Diagnose
A2	Panzellulär: nukleär	Negativ	Negativ	Negativ	Ätiologisch unklarer Anfall (nicht bewusst fokal erlebt)	9	Nicht weiterverfolgbar	-
A8	Hirngefäße: Kapillaren	Negativ	Negativ	Negativ (1:32 Caspr2)	Ätiologisch unklarer Anfall (generalisiert)	9	Ätiologisch unklarer Anfall (generalisiert)	kleinzelliges Lungenkarzinom
A19	Panzellulär: nukleär	Panzellulär: nukleär	Negativ	Negativ	Ätiologisch unklarer Anfall (nicht bewusst fokal erlebt)	8	Ätiologisch unklarer Anfall (nicht bewusst fokal erlebt)	Großzelliges Lungenkarzinom
A23	NMDA-R-ähnlich	NMDA-R-ähnlich	1:10 (NMDA-R)	1:1000 (NMDA-R)	Ätiologisch unklarer Anfall (generalisiert)	8	Autoimmun-assoziierte Epilepsie	Ovarielles Teratom
A24	NMDA-R-ähnlich	Negativ	1:32 (NMDA-R)	Negativ	Ätiologisch unklarer Anfall (nicht bewusst fokal erlebt)	8	Nicht weiterverfolgbar	-
A25	Panzellulär: nicht-nukleär	Negativ	Negativ	Negativ	Ätiologisch unklarer Anfall (generalisiert)	8	Epilepsie unbekannter Ätiologie	-
A26	Hirngefäße: Kapillaren und kleine Gefäße	Negativ	Negativ	Negativ	Epilepsie unbekannter Ätiologie (kombiniert fokal und generalisiert)	8	Nicht weiterverfolgbar	-
A31	Negativ	Negativ	1:1 (GAD65)	1:320 (GAD65)	Epilepsie unbekannter Ätiologie (nicht bewusst fokal erlebt)	7	Epilepsie unbekannter Ätiologie	-

Patienten- nummer	Färbemuster IIF Liquorprobe	Färbemuster IIF Liquorprobe	ZBA: Liquortiter	ZBA: Serumtiter	Diagnose nach Erstaufnahme	Dauer der Nachunter- suchung (in Jahren)	Diagnose nach der Nachuntersuchung	Tumor- Diagnose
A32	Panzellulär: nicht-nukleär	Negativ	Negativ	Negativ	Ätiologisch unklarer Anfall (fokal mit Übergang zu bilateral tonisch- klonisch)	7	Epilepsie unbekannter Ätiologie	-
A36	Astrozytär (GFAP, Myelin)	Astrozytär (GFAP, Myelin)	1:3.2 (GFAP)	1:3200 (GFAP)	Ätiologisch unklarer Anfall (generalisiert)	7	Ätiologisch unklarer Anfall (generalisiert)	-
A38	Hirngefäße: Kapillaren	Negativ	Negativ	Negativ	Ätiologisch unklarer Anfall (fokal mit Übergang zu bilateral tonisch- klonisch)	7	Nicht weiterverfolgbar	-
B1	Astrozytär (GFAP)	Astrozytär (GFAP)	1:3.2 (GFAP)	1:1000 (GFAP)	Ätiologisch unklarer Anfall (generalisiert)	8	Autoimmun-assoziierte Epilepsie	-

Der Nachweis von Anti-NMDA-R-Autoantikörpern erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz an fixierten Hirnschnitten von Ratten sowie unfixierten Hirnschnitten von Mäusen, die ein spezifisches Gewebefärbemuster aufwiesen (Abb. 3A; A23, A24). In ähnlicher Weise zeigten Proben, die positiv auf Anti-GFAP-Autoantikörper reagierten (A36, B1), das charakteristische astrozytäre Muster im Gehirn, welches Astrozyten der weißen Substanz und Bergmann-Glia umfasst (Abb. 3B). Wie bei einem Screening-Test für potenziell neue Autoantikörper zu erwarten ist, zeigten sieben Liquorproben (A2, A8, A19, A25, A26, A32, A38) eine Reaktivität mit zusätzlichen Autoantigenen, z. B. mit Hirngefäßen, die sich von Kapillaren bis zu größeren Gefäßen erstrecken (Abb. 3C), oder mit myelinisierten Fasern in Fasertrakten der weißen Substanz und um Purkinje-Neurone im Kleinhirn (Abb. 3D). Bei vier Patientinnen und Patienten konnten Autoantikörper nachgewiesen werden, die an neuronale Kernantigene im gesamten Gehirn binden, wie ihre Lokalisierung in der Kleinhirnrinde beispielhaft zeigt (Abb. 3E). Darüber hinaus wurden zytoplasmatische Bindungsmuster an Purkinje-Neuronen beobachtet, die sowohl die proximalen Dendriten als auch andere Regionen umfassen (Abb. 3F) (55).

Insgesamt erfüllten 11 Patientinnen und Patienten (A2, A8, A19, A23, A24, A25, A26, A32, A36, A38, B1) die Kriterien für eine Autoantikörperpositivität im Liquor auf der Grundlage der indirekten Immunfluoreszenz (Tabelle 2).

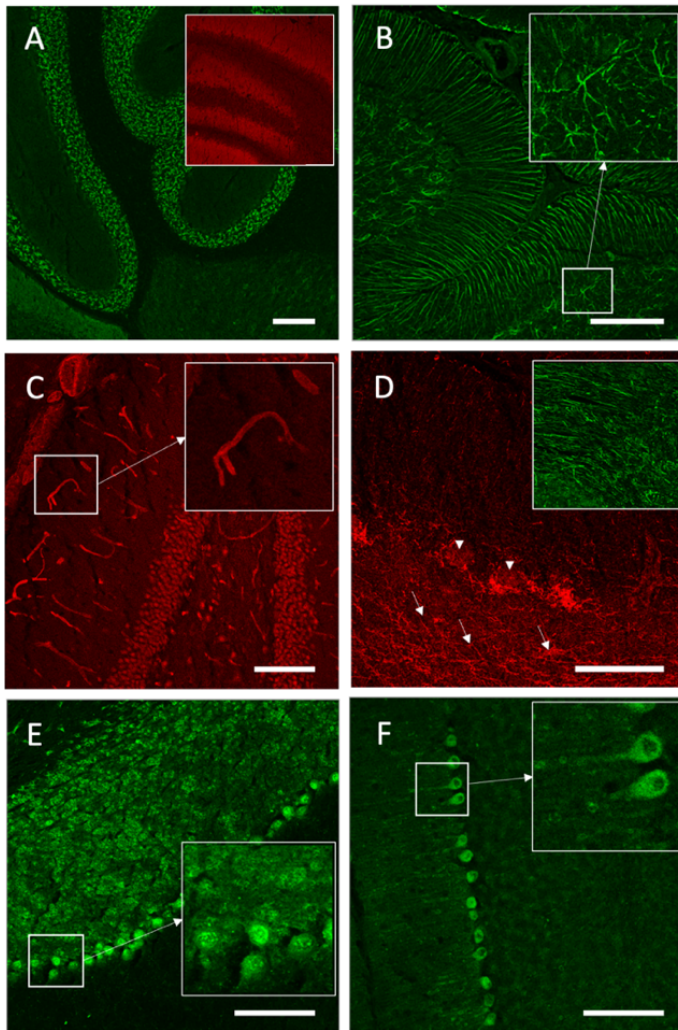


Abbildung 3: Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz an unfixierten Hirnschnitten von Mäusen. (A) Die Liquorprobe von Person A24 zeigt eine starke Bindung von Kleinhirn-Körnerzellen und Neuropil im Hippocampus (kleines Bild), was das charakteristische Anti-NMDA-R-Autoantikörpermuster widerspiegelt. (B) Charakteristisches astrozytäres Muster im Gehirn bei Anti-GFAP-AK-positiver Liquorprobe von Person B1; einschließlich der Bergmann-Glia und Astrozyten der weißen Substanz (kleines Bild: sternförmige Formation). (C) Die Liquorprobe von Person A38 zeigt eine starke Bindung an Hirngefäße (kleines Bild: höhere Vergrößerung einer Kapillare). (D) Die Serumprobe von Person A36 präsentiert eine Bindung an myelinisierte Fasern in den Bahnen der weißen Substanz (kleines Bild), in der weißen Substanz des Cerebellums (Pfeile) und um die Purkinje-Neurone des Cerebellums (Pfeilspitzen). (E) Bindung an Zellkernantigene von Neuronen in der Kleinhirnrinde bei der Serumprobe von Person A19 (kleines Bild: Purkinje-Zellschicht). (F) Liquorprobe von Person A32 mit zytoplasmatischen Bindungsmuster bei Purkinjezellen, einschließlich proximaler Dendriten (kleines Bild). Maßstab/Balken: (A-C,E,F) 100 μm ; (D) 50 μm . Quellenangabe: (55); übersetzt und angepasst durch die Autorin.

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung

Ziel dieser retrospektiven Analyse war es, sowohl die Frequenz von Autoantikörpern als auch den Anteil an autoimmun-assoziierten Epilepsien bei Patientinnen und Patienten mit ätiologisch unbekanntem Anfällen oder Epilepsie unbekannter Ätiologie untersuchen. Hierbei konnten mehrere wichtige Ergebnisse festgestellt werden:

- (1) Für mehr als eine von vier Personen (30,8%) aus der Kohorte konnten Autoantikörper im Liquor nachgewiesen werden, die nicht nur auf etablierte, sondern auch auf neue neuronale Antigene abzielten (55).
- (2) Die Langzeitnachsuntersuchung und das Autoantikörperscreening führten in Kombination bei zwei Patientinnen und Patienten (5,1%) zu einer Neueinstufung der Ätiologie und der Klassifikation als autoimmun-assoziierte Epilepsie (55).
- (3) Autoantikörper waren im Liquor häufiger zu finden als im Serum bei den Patientinnen und Patienten (55).
- (4) Tumore waren signifikant höher in der Autoantikörper-positiven Kohorte im Vergleich zur Autoantikörper-negativen Kohorte (55).

4.2 Prävalenz von Autoantikörpern und die Diagnose einer autoimmun-assoziierten Epilepsie

In der Kohorte mit Liquor-Autoantikörpern wurden fünf Patientinnen und Patienten auf etablierte Autoantikörper positiv getestet. Diese waren: Anti-NMDA-R- (n=2; A23, A24), Anti-GAD-65 (n=1, A32) und Anti-GFAP-Autoantikörper (n=2; A36, B1), aufgrund derer in Zusammenschau mit dem klinischen Verlauf zwei dieser Patientinnen und Patienten (A24, B1) als autoimmun-assoziierte Epilepsien umklassifiziert worden.

Die Assoziation zwischen diesen Autoantikörpern und dem Auftreten von Anfällen sowie die Entscheidung, zwei Fälle als autoimmun-assoziierte Epilepsie neu zu klassifizieren, werden im Folgenden diskutiert:

4.2.. Anti-NMDA-R-Autoantikörper

Anti-NMDA-R-AK sind mit 4,8% die am häufigsten nachgewiesenen Autoantikörper in der Epilepsiepopulation (53). Im Zusammenhang mit einer Anti-NMDA-R-Enzephalitis treten

in schätzungsweise 75% aller Fälle epileptische Anfälle auf (51, 54). Angesichts der Prävalenz dieser AIE (54) sind umfangreiche Forschungsarbeiten seit der Entdeckung Mitte der 2000er Jahre durchgeführt worden, um den Pathomechanismus zu verstehen, der das Auftreten von epileptischen Anfällen und das Vorhandensein von Anti-NMDA-R-AK erklärt (15, 19-23). Diese Studien weisen darauf hin, dass die Internalisierung des NMDA-R - verursacht durch die Bindung des AKs - die neuronale Funktion des NMDA-R stört. Somit haben die AK eine direkte, reversible Wirkung auf die neuronale Funktion (57). Als Konsequenz dieser Dysfunktion können eine Reihe von Symptomen auftreten- auch epileptische Anfälle- sodass eine direkte Verbindung zwischen dem Auftreten von epileptischen Anfällen und dem Vorhandensein von Anti-NMDA-R-AKs besteht.

Daher ist für die Diagnosestellung (in Kombination mit der Klinik) die Antikörperdiagnostik besonders wichtig, wobei das Vorhandensein der AK im Liquor von entscheidender Bedeutung zu sein scheint: Mehrere Studien (15, 57-60) konnten feststellen, dass, wenn diese AK im Liquor nachweisbar sind, eine hohe Spezifität für Anti-NMDA-R-Enzephalitis besteht. Darüber hinaus weisen diese Studien auf eine Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf der Erkrankung und dem Liquortiter der Anti-NMDA-R-AK hin, was die wesentliche Rolle der Liquoranalyse sowohl für die Diagnose als auch für die Prognose noch einmal hervorhebt.

In der Studienkohorte wiesen zwei Personen (A23, A24) sowohl im Liquor (A23: 1:10; A24: 1:32) als auch im Serum (A23: 1:100) hohe Anti-NMDA-R-AK-Titer im ZBA auf, die mit dem positiven (NMDA-R-ähnlichen) Färbemuster in der IIF übereinstimmten, was in beiden Fällen stark auf eine autoimmun-assoziierte Epilepsie als Folge einer Anti-NMDA-R-Enzephalitis schließen lässt.

Eine Weiterverfolgung des klinischen Verlaufs war für Person A24 aufgrund der fehlenden Betreuung an der Charité nicht möglich, sodass eine umfassende Einschätzung des klinischen Verlaufs und somit eine endgültige Diagnose nicht möglich war.

Bei Person A23 konnte im klinischen Verlauf eine Anti-NMDA-R-Enzephalitis diagnostiziert werden. Die zugrunde liegende AIE wurde mit einer entsprechenden Immuntherapie in der Charité behandelt. Da es im Verlauf wiederholt zu Anfällen kam und diese auch außerhalb der Akutphase der AIE auftraten, wurden diese Personen retrospektiv als autoimmun-assoziierte Epilepsie eingestuft.

4.2.2 Anti-GAD65-Autoantikörper

Im Gegensatz zu Anti-NMDA-R-Autoantikörpern ist der Zusammenhang zwischen Anti-GAD65-Autoantikörpern und epileptischen Anfällen komplexer und weit weniger eindeutig. Zahlreiche Veröffentlichungen haben die Assoziation von Anti-GAD-65-Antikörpern und epileptischen Anfällen im Zusammenhang mit einer Form der Autoimmunenzephalitis (28) sowie chronischer Epilepsie (61) nahegelegt.

Tatsächlich konnte eine aktuelle Metaanalyse (53) zeigen, dass hochtitrige Anti-GAD65-Autoantikörper -insbesondere, wenn sie im Liquor gefunden werden- bei etwa 3.7% aller Epilepsiepatientinnen und -patienten auftreten, einschließlich chronischer, behandlungsrefraktärer Fälle (53, 61, 62).

Trotzdem scheinen GAD-65-Antikörper mit niedrigem Titer (definiert als Serumspiegel unter 20 nmol/L (63) auch mit einer Häufigkeit von 0,7- 4,8% in der Allgemeinbevölkerung aufzutreten, wie mehrere Studien gezeigt haben; ebenso treten sie gehäuft bei Diabetes mellitus Typ1 auf (64).

Darüber hinaus ist die direkte Pathogenität dieser Autoantikörper noch nicht endgültig nachgewiesen, was im Zusammenhang mit der intrazellulären Lokalisierung des Antigens GAD65 steht (dem Enzym, das die Synthese von Gamma-Aminobuttersäure katalysiert).

Es wird angenommen (17, 45, 62, 65), dass bei einer Enzephalitis, die mit hochtitrigen Anti-GAD65-Autoantikörpern einhergeht, die Symptome (u.a. epileptische Anfälle) in erster Linie durch zytotoxische T-Zellen vermittelt werden, wobei GAD65-AK eher als immunologische Biomarker wirken.

Daher bleibt die eindeutige Rolle dieser AK im Zusammenhang mit der Pathogenese von AIE, aber auch bei der Epileptogenese ungeklärt.

In dieser Studie konnten bei einer Person (A31) Anti-GAD-65-Autoantikörper im ZBA nachgewiesen werden. Zwar zeigte die Langzeitnachuntersuchung Folgeanfälle im klinischen Verlauf, da jedoch die im ZBA nachgewiesenen Titer niedrig ausfielen ((Liquor 1:1; Serum 1:320) und die IIFs negativ blieb, stufen wir diesen Fall retrospektiv nicht als autoimmun-assoziierte Epilepsie ein.

4.2.3 Anti-GFAP-Autoantikörper

Ähnlich wie Anti-GAD65-Autoantikörper zielen Autoantikörper gegen GFAP auf ein intrazelluläres Epitop. Sie wurden erstmals 2016 im Zusammenhang mit einer relativ neuen Form der Autoimmunenzephalitis, der Anti-GFAP-Astrozytopathie, beschrieben.

Während ein direkter Zusammenhang zwischen Anti-GFAP-AK und epileptischen Anfällen noch nicht geklärt ist (66), berichteten mehrere Studien (67-71) über Anfälle als häufiges Symptom im Rahmen der Anti-GFAP-Astrozytopathie, wobei der hier beschriebene Anteil zwischen 11 und 37% lag. Darüber hinaus konnte eine aktuelle, umfassende Metaanalyse eine GFAP-Antikörper-Häufigkeit bei Epilepsiepatientinnen und -patienten von 0,5% feststellen (53). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Assoziation dieser Autoantikörper mit Anfällen besteht.

In Bezug auf die Antikörperdiagnostik konnten Studien zeigen (66-69, 71), dass die Untersuchung des Liquors auf GFAP-Autoantikörper eine wichtige Rolle bei der Diagnostik spielt. Der Nachweis von Anti-GFAP-AK im Liquor ist nicht nur entscheidend bei der Identifizierung einer Autoimmun-Anti-GFAP-Astrozytopathie (67, 72), sondern dient auch als zuverlässiger Biomarker für das Ansprechen dieser Patientinnen und Patienten auf eine entsprechende Immuntherapie (72).

Zwei Personen der Kohorte (A36, B1) wiesen bei dem ZBA sowohl im Liquor als auch im Serum hohe Anti-GFAP-AK-Titer auf, die mit dem astrozytären Färbemuster in der IIF in Kongruenz stehen.

Die Diagnose der Anti-GFAP-Astrozytopathie wurde erstmals 2016 gestellt (67) und war daher 2015 nicht möglich, als diese beide Anti-GFAP-AK-positiven Personen gegen Anti-GFAP-AK im Rahmen dieser Studie getestet worden. Dennoch legen die Testergebnisse -in Zusammenschau mit den neuesten Erkenntnissen über eine GFAP-AK-vermittelte AIE- eine Assoziation der Anfälle mit den Anti-GFAP-AK nahe.

Die Langzeitnachuntersuchung zeigte bei Person A36 keine weiteren Anfälle, sodass hier keine Neueinstufung als autoimmun-assoziierte Epilepsie erfolgte.

Im zweiten Fall (B1) konnte die Langzeituntersuchung hingegen zeigen, dass trotz antikonvulsiver Therapie rezidivierende Anfälle auftraten, sodass in diesem Fall retrospektiv die Klassifikation als autoimmun-assoziierte Epilepsie erfolgte.

4.3 Die Bedeutung von Liquor in der Epilepsiediagnostik bei unklarer Ätiologie

Eine systematische Übersicht über Studien zur autoimmun-assoziierten Epilepsie (53) hat gezeigt, dass in den meisten klinischen Studien in erster Linie eine Serumanalyse zum Nachweis von Autoantikörpern durchgeführt wird, während nur 3,4% auch eine Untersuchung des Liquors (CSF) vornehmen. Die klinischen Standardverfahren umfassen in der Regel eine Kombination aus einem Blutscreening auf wenige, etablierte Antikörper und

einem routinemäßigen Liquorscreening auf Pleozytose, oligoklonale Banden und Entzündungsmarker. Eine Analyse auf etablierte Enzephalitis-AKs im Liquor wird nur durchgeführt, wenn bereits ein klinischer Verdacht auf eine AIE besteht.

Im Gegensatz dazu ermöglichte das Design dieser Studie in allen Fällen eine umfassende Blut- und Liquoranalyse, so dass ein breites Screening auf Immunreaktivität unabhängig vom Vorhandensein von Entzündungszeichen möglich war (d. h. auch bei Fehlen von Pleozytose, hohem Liquorprotein oder oligoklonalen Banden). Die Analyse ergab, dass 30,8% aller Patientinnen und Patienten positiv auf neuronale Autoantikörper im Liquor getestet wurden, wobei sowohl etablierte als auch neue AKs erfasst werden konnten.

Die Studienergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer routinemäßigen AK-Analyse im Liquor zusätzlich zur Serumuntersuchung bei der diagnostischen Bewertung von Patientinnen und Patienten mit ätiologisch unklaren Anfällen oder Epilepsie unbekannter Ätiologie.

Die Anwendung der IIF an sowohl transfizierten Zellen als auch an Schnitten von Nagetiergehirnen könnte den Grund dafür liefern, warum in der Kohorte der vorliegenden Studie eine erhöhte Prävalenz von AK festgestellt wurde im Vergleich zu vorangegangenen Epilepsie-Studien, die auch Liquorproben berücksichtigten (73-78). In diesen Studien lag die Autoantikörper-Frequenz im Liquor bei bis zu 16,8% (76).

Darüber hinaus zeigten die Testergebnisse der vorliegenden Studie eine höhere Reaktivität der Liquorproben im Vergleich zu den Serumproben, was die Annahme verstärkt, dass die Liquoranalyse ein wichtiges Medium ist, um eine autoimmun-bedingte Ätiologie zu untersuchen und aufzuklären.

Die Ergebnisse dieser Dissertation legen nahe, dass die Liquoranalyse auf Autoantikörper in der klinischen Routinediagnostik häufiger in Betracht gezogen werden sollte, weil damit die Nachweisrate potenziell pathogener Autoantikörper erhöht werden kann.

4.4 Tumor-Häufigkeit bei Autoantikörper-positiven Fällen und die Frage nach paraneoplastischen neurologischen Syndromen (PNS)

Paraneoplastische neurologische Syndrome (PNS) sind eine Gruppe seltener Erkrankungen, die bei einigen Tumorpatientinnen und -patienten auftreten können und sich in neurologischen Symptomen äußern. Sie werden durch Stoffwechselprodukte verursacht, die vom Tumor produziert werden oder durch eine körpereigene Immunreaktion gegen den

Tumor. Sie stehen zwar oft nicht im Zusammenhang mit den direkten Auswirkungen des Tumors oder seiner Metastasen, können jedoch in einigen Fällen die Erstmanifestation einer Tumorerkrankung darstellen (79). Obwohl der tatsächliche Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, spielen anti-neuronale Autoantikörper hier eine tragende Rolle bei der Entstehung der Symptome (79). Je nach Autoantikörper und Tumor, treten unterschiedliche neurologische Symptome auf, deren Spektrum breit gefächert ist (80). Auch wenn historisch die Erstbeschreibung eines PNS vermutlich über 135 Jahre zurückliegt (81), wurde -mit zunehmender Forschungsarbeit über Autoantikörper und die Charakterisierung von Autoimmunenenzephalitiden- 2004 erstmals ein Klassifikationssystem für PNS durch das „Paraneoplastic Neurological Syndrome Euronetwork“ veröffentlicht (82), das im Jahr 2021 durch eine internationale Konsensus-Gruppe aktualisiert wurde (Referenz #89 hier: Graus 2021). Seitdem sind paraneoplastische Syndrome Bestandteil der klinischen neurologischen Diagnostik, da eine frühe Detektion der Tumorerkrankung durch das Auftreten des PNS, eine frühzeitige und damit prognostische-günstigere Tumorthherapie bedeuten kann.

Das genaue Spektrum von Autoantikörpern, die im Zusammenhang mit paraneoplastischen Syndromen stehen, ist derzeit noch Gegenstand der aktuellen Forschung und wird laufend ergänzt. Zu den häufigsten paraneoplastischen neurologischen Syndromen gehören unter anderem die Limbische Enzephalitis (80, 83), die Paraneoplastische Kleinhirn-Degeneration (PCD) (79, 80, 84) und das Opsoklonus-Myoklonus-Syndrom (79, 85, 86).

Durch die Einführung von „Immunepilepsie“ durch die ILAE 2017, spielen Autoantikörpervermittelte Enzephalitiden, besonders die limbische Enzephalitis, zunehmend eine Rolle in der Epilepsiediagnostik.

Wie oben bereits erwähnt, können diese im Rahmen einer Tumorerkrankung auftreten, sodass -je nach AK und klinischem Bild- diagnostisch eine zugrundeliegende Tumorerkrankung untersucht und ausgeschlossen werden muss.

Die Datenanalyse im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten signifikant mehr Tumore in der AK-positiven Kohorte als in der negativen Kohorte feststellen ($p=0,007$), was darauf hindeutet, dass die oben beschriebene Assoziation zwischen Tumorerkrankungen und Autoantikörpern im Rahmen eines PNS denkbar wäre.

Zwei Personen (A8, A19) zeigten im unmittelbaren klinischen Verlauf ein kleinzelliges Bronchialkarzinom. Obwohl dieser Tumor häufig in Kontext mit einem PNS steht, zeigte

der umfangreiche ZBA für beide Personen keine Reaktivität gegen ein etabliertes Antigen. Die IIF ergab für A8 eine Färbung cerebraler Gefäße (vor allem der Kapillaren) und für A19 ein panzellaäres, nukleäres Bild. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt kein etabliertes paraneoplastisches Syndrom erkennen (87); sodass diese beiden Fälle nicht als paraneoplastisches Syndrom klassifiziert wurden.

Bei A24 jedoch wurde im unmittelbaren klinischen Verlauf ein ovarielles Teratom diagnostiziert; sowohl Alter (18 Jahre) bei Diagnose als auch das Geschlecht (weiblich) belegen die charakteristische paraneoplastische Ätiologie im Rahmen einer Anti-NMDA-R-Enzephalitis (23). Dies bestätigte sowohl die IIF als auch der ZBA, sodass bei dieser Person ein PNS diagnostiziert wurde.

4.5 Stärken und Schwächen der Studie

Diese Studie konnte mithilfe einer umfangreichen Liquor- und Serumanalyse sowie einer retrospektiven klinischen Datenanalyse bei 5,1% aller Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer eine autoimmun-assoziierte Epilepsie feststellen. Dennoch ist die Gesamtzahl der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer relativ gering, um verallgemeinernde Aussagen über die tatsächliche Frequenz von autoimmun-assoziierten Epilepsien treffen zu können. Sie beschreibt jedoch einen Trend, der in vorherigen Studienergebnissen (53) bereits festgestellt wurde und bestärkt diese Ergebnisse durch eine zusätzliche umfangreiche Liquoranalyse, die bisher nur in wenigen Studien auf diese Weise durchgeführt worden ist und die so in der klinischen Diagnostik bei Epilepsien unklarer Ätiologie in den wenigsten neurologischen Standorten durchgeführt wird. Hier sollten weitere prospektive Studien mit höherer Probandinnen- und Probandenzahl -und damit größerer statistischer Aussagekraft -diese Ergebnisse weiterverfolgen und überprüfen.

Hinzu kommt, dass die retrospektive Datenanalyse, die auf der Nutzung des elektronischen Datensystems der Charité beruht, für knapp ein Viertel der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer und ein Drittel der positiv-getesteten Patientinnen und Patienten aufgrund von fehlender Wiedervorstellung nicht weiter nachverfolgbar war. Aufgrund dessen ist für diesen Anteil der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer eine abschließende Evaluierung des klinischen Verlaufs mit den Antikörper-Befunden nicht möglich gewesen, was wie im Fall von Person A23 zur finalen Diagnose einer autoimmun-assoziierten Epilepsie hätte beitragen können. Kommende Studien sollten weitere Langzeit-Nachuntersuchungsmethoden wie zum Beispiel Telefon-Interviews oder elektronische Fragebögen

in Betracht ziehen, um umfangreichere Daten für die retrospektive Analyse zu gewährleisten.

Zwar konnten wir einen Trend vermerken, dass Serum-AK häufiger in der Patientinnen- und Patientenkohorte als in der gesunden Kohorte auftraten, jedoch können keine vergleichenden Aussagen über die Prävalenz von Liquor-AK zwischen diesen beiden Kohorten gemacht werden, da aufgrund der Invasivität einer Liquorpunktion keine Liquorproben von gesunden Probandinnen und Probanden entnommen wurden und dementsprechend nicht untersucht werden konnten.

Auch konnte die vorliegende Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Tumoren und dem Auftreten von Autoantikörpern in der Studien-Kohorte beschreiben. Folgestudien mit höherer Teilnehmerinnen- und Teilnehmeranzahl sollten hier den Zusammenhang von paraneoplastischen neurologischen Syndromen und Epilepsien unklarer Ätiologie weiter untersuchen.

Weiterhin konnte die vorliegende Studie eine AK-Frequenz im Liquor von 30,8% bei Patientinnen und Patienten mit Anfällen oder Epilepsie unklarer Ätiologie zeigen und liegt damit über den Ergebnissen vorheriger Epilepsie-Studien (73-78), in denen die AK-Frequenz im Liquor bei 16,8% lag. In dieser Studie wurden zwei Testfahren verwendet, um Autoantikörper nachzuweisen: indirekte Immunfluoreszenz sowie zellbasierte Assays. Hier könnten sowohl das breit-gefächerte Antigen-Panel der ZBA als auch die Sensitivität der IIF für noch unbekannte Antikörper eine Erklärung für die höhere Frequenz sein. Dennoch muss auch dies durch Studien mit umfangreicheren Teilnehmerinnen- und Teilnehmeranzahlen bestätigt werden.

Besonders mithilfe der IIF konnten bei sieben Patientinnen und Patienten in der Liquorprobe neue Autoantikörper ausfindig gemacht werden, die gegen bisher unbekannte Antigene binden, was das immense Forschungspotenzial in diesem Bereich andeutet. Künftige Studien sollten sich vorrangig mit der Identifizierung dieser reaktiven Antigene befassen und die potenzielle Pathogenität und Funktionalität der entsprechenden AK untersuchen. Zu den Ansätzen für diese künftigen Untersuchungen gehören Krankheitsmodelle in Tierstudien, die Verwendung monoklonaler Patienten-AK, Proteinarrays und Immunpräzipitation/Massenspektrometrie und die Erforschung weiterer Möglichkeiten zur Epitop-Identifikation.

5. Schlussfolgerungen

Ziel dieser retrospektiven Studie war es, autoimmun-assoziierte Epilepsien bei Patientinnen und Patienten mit ätiologisch unbekanntem Anfällen zu untersuchen und die mögliche Rolle von Autoantikörpern in der Ätiologie dieser Fälle zu beleuchten. Die Ergebnisse zeigen, dass Autoimmun-assoziierte Epilepsien 5,1% der Fälle unserer Kohorte mit ätiologisch unbekanntem Anfällen oder Epilepsien unbekannter Ätiologie ausmachen, was die Bedeutung autoimmuner Ursachen in der Diagnostik von Epilepsien unklarer Ätiologie unterstreicht.

Die AK-Frequenz im Liquor der Studienteilnehmerinnen und Teilnehmer von 30,8% deutet darauf hin, dass die Analyse des Liquors ein erhebliches Potenzial für die Beurteilung von Patientinnen und Patienten mit neu auftretenden Anfällen oder Epilepsien unbekannter Ätiologie birgt –insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Spezifität von einigen Antikörpern (zum Beispiel Anti-NMDA-R- oder Anti-GAD65-Autoantikörper) im Liquor erhöht ist und der frühzeitige Nachweis von Autoantikörpern entscheidend ist für eine zeitnahe Diagnose und damit die rechtzeitige Einleitung einer entsprechenden Behandlung. Denn bei der Diagnose einer autoimmun-assoziierten Epilepsie ist eine Immuntherapie über die standardgemäße antikonvulsive Behandlung hinaus prinzipiell möglich.

Die Verfügbarkeit AK-depletierender Immuntherapien unterstreicht die Bedeutung eines frühzeitigen Liquor-Screenings in klinischen Forschungszentren, um einen raschen Therapiebeginn zu ermöglichen, der letztlich zu besseren therapeutischen Ergebnissen bei dieser Diagnosegruppe führen könnte.

Künftige Studien sollten darauf abzielen, die Rolle von Autoantikörpern nicht nur bei Epilepsie, sondern auch bei neuronalen Autoimmunkrankheiten im weiteren Sinne zu erforschen, um die zugrunde liegenden Pathomechanismen aufzuklären und die damit verbundenen therapeutischen Ansätze zu optimieren. Außerdem sind prospektive klinische Studien erforderlich, um mögliche Unterschiede im klinischen Verlauf und in den allgemeinen Behandlungsergebnissen zwischen AK-positiven und AK-negativen Patientinnen und Patienten zu untersuchen. Intrazellulär bindende AK, wie z. B. GAD65-Autoantikörper stellen eine besondere Herausforderung dar, wenn es darum geht, ihre pathogene Rolle zu verstehen, da Patientinnen und Patienten hier häufiger Therapie-refraktär bleiben und die Rolle von zytotoxischen T-Zellen in diesem Zusammenhang immer noch nicht ausreichend erforscht ist.

Auch die pathogene Rolle von GFAP-AK im Zusammenhang mit autoimmun-assoziiertes Epilepsie und Autoimmun-Astrozytopathie muss weiter erforscht werden.

Da die Identifizierung weiterer Autoantikörper absehbar ist und das Verständnis der damit verbundenen Pathomechanismen weiter zunehmen wird, sind weitere Studien erforderlich, um die zugrunde liegenden Antigene und Strukturepitope zu identifizieren, die mit noch nicht charakterisierten Autoantikörpern assoziiert sind. Darüber hinaus sind funktionelle Assays und Untersuchungen der immunologischen Mechanismen, die die humorale Autoimmunität antreiben, erforderlich, um die Pathogenität dieser AK zu bestimmen. Ebenso sollten die aktuellen Konzepte zur immunvermittelten Epilepsie/autoimmun-assoziiertes Epilepsie optimiert werden, damit diese klar und einheitlich in den klinischen Alltag integriert werden können. Zusätzlich sollten hier zugehörige klinische Scores durch künftige Studien erarbeitet und etabliert werden, die unter anderem den klinischen Verlauf und das Autoantikörperprofil berücksichtigen, um die Diagnosestellung einer autoimmun-assoziiertes Epilepsie zu erleichtern und diese klar von symptomatischen Anfällen beruhend auf einer AIE abzugrenzen.

Wir gehen davon aus, dass sich in den nächsten Jahren neue Möglichkeiten der diagnostischen Bewertung und der individualisierten Therapie ergeben werden, die durch die rasch wachsenden diagnostischen Möglichkeiten wie Genetik oder Autoimmunität bestimmt werden.

Trotz der Notwendigkeit weiterer Forschungsarbeiten zur vollständigen Erschließung des Antikörperrepertoires bei Epilepsiepatientinnen und -patienten sowie dem Anteil der Patientinnen und Patienten, die bereits von den verfügbaren Immuntherapien profitieren könnten, ist es plausibel zu spekulieren, dass selbst niedrig-affin bindende Autoantikörper, die derzeit oft als unspezifisch gelten, an Bedeutung gewinnen könnten, wenn AK-spezifische Immuntherapien in die klinische Praxis gelangen.

Die Neueinstufung einer Person mit Anti-GFAP-Autoantikörpern als autoimmun-assoziiertes Epilepsie in dieser Studie ist ein passendes Beispiel für die laufenden Fortschritte auf diesem Gebiet. Auch wenn detaillierte experimentelle Studien zur Klärung der direkten Pathogenität von menschlichen Anti-GFAP-Autoantikörpern noch ausstehen (29), könnten die AK bereits als wertvolle Biomarker für die Früherkennung einzelner Patientinnen und Patienten mit autoimmun-assoziiertes Epilepsie dienen.

Literaturverzeichnis

1. 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.
2. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshe SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia.* 2014;55(4):475-82.
3. World Health Organization. *Epilepsy: a public health imperative.* Geneva: World Health Organization; 2019. <https://www.who.int/publications/i/item/epilepsy-a-public-health-imperative>. Accessed June 15th, 2023.
4. Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshé SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. 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.
5. Brodie MJ, Barry SJ, Bamagous GA, Norrie JD, Kwan P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. *Neurology.* 2012;78(20):1548-54.
6. Henning O, Lossius MI, Lima M, Mevag M, Villagran A, Nakken KO, Johannessen Landmark C. Refractory epilepsy and nonadherence to drug treatment. *Epilepsia Open.* 2019;4(4):618-23.
7. Feyissa AM, Lopez Chiriboga AS, Britton JW. Antiepileptic drug therapy in patients with autoimmune epilepsy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2017;4(4):e353.
8. Akyuz E, Koklu B, Ozenen C, Arulsamy A, Shaikh MF. Elucidating the Potential Side Effects of Current Anti-Seizure Drugs for Epilepsy. *Curr Neuropharmacol.* 2021;19(11):1865-83.
9. Jobst BC, Cascino GD. Resective epilepsy surgery for drug-resistant focal epilepsy: a review. *JAMA.* 2015;313(3):285-93.
10. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshe SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2017;58(4):512-21.
11. Thurman DJ, Begley CE, Carpio A, Helmers S, Hesdorffer DC, Mu J, Toure K, Parko KL, Newton CR. The primary prevention of epilepsy: A report of the Prevention Task Force of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.* 2018;59(5):905-14.

12. Kwan P, Brodie MJ. Early Identification of Refractory Epilepsy. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(5):314-9.
13. Vincent A, Buckley C, Schott JM, Baker I, Dewar BK, Detert N, Clover L, Parkinson A, Bien CG, Omer S, Lang B, Rossor MN, Palace J. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain*. 2004;127(Pt 3):701-12.
14. Dalmau J, Tüzün E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, Baehring JM, Shimazaki H, Koide R, King D, Mason W, Sansing LH, Dichter MA, Rosenfeld MR, Lynch DR. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol*. 2007;61(1):25-36.
15. Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Dalmau J. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology*. 2011;77(2):179-89.
16. Prüss H. Autoantibodies in neurological disease. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(12):798-813.
17. Dalmau J, Graus F. Antibody-Mediated Encephalitis. *N Engl J Med*. 2018;378(9):840-51.
18. van Coevorden-Hameete MH, de Graaff E, Titulaer MJ, Hoogenraad CC, Sillevius Smitt PA. Molecular and cellular mechanisms underlying anti-neuronal antibody mediated disorders of the central nervous system. *Autoimmun Rev*. 2014;13(3):299-312.
19. Moscato EH, Peng X, Jain A, Parsons TD, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Acute mechanisms underlying antibody effects in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Ann Neurol*. 2014;76(1):108-19.
20. Kreye J, Wenke NK, Chayka M, Leubner J, Murugan R, Maier N, Jurek B, Ly LT, Brandl D, Rost BR, Stumpf A, Schulz P, Radbruch H, Hauser AE, Pache F, Meisel A, Harms L, Paul F, Dirnagl U, Garner C, Schmitz D, Wardemann H, Pruss H. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain*. 2016;139(Pt 10):2641-52.
21. Prüss H, Dalmau J, Arolt V, Wandinger KP. [Anti-NMDA-receptor encephalitis. An interdisciplinary clinical picture]. *Nervenarzt*. 2010;81(4):396, 8, 400, passim.
22. Wright S, Hashemi K, Stasiak L, Bartram J, Lang B, Vincent A, Upton AL. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain*. 2015;138(Pt 11):3159-67.
23. Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangue T, Glaser C, Iizuka T, Honig LS, Benseler SM, Kawachi I, Martinez-Hernandez E, Aguilar E, Gresa-Arribas N, Ryan-

- Florance N, Torrents A, Saiz A, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* 2013;12(2):157-65.
24. van Sonderen A, Schreurs MW, Wirtz PW, Sillevs Smitt PA, Titulaer MJ. From VGKC to LGI1 and Caspr2 encephalitis: The evolution of a disease entity over time. *Autoimmun Rev.* 2016;15(10):970-4.
25. 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. *Brain.* 2010;133(9):2734-48.
26. Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus 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. *Lancet Neurol.* 2010;9(8):776-85.
27. Irani SR, Michell AW, Lang B, Pettingill P, Waters P, Johnson MR, Schott JM, Armstrong RJ, A SZ, Bleasel A, Somerville ER, Smith SM, Vincent A. Faciobrachial dystonic seizures precede Lgi1 antibody limbic encephalitis. *Ann Neurol.* 2011;69(5):892-900.
28. Malter MP, Frisch C, Schoene-Bake JC, Helmstaedter C, Wandinger KP, Stoecker W, Urbach H, Surges R, Elger CE, Vincent AV, Bien CG. Outcome of limbic encephalitis with VGKC-complex antibodies: relation to antigenic specificity. *J Neurol.* 2014;261(9):1695-705.
29. Shin YW, Lee ST, Shin JW, Moon J, Lim JA, Byun JI, Kim TJ, Lee KJ, Kim YS, Park KI, Jung KH, Lee SK, Chu K. VGKC-complex/LGI1-antibody encephalitis: clinical manifestations and response to immunotherapy. *J Neuroimmunol.* 2013;265(1-2):75-81.
30. Dalmau J, Rosenfeld MR. Autoimmune encephalitis update. *Neuro Oncol.* 2014;16(6):771-8.
31. van Sonderen A, Ariño H, Petit-Pedrol M, Leypoldt F, Körtvélyessy P, Wandinger KP, Lancaster E, Wirtz PW, Schreurs MW, Sillevs Smitt PA, Graus F, Dalmau J, Titulaer MJ. The clinical spectrum of Caspr2 antibody-associated disease. *Neurology.* 2016;87(5):521-8.
32. Angela Vincent SRI. Caspr2 Antibodies in Patients with Thymomas. *MALIGNANCIES OF THE THYMUS.* 2010.

33. Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, Wilson C, Jacobs D, Lai M, Walker RW, Graus F, Bataller L, Illa I, Markx S, Strauss KA, Peles E, Scherer SS, Dalmau J. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol*. 2011;69(2):303-11.
34. 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. *Lancet Neurol*. 2010;9(1):67-76.
35. Ohta K, Seki M, Dalmau J, Shinohara Y. Perfusion IMP-SPECT shows reversible abnormalities in GABA(B) receptor antibody associated encephalitis with normal MRI. *Brain Behav*. 2011;1(2):70-2.
36. Lancaster E, Dalmau J. Neuronal autoantigens--pathogenesis, associated disorders and antibody testing. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(7):380-90.
37. Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, Matà 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. *Ann Neurol*. 2009;65(4):424-34.
38. Laurido-Soto O, Brier MR, Simon LE, McCullough A, Bucelli RC, Day GS. Patient characteristics and outcome associations in AMPA receptor encephalitis. *J Neurol*. 2019;266(2):450-60.
39. Höftberger R, van Sonderen A, Leypoldt F, Houghton D, Geschwind M, Gelfand J, Paredes M, Sabater L, Saiz A, Titulaer MJ, Graus F, Dalmau J. Encephalitis and AMPA receptor antibodies: Novel findings in a case series of 22 patients. *Neurology*. 2015;84(24):2403-12.
40. Spatola M, Petit-Pedrol M, Simabukuro MM, Armangue T, Castro FJ, Barcelo Artigues MI, Julià Benique MR, Benson L, Gorman M, Felipe A, Caparó Oblitas RL, Rosenfeld MR, Graus F, Dalmau J. Investigations in GABA(A) receptor antibody-associated encephalitis. *Neurology*. 2017;88(11):1012-20.
41. Petit-Pedrol M, Armangue 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, Sillevs-Smitt P, Titulaer MJ, Balice-Gordon R, Graus F, Dalmau J. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case

- series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol.* 2014;13(3):276-86.
42. Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *The Lancet Neurology.* 2011;10(1):63-74.
43. Irani SR, Vincent A. NMDA receptor antibody encephalitis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011;11(3):298-304.
44. Lancaster E. The Diagnosis and Treatment of Autoimmune Encephalitis. *J Clin Neurol.* 2016;12(1):1-13.
45. Graus F, Titulaer MJ, 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, Rostásy K, Saiz A, Venkatesan A, Vincent A, Wandinger K-P, Waters P, Dalmau J. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *The Lancet Neurology.* 2016;15(4):391-404.
46. Xu X, Lu Q, Huang Y, Fan S, Zhou L, Yuan J, Yang X, Ren H, Sun D, Dai Y, Zhu H, Jiang Y, Zhu Y, Peng B, Cui L, Guan H. Anti-NMDAR encephalitis: A single-center, longitudinal study in China. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020;7(1).
47. Fisher RS, Cross JH, D'Souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshe SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Schulze-Bonhage A, Somerville E, Sperling M, Yacubian EM, Zuberi SM. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia.* 2017;58(4):531-42.
48. Steriade C, Britton J, Dale RC, Gadoth A, Irani SR, Linnoila J, McKeon A, Shao XQ, Venegas V, Bien CG. Acute symptomatic seizures secondary to autoimmune encephalitis and autoimmune-associated epilepsy: Conceptual definitions. *Epilepsia.* 2020;61(7):1341-51.
49. Bruijn MAAMd, Sonderen Av, Coevorden-Hameete MHv, Bastiaansen AEM, Schreurs MWJ, Rouhl RPW, Donselaar CAv, Majoie MHJM, Neuteboom RF, Smitt PAES, Thijs RD, Titulaer MJ. Evaluation of seizure treatment in anti-LGI1, anti-NMDAR, and anti-GABA_B encephalitis. *Neurology.* 2019;92(19):e2185-e96.
50. Nosadini M, Eyre M, Molteni E, Thomas T, Irani SR, Dalmau J, Dale RC, Lim M, International NAECG, Anlar B, Armangue T, Benseler S, Cellucci T, Deiva K, Gallentine W, Gombolay G, Gorman MP, Hacoheh Y, Jiang Y, Lim BC, Muscal E, Ndondo A, Neuteboom R, Rostasy K, Sakuma H, Sartori S, Sharma S, Tenenbaum SN, Van Mater

- HA, Wells E, Wickstrom R, Yeshokumar AK. Use and Safety of Immunotherapeutic Management of N-Methyl-d-Aspartate Receptor Antibody Encephalitis: A Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2021;78(11):1333-44.
51. Dalmau J, Armangue T, Planaguma J, Radosevic M, Mannara F, Leypoldt F, Geis C, Lancaster E, Titulaer MJ, Rosenfeld MR, Graus F. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *Lancet Neurol.* 2019;18(11):1045-57.
52. Smith KM, Dubey D, Liebo GB, Flanagan EP, Britton JW. Clinical Course and Features of Seizures Associated With LGI1-Antibody Encephalitis. *Neurology.* 2021;97(11):e1141-e9.
53. Steriade C, Gillinder L, Rickett K, Hartel G, Higdon L, Britton J, French J. Discerning the Role of Autoimmunity and Autoantibodies in Epilepsy: A Review. *JAMA Neurol.* 2021;78(11):1383-90.
54. Chen L, Zhu L, Lu D, Dai S, Han Y, Wu Z, Xu P, Chang L, Wu Q. Association between autoimmune encephalitis and epilepsy: Systematic review and meta-analysis. *Seizure.* 2021;91:346-59.
55. Schulz P, Lütt A, Stöcker W, Teegen B, Holtkamp M, Prüss H. High frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies in patients with seizures or epilepsies of unknown etiology. *Frontiers in Neurology.* 2023;14.
56. Lütt A, Michel K, Kruger D, Volz MS, Nassir M, Schulz E, Poralla L, Tangermann P, Bojarski C, Holtje M, Teegen B, Stocker W, Schemann M, Siegmund B, Pruss H. High prevalence and functional effects of serum antineuronal antibodies in patients with gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil.* 2018;30(6):e13292.
57. Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, Parsons TD, Lynch DR, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci.* 2010;30(17):5866-75.
58. Dalmau J, Gleichman 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. *The Lancet Neurology.* 2008;7(12):1091-8.
59. Graus F, Titulaer MJ, Balu R, Benseler S, Bien CG, Cellucci T, Cortese I, Dale RC, Gelfand JM, Geschwind M, Glaser CA, Honnorat J, Hoftberger R, Iizuka T, Irani SR, Lancaster E, Leypoldt F, Pruss H, Rae-Grant A, Reindl M, Rosenfeld MR, Rostasy K,

- Saiz A, Venkatesan A, Vincent A, Wandinger KP, Waters P, Dalmau J. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol.* 2016;15(4):391-404.
60. Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, Gleichman AJ, Balice-Gordon R, Rosenfeld MR, Lynch D, Graus F, Dalmau J. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol.* 2014;13(2):167-77.
61. Brenner T, Sills 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. *Epilepsia.* 2013;54(6):1028-35.
62. Dubey D, Pittock SJ, Kelly CR, McKeon A, Lopez-Chiriboga AS, Lennon VA, Gadoth A, Smith CY, Bryant SC, Klein CJ, Aksamit AJ, Toledano M, Boeve BF, Tillema JM, Flanagan EP. Autoimmune encephalitis epidemiology and a comparison to infectious encephalitis. *Ann Neurol.* 2018;83(1):166-77.
63. Li X, Guo Q, Zheng Z, Wang X, Liu S. Immune-mediated epilepsy with GAD65 antibodies. *J Neuroimmunol.* 2020;341:577189.
64. Sorgjerd EP, Thorsby PM, Torjesen PA, Skorpen F, Kvaloy K, Grill V. Presence of anti-GAD in a non-diabetic population of adults; time dynamics and clinical influence: results from the HUNT study. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2015;3(1):e000076.
65. Kammeyer R, Piquet AL. Multiple co-existing antibodies in autoimmune encephalitis: A case and review of the literature. *J Neuroimmunol.* 2019;337:577084.
66. Gravier-Dumonceau A, Ameli R, Rogemond V, Ruiz A, Joubert B, Muniz-Castrillo S, Vogrig A, Picard G, Ambati A, Benaiteau M, Rulquin F, Ciron J, Deiva K, de Broucker T, Kremer L, Kerschen P, Sellal F, Bouldoires B, Genet R, Biberon J, Bigot A, Duval F, Issa N, Rusu EC, Goudot M, Dutray A, Devoize JL, Hopes L, Kaminsky AL, Philbert M, Chanson E, Leblanc A, Morvan E, Andriuta D, Diraison P, Mirebeau G, Derollez C, Bourg V, Bodard Q, Fort C, Grigorashvili-Coin I, Rieul G, Molinier-Tiganas D, Bonnan M, Tchoumi T, Honnorat J, Marignier R. Glial Fibrillary Acidic Protein Autoimmunity: A French Cohort Study. *Neurology.* 2022;98(6):e653-e68.
67. Flanagan EP, Hinson SR, Lennon VA, Fang B, Aksamit AJ, Morris PP, Basal E, Honnorat JA, Alfugham NB, Linnoila JJ, Weinshenker BG, Pittock SJ, McKeon A. Glial fibrillary acidic protein immunoglobulin G as biomarker of autoimmune astrocytopathy: Analysis of 102 patients. *Ann Neurol.* 2017;81(2):298-309.

68. Dubey D, Hinson SR, Jolliffe EA, Zekeridou A, Flanagan EP, Pittock SJ, Basal E, Drubach DA, Lachance DH, Lennon VA, McKeon A. Autoimmune GFAP astrocytopathy: Prospective evaluation of 90 patients in 1 year. *J Neuroimmunol.* 2018;321:157-63.
69. Iorio R, Damato V, Evoli A, Gessi M, Gaudino S, Di Lazzaro V, Spagni G, Sluijs JA, Hol EM. Clinical and immunological characteristics of the spectrum of GFAP autoimmunity: a case series of 22 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2018;89(2):138-46.
70. Long Y, Liang J, Xu H, Huang Q, Yang J, Gao C, Qiu W, Lin S, Chen X. Autoimmune glial fibrillary acidic protein astrocytopathy in Chinese patients: a retrospective study. *Eur J Neurol.* 2018;25(3):477-83.
71. Kimura A, Takekoshi A, Yoshikura N, Hayashi Y, Shimohata T. Clinical characteristics of autoimmune GFAP astrocytopathy. *J Neuroimmunol.* 2019;332:91-8.
72. McKeon A. Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoglobulin G in CSF: A Biomarker of Severe but Reversible Encephalitis. *Neurology.* 2022;98(6):221-2.
73. Elisak M, Krysl D, Hanzalova J, Volna K, Bien CG, Leypoldt F, Marusic P. The prevalence of neural antibodies in temporal lobe epilepsy and the clinical characteristics of seropositive patients. *Seizure.* 2018;63:1-6.
74. Liimatainen S, Peltola M, Sabater L, Fallah M, Kharazmi E, Haapala AM, Dastidar P, Knip M, Saiz A, Peltola J. Clinical significance of glutamic acid decarboxylase antibodies in patients with epilepsy. *Epilepsia.* 2010;51(5):760-7.
75. Miro J, Fortuny R, Juncadella M, Aiguabella M, Veciana M, Castaner S, Santurino M, Falip M. Antithyroid antibodies as a potential marker of autoimmune-mediated late onset temporal lobe epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014;121:46-50.
76. Dubey D, Alqallaf A, Hays R, Freeman M, Chen K, Ding K, Agostini M, Vernino S. Neurological Autoantibody Prevalence in Epilepsy of Unknown Etiology. *JAMA Neurol.* 2017;74(4):397-402.
77. Iorio R, Assenza G, Tombini M, Colicchio G, Della Marca G, Benvenga A, Damato V, Rossini PM, Vollono C, Plantone D, Marti A, Batocchi AP, Evoli A. The detection of neural autoantibodies in patients with antiepileptic-drug-resistant epilepsy predicts response to immunotherapy. *Eur J Neurol.* 2015;22(1):70-8.
78. Dubey D, Singh J, Britton JW, Pittock SJ, Flanagan EP, Lennon VA, Tillema JM, Wirrell E, Shin C, So E, Cascino GD, Wingerchuk DM, Hoerth MT, Shih JJ, Nickels KC, McKeon A. Predictive models in the diagnosis and treatment of autoimmune epilepsy. *Epilepsia.* 2017;58(7):1181-9.

79. Dalmau J, Rosenfeld MR. Paraneoplastic syndromes of the CNS. *Lancet Neurol.* 2008;7(4):327-40.
80. Marsili L, Marcucci S, LaPorta J, Chirra M, Espay AJ, Colosimo C. Paraneoplastic Neurological Syndromes of the Central Nervous System: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Biomedicines.* 2023;11(5).
81. Schulz P, Prüss H. "Hirnsymptome bei Carcinomatose" - Hermann Oppenheim and an Early Description of a Paraneoplastic Neurological Syndrome. *J Hist Neurosci.* 2015;24(4):371-7.
82. Graus F, Delattre JY, Antoine JC, Dalmau J, Giometto B, Grisold W, Honnorat J, Smitt PS, Vedeler C, Verschuuren JJ, Vincent A, Voltz R. Recommended diagnostic criteria for paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004;75(8):1135-40.
83. 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.
84. Loehrer PA, Zieger L, Simon OJ. Update on Paraneoplastic Cerebellar Degeneration. *Brain Sci.* 2021;11(11).
85. Bataller L, Graus F, Saiz A, Vilchez JJ. Clinical outcome in adult onset idiopathic or paraneoplastic opsoclonus-myoclonus. *Brain.* 2001;124(Pt 2):437-43.
86. Rossor T, Yeh EA, Khakoo Y, Angelini P, Hemingway C, Irani SR, Schleiermacher G, Santosh P, Lotze T, Dale RC, Deiva K, Hero B, Klein A, de Alarcon P, Gorman MP, Mitchell WG, Lim M. Diagnosis and Management of Opsoclonus-Myoclonus-Ataxia Syndrome in Children: An International Perspective. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2022;9(3).
87. Graus F, Vogrig A, Muniz-Castrillo S, Antoine JG, Desestret V, Dubey D, Giometto B, Irani SR, Joubert B, Leypoldt F, McKeon A, Pruss H, Psimaras D, Thomas L, Titulaer MJ, Vedeler CA, Verschuuren JJ, Dalmau J, Honnorat J. Updated Diagnostic Criteria for Paraneoplastic Neurologic Syndromes. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2021;8(4).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Marie Paulina Schulz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Prävalenz neuronaler Autoantikörper bei Patientinnen und Patienten mit Erstanfällen oder Epilepsie unbekannter Ätiologie/ Prevalence of Neuronal Autoantibodies in Patients with Seizures or Epilepsy of Unknown Etiology“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung

Marie Paulina Schulz hatte folgenden Anteil an der Publikation:

Schulz P*, Lütt A*, Stöcker W, Teegen B, Holtkamp M and Prüss H (2023) High frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies in patients with seizures or epilepsies of unknown etiology. *Front. Neurol.* 14:1211812. DOI: 10.3389/fneur.2023.1211812

*geteilte Erstautorenschaft

Marie Paulina Schulz hatte daran folgenden Anteil im Einzelnen:

Konzeption & Rekrutierung:

- Erstellung des Studiendesigns in Zusammenarbeit mit zusammen mit Prof. Dr. med. H. Prüß und Prof. Dr. med. M. Holtkamp
- stationäres Rekrutieren: Durchführen der Aufklärungsgespräche
- Co-Autorin des Projektantrags und des Ethikkommissionsantrag zusammen mit Prof. Dr. med. H. Prüß

Durchführung und Koordination der Studie:

- Assistenz bei der stationären Liquor- und Serumentnahme in Zusammenarbeit mit den Prof. Dr. med. H. Prüß sowie den Stationsärztinnen und -ärzten
- Transport, Asservierung und Lagerung der Patientinnen- und Patientenproben sowie der Kontrollproben
- Erstellung und Pflege einer Datenbank der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer
- Durchführung immunhistochemischer Probefärbungen incl. Anfertigung von Rattenhirnschnitten mittels Kryostaten
- Erfassen und Nachverfolgung der klinischen Daten über 7,8 Jahre mittels des elektronischen Dokumentationssystems der Charité SAP
- Umfassende Analyse der elektronischen Krankengeschichte in Rücksprache mit Prof. Dr. med. H. Prüß

Datenauswertung und statistische Analyse:

- Auswertung aller Testergebnisse außer der immunhistochemischen Ergebnisse
- Dateneingabe und Auswertung der klinischen Daten und Zusammenführung mit den Testergebnissen der indirekten Immunfluoreszenz sowie den Zell-basierten Assays, wodurch die Tabellen des Papers entstanden (Microsoft Excel)
- statistische Auswertung der klinischen Daten (Microsoft Excel)

Schreiben des Manuskripts und Publikation:

- Erstellung von Tabelle 1, Tabelle 2 in Microsoft PowerPoint, Excel und Word (Ich habe für die Erstellung von Tabelle 2 die von Dr. med. A. Lütt dokumentierten Färbeergebnisse sowie die von AG Euroimmun erstellten Zell-basierten-Assay-Ergebnisse verwendet)
- Erstellung von Abbildung 1, 2 in Microsoft PowerPoint
- Erstellung Abbildung 3 (Ich habe die Abbildung auf der Grundlage der Fotografien von Dr. med. A. Lütt erstellt und die Legende verfasst)
- Substantielle Mitwirkung an der Anfertigung der Publikation in der vorliegenden Form sowie Einreichung dieser:
 - o Verfassen des Erstmanuskripts
 - o Bearbeitung des Manuskripts in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. H. Prüß, Dr. med. A. Lütt und Prof. Dr. med. Martin Holtkamp
 - o Einreichung beim Journal
 - o Revision auf Grundlage von Gutachter-Reviews in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. H. Prüß, Dr. med. A. Lütt und Prof. Dr. med. Martin Holtkamp

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Druckexemplar der Publikation



OPEN ACCESS

EDITED BY
Margherita Nosadini,
University of Padua, Italy

REVIEWED BY
Sergio Muñoz-Castrillo,
Stanford Center for Sleep Sciences and
Medicine, United States
Luigi Zuliani,
San Bortolo Hospital, Italy

*CORRESPONDENCE
Harald Prüss
✉ harald.pruess@charite.de

†These authors have contributed equally to this work and share first authorship

RECEIVED 25 April 2023
ACCEPTED 09 June 2023
PUBLISHED 05 July 2023

CITATION
Schulz P, Lütt A, Stöcker W, Teegen B,
Holtkamp M and Prüss H (2023) High
frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies
in patients with seizures or epilepsies of
unknown etiology.
Front. Neurol. 14:1211812.
doi: 10.3389/fneur.2023.1211812

COPYRIGHT
© 2023 Schulz, Lütt, Stöcker, Teegen,
Holtkamp and Prüss. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
The use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in this
journal is cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

High frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies in patients with seizures or epilepsies of unknown etiology

Paulina Schulz^{1,2†}, Alva Lütt^{3,4,5†}, Winfried Stöcker⁶,
Bianca Teegen⁶, Martin Holtkamp^{2,7} and Harald Prüss^{1,2*}

¹German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE) Berlin, Berlin, Germany, ²Department of Neurology and Experimental Neurology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität Berlin, Berlin, Germany, ³Psychiatric University Hospital Charité at St. Hedwig Hospital, Berlin, Germany, ⁴Department of Psychiatry and Neurosciences, CCM, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany, ⁵Berlin Institute of Health at Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, ⁶Institute for Experimental Immunology, Lübeck, Germany, ⁷Epilepsy-Center Berlin-Brandenburg, Institute for Diagnostics of Epilepsy, Berlin, Germany

Introduction: The increasing identification of specific autoantibodies against brain structures allows further refinement of the group of autoimmune-associated epilepsies and affects diagnostic and therapeutic algorithms. The early etiological allocation of a first seizure is particularly challenging, and the contribution of cerebrospinal fluid (CSF) analysis is not fully understood.

Methods: In this retrospective study with a mean of 7.8 years follow-up involving 39 well-characterized patients with the initial diagnosis of new-onset seizure or epilepsy of unknown etiology and 24 controls, we determined the frequency of autoantibodies to brain proteins in CSF/serum pairs using cell-based assays and unbiased immunofluorescence staining of unfixed murine brain sections.

Results: Autoantibodies were detected in the CSF of 30.8% of patients. Underlying antigens involved glial fibrillary acidic protein (GFAP) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, but also a range of yet undetermined epitopes on neurons, glial and vascular cells. While antibody-positive patients had higher frequencies of cancer, they did not differ from antibody-negative patients with respect to seizure type, electroencephalography (EEG) and cranial magnetic resonance imaging (cMRI) findings, neuropsychiatric comorbidities or pre-existing autoimmune diseases. In 5.1% of patients with seizures or epilepsies of initially presumed unknown etiology, mostly CSF findings resulted in etiological reallocation as autoimmune-associated epilepsy.

Discussion: These findings strengthen the potential role for routine CSF analysis. Further studies are needed to understand the autoantibody contribution to etiologically unclear epilepsies, including determining the antigenic targets of underlying autoantibodies.

KEYWORDS

cerebrospinal fluid, autoimmune, unknown etiology, seizure, autoantibodies, encephalitis, immunofluorescence, autoimmune-associated epilepsy

Introduction

Seizures and epilepsy are common in autoimmune encephalitis (1) and can even represent the main complaints, which led to the clinical entity of “immune epilepsy” that has been added

to the International League Against Epilepsy (ILAE) classification of the epilepsies in 2017 (2) as an etiologic subgroup categorized as “immune disorder in which seizures are a core symptom.” In 2020, the ILAE Autoimmunity and Inflammation Taskforce proposed conceptual definitions for two main diagnostic entities in this field: (a) acute symptomatic seizures secondary to autoimmune encephalitis, and (b) autoimmune-associated epilepsy, the latter of which suggests an enduring predisposition to seizures (3) and corresponds to “immune epilepsy” in the 2017 ILAE classification.

Research on the clinical phenotypes and the underlying disease mechanisms has become a major focus over the past decade (4–7). In many patients, well-established autoantibodies are detected in clinical routine, such as autoantibodies against NMDA receptors (NMDAR) or leucine-rich glioma inactivated protein 1 (LGI1) (8, 9). In antibody-positive patients, new immunotherapeutic approaches became available (5), thus going beyond symptomatic seizure control with anti-seizure medication.

However, the exact proportion of immune epilepsies and the spectrum of underlying autoantibodies are still changing with novel findings. A recent comprehensive meta-analysis (10) revealed estimations between 0 and 24% depending on design and cohort selection. Differences partially relate to availability of bio-samples (often restricted to serum), the limited number of examined autoantibodies, the type and epileptogenic potential of underlying autoantibodies (e.g., targeting neuronal surfaces), and lack of follow-up and inconsistencies when distinguishing seizures from epilepsies (10). Likewise, the role of CSF testing in etiologically unexplained seizures and epilepsies is not fully clear, even though some studies suggest routine CSF diagnostics to not overlook autoimmune etiologies (4). This also considers the presence of some autoantibodies only in CSF and the correlation of clinical courses with CSF titers, such as with anti-NMDAR autoantibodies. However, only few studies screened CSF specimens for autoantibodies in patients with new-onset seizures of unknown etiology (10).

The present study therefore aimed at retrospectively analyzing the presence of autoantibodies in CSF and serum of well-phenotyped patients with seizures or epilepsy of unknown etiology. A particular focus was the potential benefit of CSF analysis, the long follow-up of 6–8 (mean 7.8) years to increase diagnostic accuracy, and the frequency of less well-established autoantibodies using murine brain immunofluorescence imaging.

Materials and methods

Study population

This retrospective study comprised 39 adult patients (mean age = 45 years, ± 16.4 SD) who presented with new-onset seizure or epilepsy of unknown etiology and were therefore admitted to the Department of Neurology, Charité—Universitätsmedizin Berlin. Patients were recruited between June 2012 and September 2014, and patient records were followed up every 2 years until December 2021. Diagnosis was made according to the International League Against Epilepsy (ILAE) guidelines by the treating neurologists. Patients in whom etiology of the seizure or of epilepsy had been clarified at the time of emergency room ($n = 49$) admission were accordingly excluded from the study.

Parallel to clinical routine diagnostics and patient care, additional serum and CSF samples of all patients were taken during hospitalization and archived for later analysis after the end of the recruitment period. As a comparison for autoantibody prevalence in serum, samples of 24 unselected healthy control subjects (mean age = 47.5 years, ± 19.7) were age- ($p = 0.72$; T-test) and sex-matched ($p = 0.07$; chi-squared test) with the cohort and included into the study. Controls had no history of autoimmunity, psychiatric comorbidities, or previous seizures. CSF of healthy controls was not available, related to the invasive procedure.

All subjects' informed consent was collected before participation and CSF and blood withdrawal. Samples were coded and stored at -80°C . The study was approved by the Charité University Hospital Institutional Review Board (EA1/096/12).

Clinical data evaluation

Clinical data of all subjects were obtained by the authors or by treating physicians at the time of hospitalization. It included routine epilepsy assessment (seizure history, seizure classification, routine EEG and neuroimaging [cranial magnetic resonance imaging (cMRI) or cranial computed tomography (cCT)]), demographic characteristics (age, sex), and patients' further medical record (immunosuppressive medication and comorbidities; autoimmune, psychiatric, neurological diseases, and cancer). All data were followed up with focus on the reoccurrence of seizures or seizure frequency and/or development of CNS or systemic autoimmunity over the course of 6–8 years (mean 7.8 years) to reappraise the initial diagnosis “new-onset seizure of unknown etiology” or “epilepsy of unknown etiology” and to monitor the individual clinical course. The follow-up was performed by research of the electronic patient database at Charité Berlin.

Microsoft Excel (Microsoft Excel 2023, Redmond, WA, United States) was used for statistical analyses. A T-test was performed for paired and chi-squared analysis for unpaired data with the level of significance defined as $p < 0.05$.

Autoantibody diagnostics

After recruitment of the last patient, all serum and CSF samples were analyzed in parallel to reduce bias. Autoantibody detection was performed.

1. With indirect immunofluorescence on murine brain tissue for detection of novel anti-neuronal, anti-glial, and anti-vascular autoantibodies as described previously (11, 12). Reactions were evaluated by two experienced histologists and classified according to a semi-quantitative fluorescence score (0–3). This score describes “0” as no specific fluorescence reactivity equal to a representative negative control, “1” as weak, “2” as moderate, and “3” as strong reactivity (equal to a representative antibody positive control). Scores ≥ 2 were defined as antibody-positive and selected for further evaluation.
2. On cell-based assays (CBA) for determining well-established IgG autoantibodies (Euroimmun AG, Lübeck, Germany). These included antibodies against alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid (AMPA) receptor 1 + 2,

amphiphysin, aquaporin-4 (AQP4), sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 (ATP1A3), CARP VIII, contactin-associated protein-2 (Caspr2), collapsing response mediator protein 5 (CRMP5/CV2), delta-and-notch-like-epidermal-growth-factor-related-receptor (DNER), dipeptidyl-peptidase-like-protein-6 (DPPX), ELKS/rab6-interacting/CAST-family member 1 (ERC1), flotillin 1, gamma-aminobutyric acid (GABA) A + B receptor, glutamic acid decarboxylase (GAD65), GFAP, glutamate ionotropic receptor, delta type subunit 2 (GluRD2), metabotropic glutamate receptor (GRM) 1 + 5, glycine receptor (GlyR), homer protein homolog 3 (Homer3), Hu (Anna1), IgLON family member 5 (IgLON5), inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 (ITPR1), LGI1, Ma2, myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), NMDAR, neurexin, neurochondrin, recoverin, Ri (Anna2), ras-homolog-GTPase (Rho-GTPase), and Yo and zinc-finger-protein-4 (Zic4). CSF samples with a titer $\geq 1:1$ and serum samples with a titer $\geq 1:100$ were defined as positive.

Results

Patient cohort

Of 39 adult patients (mean age 45 ± 16.4 years [SD]), 15 (38.5%) were female (37.7 ± 16 years) and 24 (61.5%) were male (50.2 ± 15 years) at the day of admission. The control group (mean age 47.5 ± 19 years) consisted of 7 (29%) females (40.3 ± 20 years) and 17 (71%) males (50.5 ± 18 years).

Seizure classification and epilepsy diagnosis

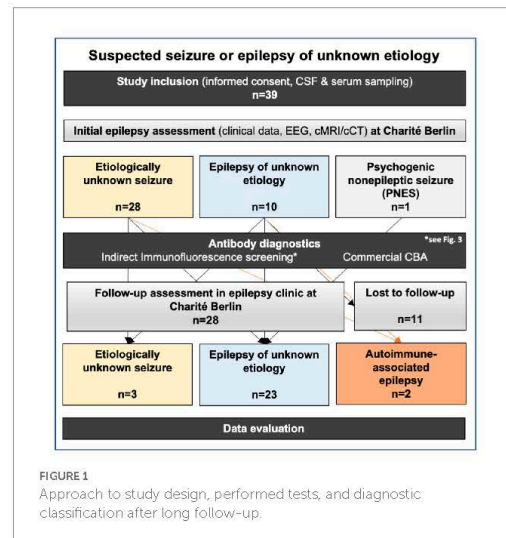
The initial epilepsy assessment led to the diagnosis of seizure of unknown etiology in 28 (71.8%), epilepsy of unknown etiology in 10 (23.3%), and psychogenic nonepileptic seizure (PNES) in one (2.6%) out of 39 patients (Figure 1).

The semiology of the majority of new-onset etiologically unknown seizures was documented as generalized ($n=15$; 53.6%), focal impaired awareness ($n=9$; 32.1%), and focal to bilateral tonic-clonic ($n=4$; 14.3%). No focal aware seizure was recorded (Table 1).

Epilepsies of unknown origin ($n=10$) were most frequently documented as focal impaired awareness ($n=3$; 30%) and focal to bilateral tonic-clonic ($n=3$; 30%) seizure. Combined focal and generalized ($n=2$; 20%) as well as generalized seizures ($n=2$; 20%) occurred in equal distribution among epilepsies of unknown origin. Focal aware epileptic seizures were not recorded (Table 1).

Follow-up data were available for 28 patients (71.8%). Follow-up assessment resulted in clinical re-classification as autoimmune-associated epilepsy in two patients (5.1%). One (2.6%) had NMDAR encephalitis previously diagnosed as a focal to bilateral tonic-clonic seizure of unknown etiology, and the other patient (2.6%) had autoimmune-associated epilepsy with high-titer GFAP-antibodies in CSF and serum previously diagnosed as generalized seizure of unknown etiology.

For the rest of the cohort, epilepsy of unknown etiology remained the most frequent diagnosis ($n=23$; 59%) followed by



seizure of unknown etiology ($n=3$; 10.2%) after the follow-up (Figure 1).

EEG and brain imaging

During epilepsy assessment, a routine EEG was recorded in all 39 subjects, abnormalities were found in 10 patients (25.6%). Findings included regional slowing ($n=7$), generalized epileptiform discharges ($n=2$), and lateralized periodic discharges ($n=1$; Table 1). Brain MRI was carried out in 38 subjects and cCT in one, while one subject did not undergo neuroimaging. Eleven subjects (31%) showed visible changes, the most common finding was microvascular leukoencephalopathy ($n=8$). Three subjects (21.4%) showed mild presumably post-ictal hippocampal edema.

Further clinical data

Information on immunosuppressive medication and comorbidities was available for all 39 subjects (Table 1). No patient had received immunotherapy within the last 6 months prior to admission. Autoimmune diseases were rare and seen in three subjects (11.1%) including multiple sclerosis ($n=1$), Hashimoto thyroiditis ($n=1$), and type 1 diabetes ($n=1$).

Neuro-psychiatric comorbidities were seen in 13 subjects (33.3%) including polysubstance addiction ($n=3$), alcohol use disorder ($n=2$), panic disorder ($n=2$), depression ($n=1$), schizophrenia ($n=1$), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD; $n=1$), additional functional seizures ($n=1$), multiple sclerosis ($n=1$), and dysosmia ($n=1$).

Three patients (7.7%) had a tumor found during the clinical assessment [small-cell lung carcinoma (A8), large cell lung carcinoma (A19), and teratoma (A23)], which was statistically significantly more frequent compared to antibody-negative patients ($p=0.007$, chi-square test).

TABLE 1 Demographic data, seizure categorization, imaging, and comorbidities from the time of admission.

Clinical data	Positive cohort <i>n</i> (%)	Negative cohort <i>n</i> (%)	Total cohort <i>n</i> (%)	<i>p</i> value (T-test or Chi-squared test)
1. Total number	12 (30.8)	27 (69.2)	39	-
2. Mean age (\pm Standard deviation)	51 \pm 17.1	43 \pm 15.9	45 \pm 16.4	0.11
3. Female: Male	3:9	12:14	15:24	0.25
4. Seizure category				
4.1. Etiologically unknown seizure	10 (83.3)	18 (66.67)	28 (71.8)	0.29
a. Focal aware	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
b. Focal impaired awareness	2 (20)	7 (38.9)	9 (32.1)	
a. Focal to bilateral tonic-clonic	2 (20)	2 (11.1)	4 (14.3)	
c. Generalized	6 (60)	9 (50)	15 (53.6)	
4.2. Etiologically unknown epilepsy	2 (16.7)	8 (29.6)	10 (23.3)	0.01
a. Focal aware	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
b. Focal impaired awareness	1 (50)	2 (25)	3 (7)	
c. Focal to bilateral tonic-clonic	0 (0)	3 (37.5)	3 (7)	
d. Focal and generalized	1 (50)	1 (12.5)	2 (4.7)	
e. Generalized	0 (0)	2 (25)	2 (4.7)	
4.3. Psychogenic nonepileptic seizure (PNES)	0 (0)	1 (3.7)	1 (2.3)	0.5
5. Abnormal EEG	2 (16.7)	8 (29.6)	10 (25.6)	0.15
a. Focal slowing	1 (50)	6 (75)	7 (70)	
b. Generalized epileptiform discharges	1 (50)	1 (12.5)	2 (20)	
c. Lateralized periodic discharges (LPD)	0 (0)	1 (12.5)	1 (10)	
6. Abnormal cMRT/cCT	2 (16.7)	9 (34.6) (<i>n</i> = 26)	11 (31) (<i>n</i> = 38)	0.26
a. Microvascular leukoencephalopathy	1 (50)	7 (77.8)	8 (72.7)	
b. Mild post-ictal hippocampal edema	1 (50)	2 (22.2)	3 (27.3)	
7. Immunosuppressive medication	0 (0)	1 (3.7) (Dimethylfumarate)	1 (2.6)	0.5
8. Autoimmune comorbidities	0	3 (11.11) (Hashimoto thyroiditis, type 1 diabetes, multiple sclerosis)	3 (7.7)	0.23
9. Neoplasia past or present	3 (25) (Large cell lung carcinoma, small-cell lung carcinoma, teratoma)	0 (0)	3 (7.7)	0.007
10. Neuro-psychiatric comorbidities	4 (33.3)	9 (33.3)	13 (33.3)	1.0
a. Polysubstance addiction	1 (25)	2 (22.2)	3 (23.1)	
b. Alcohol use disorder	2 (50)	0 (0)	2 (15.4)	
c. Panic disorder	0 (0)	2 (22.2)	2 (15.4)	
d. Depression	0 (0)	1 (11.1)	1 (7.7)	
e. Schizophrenia	0 (0)	1 (11.1)	1 (7.7)	
f. Attention deficit hyperactivity disorder	0 (0)	1 (11.1)	1 (7.7)	
g. Additional functional seizures	0 (0)	1 (11.1)	1 (7.7)	
h. Multiple sclerosis	0 (0)	1 (11.1)	1 (7.7)	
i. Dysosmia	1 (25)	0 (0)	1 (7.7)	

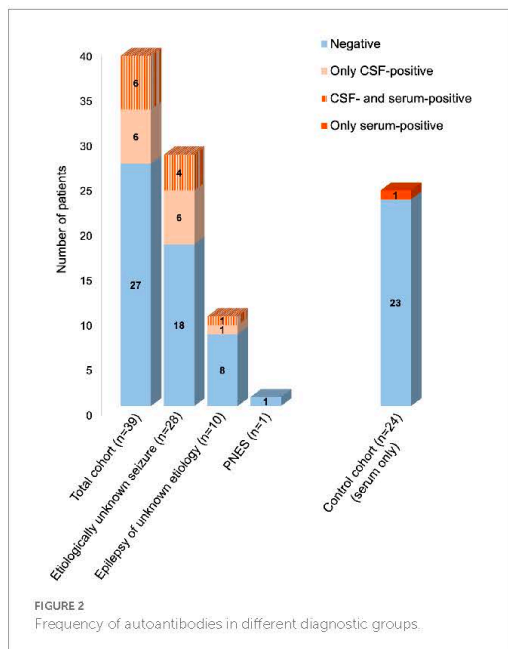
Autoantibody findings

From the 39 patients of this cohort, 12 (30.8%) showed autoantibodies in their CSF, of which one was detected in the CBA

only, seven in the tissue indirect immunofluorescence only, and four in both (Table 2). Indirect immunofluorescence was positive in serum of only four of the 12 CSF-positive patients (33.3%), indicating that autoantibodies occurred more frequently in CSF compared to serum

TABLE 2 Detailed test results and epilepsy diagnosis at admission and at follow-up for the twelve positive subjects. Antibody-positive findings are marked with a bold frame.

Patient number	Immunofluorescence: staining pattern CSF sample	Immunofluorescence: staining pattern serum sample	CBA: CSF titer	CBA: serum titer	Diagnosis at admission	Duration follow-up (in years)	Diagnosis at follow-up	Tumor diagnosis
A2	Pancellular: nuclear	Negative	Negative	Negative	Etiologically unknown seizure (focal impaired awareness)	9	Lost to follow-up	-
A8	Brain vasculature: capillaries	Negative	Negative	Negative (I:32 Caspr2)	Etiologically unknown seizure (generalized)	9	Etiologically unknown seizure (generalized)	Small cell lung cancer
A19	Panellular: nuclear	Panellular: nuclear	Negative	Negative	Etiologically unknown seizure (focal impaired awareness)	8	Etiologically unknown seizure (focal impaired awareness)	Large cell lung cancer
A23	NMDAR-like	NMDAR-like	I:10 (NMDAR)	I:1000 (NMDAR)	Etiologically unknown seizure (generalized)	8	Autoimmune-associated epilepsy	Teratoma
A24	NMDAR-like	Negative	I:32 (NMDAR)	Negative	Etiologically unknown seizure (focal impaired awareness)	8	Lost to follow-up	-
A25	Panellular: non-nuclear	Negative	Negative	Negative	Etiologically unknown seizure (generalized)	8	Epilepsy of unknown etiology	-
A26	Brain vasculature: capillaries and vessels	Negative	Negative	Negative	Epilepsy of unknown etiology (combined focal and generalized)	8	Lost to follow-up	-
A31	Negative	Negative	I:1 (GAD65)	I:320 (GAD65)	Epilepsy of unknown etiology (focal impaired awareness)	7	Epilepsy of unknown etiology	-
A32	Panellular: non-nuclear	Negative	Negative	Negative	Etiologically unknown seizure (focal to bilateral tonic-clonic)	7	Epilepsy of unknown etiology	-
A36	Astrocytic (GFAP, Myelin)	Astrocytic (GFAP, Myelin)	I:3.2 (GFAP)	I:3200 (GFAP)	Etiologically unknown Seizure (generalized)	7	Etiologically unknown seizure (generalized)	-
A38	Brain vasculature: capillaries	Negative	Negative	Negative	Etiologically unknown seizure (focal to bilateral tonic-clonic)	7	Lost to follow-up	-
B1	Astrocytic (GFAP)	Astrocytic (GFAP)	I:3.2 (GFAP)	I:1000 (GFAP)	Etiologically unknown seizure (generalized)	8	Autoimmune-associated epilepsy	-



($p=0.054$; chi-squared test). One serum sample (4.2%) from the control cohort fulfilled the immunofluorescence test criteria with strong binding to neuronal nuclear antigens. CSF was not available from healthy subjects. Comparison of the serum autoantibody frequency between controls and epilepsy patients revealed no statistically significant differences ($p=0.39$; Figure 2).

In detail, five subjects had established CBA-detected autoantibodies in their CSF or serum (Table 2). These included autoantibodies against NMDA receptors [CSF (titer 1:10–1:32) in $n=2$, and serum (1:1,000) in $n=1$], GFAP [CSF (1:3.2) and serum (1:1,000–1:3,200) in $n=2$], and GAD65 [CSF (1:1) and serum (1:320) in one subject]. One subject (A8) showed low-titer serum autoantibodies against Caspr2 in CBA (1:32), which was below our threshold of 1:100 and was therefore considered negative. No autoantibodies were detected in CBA against AMPAR1+2, amphiphysin, AQP4, AT1A3, CARPVIII, CV2, DNER, DPPX, ERC1, flotillin 1, GABA_AR, GABA_BR, GluRD2, GlyR, GRM1, GRM5, Homer3, Hu (Anna1), IgLON5, ITPR1, LGII, Ma2, MOG, neurexin, neurochondrin, recoverin, Ri (Anna2), RhoGTPase, Yo, and Zic4.

Indirect immunofluorescence on unfixed murine brain sections confirmed the anti-NMDAR autoantibodies given their specific tissue staining pattern (Figure 3A). Likewise, anti-GFAP positive samples showed the characteristic astrocytic pattern in the brain including white matter astrocytes and Bergmann glia (Figure 3B). As expected with a screening assay for potentially novel autoantibodies, some patient CSF samples reacted with further autoantigens, such as brain vasculature ranging from capillaries to larger vessels (Figure 3C) or myelinated fibers in the white matter tracts and around cerebellar Purkinje neurons (Figure 3D). Four patients exhibited autoantibodies binding to neuronal nuclear antigens throughout the brain, exemplarily shown in the cerebellar cortex (Figure 3E), and

cytoplasmic binding patterns in Purkinje neurons also involving proximal dendrites (Figure 3F). In total, 11 patients met the indirect immunofluorescence criteria for antibody positivity in CSF (Table 2).

Discussion

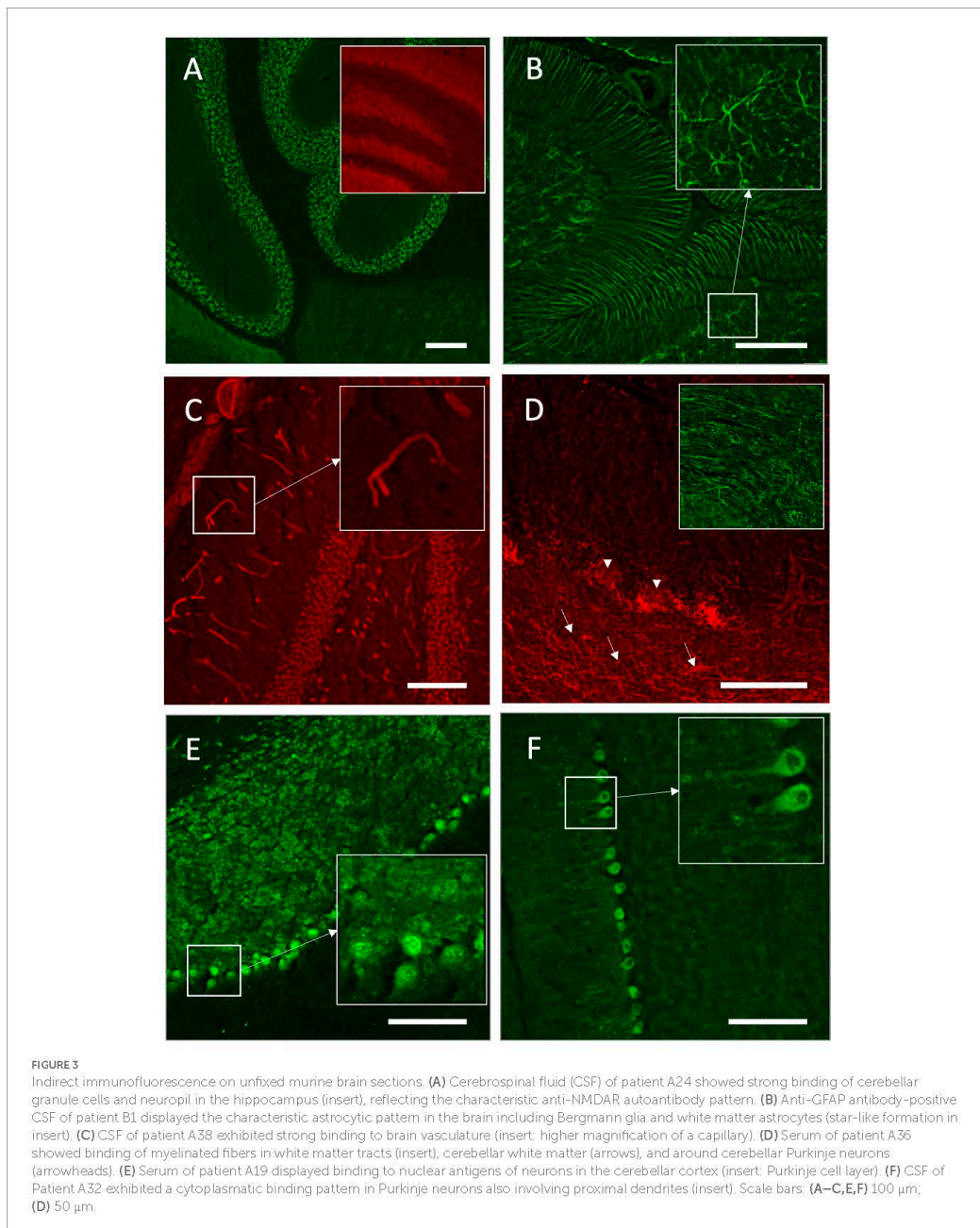
In this retrospective analysis, (i) we showed that more than one in four patients with new-onset seizures of unknown etiology had autoantibodies in CSF targeting established and novel brain antigens, which resulted in re-classification of the etiology in two patients [2 of 39 (5.1%)]. (ii) Moreover, autoantibodies were much more common in CSF compared to serum, indicating that CSF analysis may be considered more frequently in clinical routine diagnostics. (iii) Also, tumors were significantly more common in the autoantibody-positive cohort.

Of the five patients with established CSF autoantibodies against NMDAR ($n=2$), GAD65 ($n=1$), and GFAP ($n=2$), only one (A23) received the diagnosis of autoimmune encephalitis (NMDAR encephalitis) and appropriate immunotherapy. One further patient (A24) with CSF anti-NMDAR autoantibodies was lost to follow-up, thus precluding reassessment and final diagnosis. Two patients (A36, A32) remained categorized as etiologically unknown epilepsy based on the clinical course (anti-GFAP autoantibodies, but no further seizures; A36) and low-level antibodies (anti-GAD65; A32; Table 2). However, based on the presence of anti-GFAP autoantibodies and the otherwise unexplained epilepsy cause in the fifth patient (B1), we argue that this patient should also be re-classified as autoimmune-associated epilepsy. While in patient A23 with NMDAR encephalitis, the underlying ovarian teratoma represents a known strong association (13), the tumors in patients A8 and A19 are not clearly linked to the neurological syndrome as the underlying antigen is still unclear, thus they were not classified as paraneoplastic (14).

In general, NMDAR encephalitis is diagnosed by the presence of well-established pathogenic anti-NMDAR autoantibodies in CSF together with the compatible clinical picture. Seizures occur in 75% of cases and can be the predominant symptom (9, 15, 16). Also, anti-NMDAR autoantibodies were frequent (4.8%) in some cohorts of epilepsy patients (10). We therefore assume that both cases (A23, A24) with anti-NMDAR autoantibodies in our cohort had autoimmune-associated epilepsy based on the underlying anti-NMDA receptor encephalitis (3).

The causal relationship of anti-GAD65 or GFAP autoantibodies with seizures is much less clear. Although high-level anti-GAD65 autoantibodies (in particular when found in CSF) are strongly associated with a form of autoimmune encephalitis (17) and were detected in 3.7% of epilepsy patients including chronic treatment-refractory cases (10, 18, 19), low-level anti-GAD65 antibodies are also present in the general population (20). Also, their direct pathogenicity has not been demonstrated, in contrast to anti-NMDAR autoantibodies, which may relate to the intracellular localization of GAD65. Therefore, patient A32 of this study was not categorized as autoimmune-associated epilepsy despite of low-titer GAD65 antibodies in CSF.

Likewise, autoantibodies against GFAP target an intracellular epitope, but are strongly linked to a relatively new form of autoimmune encephalitis. First established in 2016 (21), diagnosis of anti-GFAP astrocytopathy was not possible in 2012–2013, when both anti-GFAP antibody-positive patients of our cohort entered the study. It became clear with further studies that detection of anti-GFAP autoantibodies in CSF is required for diagnosis, that seizures occur in 11–37% of



these patients and that immunotherapy often has beneficial effects (22–28). Therefore, we re-classified one anti-GFAP antibody-positive patient (from our cohort with seizures refractory to anti-seizure medication as having autoimmune-associated epilepsy) (Figure 1). Even though detailed experimental studies clarifying the direct pathogenicity of human anti-GFAP autoantibodies are still needed

(29), the antibodies may already serve as valuable biomarkers for early detection of immunotreatment-responsive epilepsy patients.

Our findings pointed to the usefulness of CSF analysis for increased detection of potentially pathogenic autoantibodies in patients with unknown seizures and unknown epilepsy. A recent meta-analysis (10) revealed that most published studies screen for

autoantibodies in serum only for epilepsy patients, with only 3.4% of all patients undergoing an additional CSF testing. Different to routine procedures in most hospitals, we here systematically performed CSF analysis in all patients and tested for autoantibodies in CSF and serum independent of the presence of inflammatory signs (i.e., also in the absence of pleocytosis, high CSF protein, or oligoclonal bands). Using indirect immunofluorescence on both, transfected cells and unfixed brain sections, may explain why our cohort showed a higher frequency of autoantibodies compared to previous epilepsy studies that also included CSF specimens (30–35), in which autoantibody frequency was up to 16.8% (33). For the yet uncharacterized autoantibodies, future studies will have to identify the underlying antigens and structural epitopes, the pathogenicity of the antibodies in functional assays and the immunological mechanisms leading to humoral autoimmunity (1, 29).

Our study has some limitations. First, our sample size is relatively small thus complicating solid conclusions about the frequency of autoimmune-associated epilepsy. Future prospective studies with higher statistical power are therefore needed, however, inclusion of CSF analysis is beyond clinical routine in most centers. Second, several autoantibodies bind to as yet undetermined autoantigens, identification of which will require further work including antigen identification by protein arrays or immunoprecipitation/mass spectrometry. Furthermore, incomplete clinical information in the follow-up of some cases hinders clear correlation with antibody test results.

Taken together, our data support the notion that autoimmune-associated epilepsy may be more common than previously assumed, in particular with screening for a broad panel of established and novel autoantibodies. Given the retrospective nature of the study, autoantibody detection did not result in immediate treatment decisions. Together with the number of subjects lost to follow-up, we cannot infer solid conclusions on the relationship between autoantibody levels, clinical courses, and treatment options. CSF analysis seems to be of relevant additional help in the assessment of patients with new-onset seizures or epilepsy of otherwise unknown etiology, in particular as early autoantibody detection is a prerequisite for early treatment in confirmed cases of autoimmune-associated epilepsy. Re-classification of one patient with anti-GEAP autoantibodies as having autoimmune-associated epilepsy is a clear example of the fascinating ongoing progress in the field, given that these autoantibodies were first described in the literature not until the patient had already entered our study. Although further studies are needed to understand the autoantibody repertoire in epilepsy patients and the proportion of patients that might benefit already from available immunotherapies, it is tempting to speculate that even low-level autoantibodies, which are currently considered unspecific, may become more relevant once antibody-selective immunotherapies reach the clinical level.

References

1. Prüss H. Autoantibodies in neurological disease. *Nat Rev Immunol*. (2021) 21:798–813. doi: 10.1038/s41577-021-00543-w
2. Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, et al. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. (2017) 58:512–21. doi: 10.1111/epi.13709
3. Steriade C, Britton J, Dale RC, Gadoth A, Irani SR, Linnoila J, et al. Acute symptomatic seizures secondary to autoimmune encephalitis and autoimmune-

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants and animal study were reviewed and approved by Charité University Hospital Institutional Review Board. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

PS, MH, and HP contributed to the conception and design of the study. PS, AL, and HP contributed to the acquisition, analysis of data, drafting the text, and preparing the figures. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work was supported by grants from the German Research Foundation (DFG; grants FOR3004, PR1274/3-1, PR1274/5-1, and PR1274/9-1), by the Helmholtz Association (HIL-A03 BaoBab), and by the German Federal Ministry of Education and Research (Connect-Generate 01GM1908D) to HP. Dr. Lütt is participant in the BIH Charité Junior Digital Clinician Scientist Program funded by the Charité - Universitätsmedizin Berlin, and the Berlin Institute of Health at Charité (BIH).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

associated epilepsy: conceptual definitions. *Epilepsia*. (2020) 61:1341–51. doi: 10.1111/epi.16571

4. 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) 15:391–404. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00401-9

5. Nosadini M, Eyre M, Molteni E, Thomas T, Irani SR, Dalmau J, et al. Use and safety of immunotherapeutic management of N-methyl-D-aspartate receptor antibody

- encephalitis: a Meta-analysis. *JAMA Neurol.* (2021) 78:1333–44. doi: 10.1001/jamaneurol.2021.3188
6. Dalmau J, Armangué T, Planagumà J, Radosevic M, Mannara F, Leypoldt F, et al. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *Lancet Neurol.* (2019) 18:1045–57. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30244-3
7. Smith KM, Dubey D, Liebo GB, Flanagan EP, Britton JW. Clinical course and features of seizures associated with LGI1-antibody encephalitis. *Neurology.* (2021) 97:e1141–9. doi: 10.1212/WNL.00000000000012465
8. Dalmau J, Graus F. Antibody-mediated encephalitis. *N Engl J Med.* (2018) 378:840–51. doi: 10.1056/NEJMra1708712
9. Chen L, Zhu L, Lu D, Dai S, Han Y, Wu Z, et al. Association between autoimmune encephalitis and epilepsy: systematic review and meta-analysis. *Seizure.* (2021) 91:346–59. doi: 10.1016/j.seizure.2021.07.005
10. Steriade C, Gillinder L, Rickett K, Hartel G, Higdon L, Britton J, et al. Discerning the role of autoimmunity and autoantibodies in epilepsy: a review. *JAMA Neurol.* (2021) 78:1383–90. doi: 10.1001/jamaneurol.2021.3113
11. Liitt A, Michel K, Krüger D, Volz MS, Nassir M, Schulz E, et al. High prevalence and functional effects of serum antineuronal antibodies in patients with gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil.* (2018) 30:e13292. doi: 10.1111/nmo.13292
12. Kreys J, Reincke SM, Kornau HC, Sánchez-Sendin E, Corman VM, Liu H, et al. A therapeutic non-self-reactive SARS-CoV-2 antibody protects from lung pathology in a COVID-19 Hamster model. *Cells.* (2020) 183:1058–1069.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.049
13. Titulaer MJ, McCracken L, Gabilondo I, Armangué T, Glaser C, Iizuka T, et al. Treatment and prognostic factors for long-term outcome in patients with anti-NMDA receptor encephalitis: an observational cohort study. *Lancet Neurol.* (2013) 12:157–65. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70310-1
14. Graus F, Vogrig A, Muñoz-Castrillo S, Antoine JG, Desestret V, Dubey D, et al. Updated diagnostic criteria for paraneoplastic neurologic syndromes. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* (2021) 8:e1014. doi: 10.1212/NXI.0000000000001014
15. Geis C, Planagumà J, Carreno M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. *J Clin Invest.* (2019) 129:926–40. doi: 10.1172/JCI125178
16. Dalmau J, Geis C, Graus F. Autoantibodies to synaptic receptors and neuronal cell surface proteins in autoimmune diseases of the central nervous system. *Physiol Rev.* (2017) 97:839–87. doi: 10.1152/physrev.00010.2016
17. Malter MP, Helmstaedter C, Urbach H, Vincent A, Bien CG. Antibodies to glutamic acid decarboxylase define a form of limbic encephalitis. *Ann Neurol.* (2010) 67:470–8. doi: 10.1002/ana.21917
18. 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) 54:1028–35. doi: 10.1111/epi.12127
19. Dubey D, Pittock SJ, Kelly CR, McKeon A, Lopez-Chiriboga AS, Lennon VA, et al. Autoimmune encephalitis epidemiology and a comparison to infectious encephalitis. *Ann Neurol.* (2018) 83:166–77. doi: 10.1002/ana.25131
20. Sorgjerd EP, Thorsby PM, Torjesen PA, Skorpen F, Kvaloy K, Grill V. Presence of anti-GAD in a non-diabetic population of adults; time dynamics and clinical influence: results from the HUNT study. *BMJ Open Diabetes Res Care.* (2015) 3:e000076. doi: 10.1136/bmjdc-2014-000076
21. Fang B, McKeon A, Hinson SR, Kryzer TJ, Pittock SJ, Aksamit AJ, et al. Autoimmune glial fibrillary acidic protein Astrocytopathy: a novel Meningoencephalomyelitis. *JAMA Neurol.* (2016) 73:1297–307. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.2549
22. Flanagan EP, Hinson SR, Lennon VA, Fang B, Aksamit AJ, Morris PP, et al. Glial fibrillary acidic protein immunoglobulin G as biomarker of autoimmune astrocytopathy: analysis of 102 patients. *Ann Neurol.* (2017) 81:298–309. doi: 10.1002/ana.24881
23. Iorio R, Damato V, Evoli A, Gessi M, Gaudino S, di Lazzaro V, et al. Clinical and immunological characteristics of the spectrum of GFAP autoimmunity: a case series of 22 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2018) 89:138–46. doi: 10.1136/jnnp-2017-316583
24. Long Y, Liang J, Xu H, Huang Q, Yang J, Gao C, et al. Autoimmune glial fibrillary acidic protein astrocytopathy in Chinese patients: a retrospective study. *Eur J Neurol.* (2018) 25:477–83. doi: 10.1111/ene.13531
25. Kimura A, Takekoshi A, Yoshikura N, Hayashi Y, Shimohata T. Clinical characteristics of autoimmune GFAP astrocytopathy. *J Neuroimmunol.* (2019) 332:91–8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.04.004
26. Gravier-Dumoncau A, Ameli R, Rogmond V, Ruiz A, Joubert B, Muñoz-Castrillo S, et al. Glial fibrillary acidic protein autoimmunity: a French cohort study. *Neurology.* (2022) 98:e653–68. doi: 10.1212/WNL.0000000000013087
27. Dubey D, Hinson SR, Ioffliffe EA, Zekeridou A, Flanagan EP, Pittock SJ, et al. Autoimmune GFAP astrocytopathy: prospective evaluation of 90 patients in 1 year. *J Neuroimmunol.* (2018) 321:157–63. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.04.016
28. McKeon A. Glial fibrillary acidic protein immunoglobulin G in CSF: a biomarker of severe but reversible encephalitis. *Neurology.* (2022) 98:221–2. doi: 10.1212/WNL.0000000000013089
29. Duong SL, Prüss H. Molecular disease mechanisms of human antineuronal monoclonal autoantibodies. *Trends Mol Med.* (2023) 29:20–34. doi: 10.1016/j.molmed.2022.09.011
30. Elisak M, Krysl D, Hanzalova J, Volna K, Bien CG, Leypoldt F, et al. The prevalence of neural antibodies in temporal lobe epilepsy and the clinical characteristics of seropositive patients. *Seizure.* (2018) 63:1–6. doi: 10.1016/j.seizure.2018.09.009
31. 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) 51:760–7. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02325.x
32. Miró J, Fortuny R, Juncadella M, Aiguabella M, Veciana M, Castañer S, et al. Antithyroid antibodies as a potential marker of autoimmune-mediated late onset temporal lobe epilepsy. *Clin Neurol Neurosurg.* (2014) 121:46–50. doi: 10.1016/j.clineuro.2014.03.017
33. 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) 74:397–402. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.5429
34. Iorio R, Assenza G, Tombini M, Colicchio G, Della Marca G, Benvenega A, et al. The detection of neural autoantibodies in patients with antiepileptic-drug-resistant epilepsy predicts response to immunotherapy. *Eur J Neurol.* (2015) 22:70–8. doi: 10.1111/ene.12529
35. Dubey D, Singh J, Britton JW, Pittock SJ, Flanagan EP, Lennon VA, et al. Predictive models in the diagnosis and treatment of autoimmune epilepsy. *Epilepsia.* (2017) 58:1181–9. doi: 10.1111/epi.13797

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Schulz P, Lütt A, Stöcker W, Teegen B, Holtkamp M and Prüss H (2023) High frequency of cerebrospinal fluid autoantibodies in patients with seizures or epilepsies of unknown etiology. *Front. Neurol.* 14:1211812. DOI: 10.3389/fneur.2023.1211812

Impact Factor: **4.1**

Kreye J, Wenke NK, Chayka M, Leubner J, Murugan R, Maier N, Jurek B, Ly LT, Brandl D, Rost BR, Stumpf A, Schulz P, Radbruch H, Hauser AE, Pache F, Meisel A, Harms L, Paul F, Dirnagl U, Garner C, Schmitz D, Wardemann H, Prüss H. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain.* 2016;139(Pt 10):2641-52

Impact Factor: **15.3**

Schulz P & Prüss H (2015) "Hirnsymptome bei Carcinomatose" — Hermann Oppenheim and an Early Description of a Paraneoplastic Neurological Syndrome, *Journal of the History of the Neurosciences*, 24:4, 371-377, DOI:10.1080/0964704X.2015.1021120

Impact Factor: **0.5**

Danksagung

Ich möchte mich von ganzen Herzen bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. H. Prüß für unsere langjährige Zusammenarbeit bedanken, ohne dessen Unterstützung, Motivation und Geduld ich diese Arbeit nicht beenden hätte können und für seine Nachsicht, seine spannenden Anregungen, sein Vertrauen und seine Zuversicht, die mir die Arbeit an schwierigen Stellen erleichterten.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich bei diesem Prozess in Höhen wie in Tiefen begleitet haben und für mich stets da waren. Auch meinem Freund Viktor gilt besonderer Dank, dessen Fleiß und Hingabe an seine eigene Arbeit für mich eine konstante Inspiration und Motivation für dieses Projekt waren. Auch Paulina und Gent gilt besonderer Dank, die mich zu einer Zeit unterstützt hatten, in der ich das Projekt fast aufgegeben hätte.

Ferner gilt mein Dank Prof. Dr. med. M. Holtkamp für dessen Mitarbeit und Unterstützung bei meiner Dissertation, Dr. med. A. Lütt für ihre Zuverlässigkeit und der AG Prüß für das angenehme und anregende Arbeitsklima.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Labelfamilie „Live From Earth“ bedanken, die mir immer mit viel Mühe und Verständnis Zeit für diese Arbeit eingeräumt hat- auch dann, wenn keine da war.

Ich bin zutiefst gerührt von der umfangreichen Unterstützung von allen Seiten, ohne die diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre und bin dankbar über das Privileg, eine solche Arbeit gemacht haben zu dürfen und einen bescheidenen Beitrag in dem unendlich weiten Feld des wissenschaftlichen Fortschritts geleistet haben zu können.

-Danke.