

Aus der
Universitätsklinikum Tübingen
Klinik für Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie

**Häufigkeit von Anti-Gangliosid-Antikörpern – Eine
retrospektive Studie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Giesche, Niklas Alexander Georg Erhard**

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. C. Marquetand

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Vogel

Tag der Disputation: 10.04.2025

"Familia et fraternitas semper priores sunt."

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	10
1.1 GANGLIOSIDE	10
1.1.1 <i>Definition, Hintergrund & Historie</i>	10
1.1.2 <i>Struktur, Biosynthese und Funktion</i>	10
1.2 ANTI-GANGLIOSID-ANTIKÖRPER	17
1.2.1 <i>Pathomechanismen und Assoziation mit neurologischen Erkrankungen</i>	17
1.2.2 <i>Nachweisverfahren</i>	19
1.2.3 <i>Kreuzansprechen und Kreuzreaktivität</i>	21
1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
1.4 ERKLÄRUNG ZUR VERÖFFENTLICHUNG	22
2 METHODEN	24
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV.....	24
2.2 ABLAUF DER DIAGNOSEFINDUNG	25
2.3 AUSWERTUNG DER DATEN UND ANALYSE	26
3 ERGEBNISSE	29
3.1 SOZIODEMOGRAFIE	29
3.2 ANALYSE DER MIT DEN ANTI-GANGLIOSID-ANTIKÖRPERN ASSOZIIERTEN ERKRANKUNGEN.....	29
3.2.1 <i>Serum</i>	31
3.2.2 <i>Liquor</i>	38
3.3 ANALYSE DES KREUZANSPRECHENS DER ANTI-GANGLIOSID-ANTIKÖRPER.....	39
3.3.1 <i>IgG-Tests</i>	40
3.3.2 <i>IgM-Tests</i>	41
3.3.3 <i>In verschiedenen Diagnosegruppengruppen</i>	42
4 DISKUSSION	51
4.1 ÜBERSICHT	51
4.2 NIEDRIGE GESAMTPOSITIVRATEN	52
4.3 ANTI-GANGLIOSID-ANTIKÖRPER IM LIQUOR	56
4.4 KREUZANSPRECHEN	58
4.5 STÄRKEN UND LIMITATIONEN	59
4.6 CONCLUSIO.....	60
5 ZUSAMMENFASSUNG	62
6 LITERATURVERZEICHNIS	63
7 ANHANG	70
8 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	75
9 PUBLIKATION	76
10 DANKSAGUNG	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „The ganglioside biosynthetic pathway and related pathologies.“

Blau dargestellte und rosagrau umrahmte biosynthetische Enzyme zeigen an, dass Mutationen oder eine veränderte Expression mit bestimmten neuropathologischen Zuständen assoziiert sind. Zur Identifizierung der Ganglioside wurde die Nomenklatur von Svennerholm (Svennerholm, 1980) verwendet. Da alle Gangliosidnamen zu der Ganglio-Reihe der Glykosphingolipide gehören, beginnen diese mit einem G. Die Zahl der Sialinsäurereste wird mit den Buchstaben A (absent; null), M (Mono-; eins), D (Di-; zwei) und T (Tri-; drei) beschrieben. Mit der Zahl 1 gekennzeichnet sind Ganglioside, deren Kernstruktur aus Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer (Globoreihe) besteht. Mit der Zahl 2 sind solche Ganglioside gekennzeichnet, denen die terminale Galaktose fehlt und mit der Zahl 3 sind jene Ganglioside gekennzeichnet, denen das terminale Disaccharid Galaktosyl-N-Acetylgalaktosamin (Gal β 1-3GalNAc) fehlt. GM4 gehört zur Galareihe (Gal α 1-4Gal β 1-1'Cer als Kernstruktur) der Ganglioside. Die innerste Galaktose der 0-, a-, b- und c-Reihe ist mit 0, 1, 2 bzw. 3 Sialinsäureresten verbunden. Vorläufer der komplexen Ganglioside der a-, b- und c-Reihe sind die einfachen Ganglioside GM3, GD3 und GT3. Die am häufigsten vorkommenden Gangliosidarten werden durch die grauen Kästchen gekennzeichnet. Die Enzyme sind durch eine rote gestrichelte Linie mit den entsprechenden Pathologien verbunden. Das idiopathische Parkinson-Syndrom wurde mit einer Pathologie der ST3GAL2-Expression und das West-Syndrom mit einer Mutation in ST3GAL3 assoziiert. UGT8: UDP-Galactose-Ceramid-Galactosyltransferase; UGCG: UDP-Glucose-Ceramid-Glucosyltransferase; B4GALT5/6: UDP-Gal:Beta-GlcNAc Beta-1,4-Galactosyltransferasen 5 und 6; ST3GAL5: CMPNeuAc:Lactosylceramid Alpha-2,3-Sialyltransferase; ST8SIA1: ST8 Alpha-N-Acetylneuraminid Alpha-2,8-Sialyltransferase 1; ST8SIA3/5: ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminid Alpha-2,8-Sialyltransferasen 3 und 5; B4GALNT1: UDP-Gal:BetaGlcNAc Beta-1,4 N-Acetylgalactosaminyltransferase 1; B3GALT4: UDP-Gal:BetaGlcNAc Beta 1,3-Galactosyltransferase 4; ST3GAL2/3: CMP-N-Acetylneuraminat-Beta-Galactosamid-Alpha-2,3-Sialyltransferase 2; ST8SIA5: ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminid Alpha-2,8-Sialyltransferase 5.

Autoren: (Sipione et al., 2020)

Lizenz: CC BY 4.0

Link zur Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Link zur Quelle: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.572965>.....11

Abbildung 2: „Schematische Abbildung eines lipid rafts in der Zellmembran.“ Eigene Abbildung, erstellt mittels Biorender.com.....13

Abbildung 3: „Schematische Darstellung eines Anti-Gangliosid-Antikörper-Nachweises mittels eines sekundären enzymgebundenen Antikörpers.“

Eigene Abbildung, erstellt mittels Biorender.com.21

Die folgenden Abbildung 4-13 wurden alle der Veröffentlichung Giesche et al. (2024) entnommen und übersetzt und verändert:

Autoren:

(Giesche et al., 2024)

Lizenz: CC BY-NC 4.0

Link zur Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Link zur Quelle: <https://doi.org/10.1111/ene.16290>

Zusätzlich wurde eine Lizenzgenehmigung zur Verwendung des gesamten Papers inklusive der Abbildungen eingeholt:

Lizenznummer: 5872031277015, 18.09.2024

Abbildung 4: (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)):

A: Workflow der Diagnosefindung und Auswertung B: oben: Ein Foto von 5 verschiedenen Tests; unten: eine schematische Darstellung der oben gezeigten Tests inklusive der Auswertung und Farbskalierung.28

Abbildung 5: (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung der Anti-Gangliosid-Dot- Teststreifen gezeigt. Rechts davon befindet sich die Gesamtzahl der Tests. Auf der rechten Seite sind die Zahlen der Tests für Serum und Liquor gezeigt. Aufgeteilt in positive und negative AGA-Tests mit jeweils Prozentzahlen und absoluten Zahlen.30

Abbildung 6: Positivraten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der rechten Y-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro Diagnosegruppe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle, nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Die Grenzwerte im Sinne der jeweiligen Standardabweichungen liegen bei IgG bei 15,6% und bei IgM bei 8,1%.32

Abbildung 7: Positivraten über den Grenzwerten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der rechten Y-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro Diagnosegruppe. Nur relevante Positivraten über 15,6% bei IgG und 8,1% bei IgM sind abgebildet.33

Abbildung 8: Positivraten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro AGA und Ig-Klasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle, nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.35

Abbildung 9: Positivraten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum für IgG (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro AGA und Ig-Klasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle, nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Nur relevante Positivraten über 17% bei IgG sind abgebildet.36

Abbildung 10: Positivraten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum für IgM (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro AGA und Ig-Klasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle, nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Nur relevante Positivraten über 13,4% bei IgM sind abgebildet.37

Abbildung 11: Positivraten der 11 getesteten AGA in 2 Diagnosegruppen im Liquor (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 2 Diagnosegruppen und auf der rechten Y-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an

Liquortests pro Diagnosegruppe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Die Grenzwerte im Sinne der jeweiligen Standardabweichungen liegen bei IgG bei 12,4%. Für IgM wurden sie nicht bestimmt, da nur ein Ergebnis über 0% existiert.38

Abbildung 12: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro Gangliosid. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Die Grenzwerte im Sinne der jeweiligen Standardabweichungen liegen bei IgG bei 10,0% und bei IgM bei 8,5%.39

Abbildung 13: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Die Grenzwerte im Sinne der jeweiligen Standardabweichungen liegen bei IgG bei 21,5% und bei IgM bei 22,8%.40

Abbildung 14: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum: Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Nur relevante Positivraten gleich oder über 21,5% bei IgG sind abgebildet.41

Abbildung 15: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum: Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Nur relevante Positivraten gleich oder größer 22,8% bei IgM sind abgebildet.42

Abbildung 16: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Guillain-Barré-Syndrom (GBS): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der Diagnosegruppe GBS. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.43

Abbildung 17: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Guillain-Barré-Syndrom (GBS): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der gesamten Stichprobe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.44

Abbildung 18: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Miller-Fisher-Syndrom (MFS): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der Diagnosegruppe MFS. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.45

Abbildung 19: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Miller-Fisher-Syndrom (MFS): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der gesamten Stichprobe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.46

Abbildung 20: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Multifokale motorische Neuropathie (MMN): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der Diagnosegruppe MMN. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.47

Abbildung 21: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Multifokale motorische Neuropathie (MMN): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der gesamten Stichprobe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.48

Abbildung 22: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der Diagnosegruppe CIDP . Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.49

Abbildung 23: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der gesamten Stichprobe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der mit Anti-Gangliosid-Antikörpern (AGA) assoziierten Erkrankungen. Eigene Tabelle	18
Tabelle 2: Soziodemographie des Patientenkollektives. Eigene Tabelle	24
Tabelle 3: Eine Übersicht aller 14 Diagnosegruppen. Eigene Tabelle	27

Abkürzungsverzeichnis

AaE - Anti-Gangliosid-Antikörper-assoziierte Erkrankungen

AGA - Anti-Gangliosid-Antikörper

ALS - Amyotropher Lateralsklerose

AMAN - Akute motorische axonale Neuropathie

C. jejuni - Campylobacter jejuni

CIDP - Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie

EGFR - epidermal growth factor receptor

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FASL - Fas-Ligand

GBS - Guillain-Barré-Syndrom

Ig - Immunoglobulin

LOS - Lipooligosaccharid-Strukturen

MAG - Myelin-assoziiertes Glycoprotein

MERCs - mitochondrial-endoplasmatic reticulum contact sites

MFS - Miller-Fisher-Syndrom

MMN - Multifokale motorische Neuropathie

MS - Multiple Sklerose

NGF - nerve growth factor

PNP - Polyneuropathie

PNS - peripheres Nervensystem

Trk - Tropomyosin receptor kinase

TrkA- Tropomyosin receptor kinase A

ZNS - zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Ganglioside

1.1.1 *Definition, Hintergrund & Historie*

Ganglioside sind Glycosphingolipide, die auf der äußeren Zellmembran vorkommen (Sonnino et al., 2007). Sie wurden 1935 zum ersten Mal als nicht spezifizierte Substanz (sog. „Substanz X“) beschrieben (Klenk, 1935). Später, d.h. 1947, wurden die einzelnen Strukturen von Sphingosin (Carter et al., 1947) und im Jahre 1955 von Sialinsäure (Gottschalk, 1955) beschrieben, die Bestandteile der Ganglioside sind. Die Beschreibung der ersten vollständigen Gangliosidstruktur gelang 1963 (Kuhn & Wiegandt, 1963). In den folgenden Jahren wurde der Schwerpunkt der Forschung auf das Verständnis von Strukturen, biologischen Funktionen, Metabolismus, zellulärer Topologie und Pathobiologie gelegt (Sonnino et al., 2007), was in den nachfolgenden Abschnitten weiter ausgeführt wird.

1.1.2 *Struktur, Biosynthese und Funktion*

Die Basis des Strukturgerüsts eines Gangliosides wird von Sphingosin gebildet, ein ungesättigter Aminoalkohol (Carter et al., 1947). Sphingosin ist mit einer Fettsäure verbunden; gemeinsam bilden sie ein Ceramid, welches lipophil ist und somit eine Verankerung im Inneren der Zellmembran ermöglicht (Cuttillo et al., 2020). An diesem Lipidanker ist über eine Hydroxylgruppe ein Mehrfachzucker, ein Oligosaccharid, glykosidisch gebunden. Das Oligosaccharid ist mit einem oder mehreren Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren) verbunden und bildet den hydrophilen Teil, der an der Außenseite der Zellmembran herausragt (Cuttillo et al., 2020). Die Benennung der Ganglioside erfolgt anhand der chromatographischen Mobilität und anhand der Sialinsäurereste, die mit dem

inneren Zuckeranteil verbunden sind (Absent= A, Mono=M, Di=D, Tri=T etc.) (Sipione et al., 2020). Durch die Variation von verschiedenen Zuckern und durch Variabilität der in Ceramid enthaltenen Fettsäuren in Länge und Sättigung gibt es potenziell über 200 und mehr mögliche Kombinationen für Ganglioside. Trotz dieser Kombinationsmöglichkeiten machen bei Wirbeltieren nur wenige Ganglioside den Hauptteil aller Ganglioside aus (Sipione et al., 2020) (siehe Abb. 1).

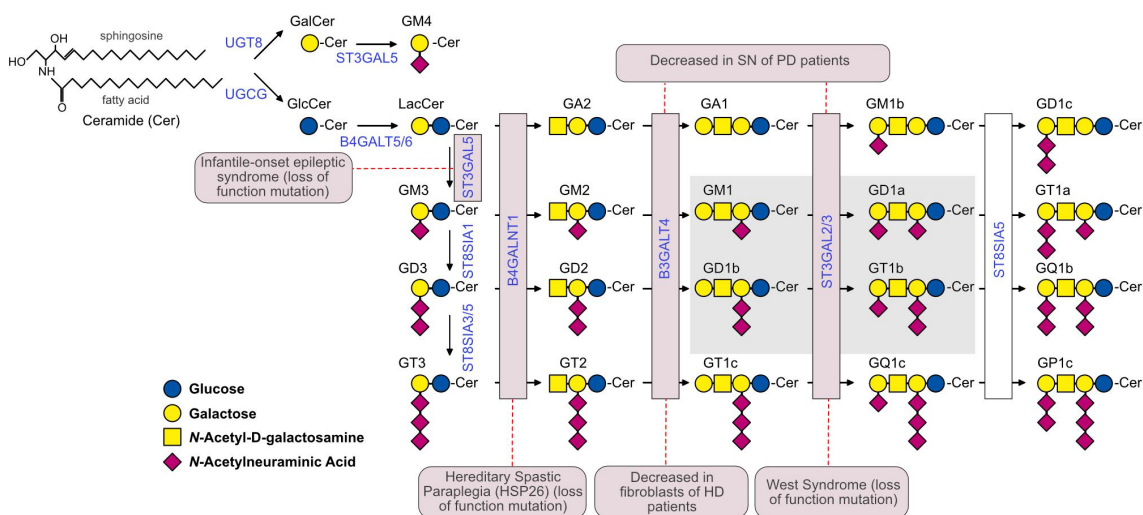


Abbildung 1: „The ganglioside biosynthetic pathway and related pathologies“
Übersetzt nach Sipione et al. (2020)

Lizenz: CC BY 4.0

Link zur Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Link zur Quelle: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.572965>;

Blau dargestellte und rosagrau umrahmte biosynthetische Enzyme zeigen an, dass Mutationen oder eine veränderte Expression mit bestimmten neuropathologischen Zuständen assoziiert sind. Zur Identifizierung der Ganglioside wurde die Nomenklatur von Svennerholm (Svennerholm, 1980) verwendet. Da alle Gangliosidnamen zu der Ganglio-Reihe der Glykosphingolipide gehören, beginnen diese mit einem G. Die Zahl der Sialinsäurereste wird mit den Buchstaben A (absent; null), M (Mono-; eins), D (Di-; zwei) und T (Tri-; drei) beschrieben. Mit der Zahl 1 gekennzeichnet sind Ganglioside, deren Kernstruktur aus Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer (Globoreihe) besteht. Mit der Zahl 2 sind solche Ganglioside gekennzeichnet, denen die terminale Galaktose fehlt und mit der Zahl 3 sind jene Ganglioside gekennzeichnet, denen das terminale Disaccharid Galaktosyl-N-Acetylgalaktosamin (Gal β 1-3GalNAc) fehlt. GM4 gehört zur Galareihe (Gal α 1-4Gal β 1-1'Cer als Kernstruktur) der Ganglioside. Die innerste Galaktose der 0-, a-, b- und c-Reihe ist mit 0, 1, 2 bzw. 3 Sialinsäureresten verbunden.

Vorläufer der komplexen Ganglioside der a-,b- und c-Reihe sind die einfachen Ganglioside GM3, GD3 und GT3. Die am häufigsten vorkommenden Gangliosidarten werden durch die grauen Kästchen gekennzeichnet. Die Enzyme sind durch eine rote gestrichelte Linie mit den entsprechenden Pathologien verbunden. Das idiopathische Parkinson-Syndrom wurde mit einer Pathologie der ST3GAL2-Expression und das West-Syndrom mit einer Mutation in ST3GAL3 assoziiert.

UGT8: UDP-Galactose-Ceramid-Galactosyltransferase; UGCG: UDP-Glucose-Ceramid-Glucosyltransferase; B4GALT5/6: UDP-Gal:Beta-GlcNAc Beta-1,4-Galactosyltransferasen 5 und 6; ST3GAL5: CMPNeuAc:Lactosylceramid Alpha-2,3-Sialyltransferase; ST8SIA1: ST8 Alpha-N-Acetylneuraminid Alpha-2,8-Sialyltransferase 1; ST8SIA3/5: ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminid Alpha-2,8-Sialyltransferasen 3 und 5; B4GALNT1: UDP-Gal:BetaGlcNAc Beta-1,4 N-Acetylgalactosaminyltransferase 1; B3GALT4: UDP-Gal:BetaGlcNAc Beta 1,3-Galactosyltransferase 4; ST3GAL2/3: CMP-N-Acetylneuraminat-Beta-Galactosamid-Alpha-2,3-Sialyltransferase 2; ST8SIA5: ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminid Alpha-2,8-Sialyltransferase 5.

Die Synthese der Ganglioside findet im Endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat statt (Yu et al., 2011). Von dort aus wird der Großteil zur Zellmembran transportiert. Dort kommen Ganglioside insbesondere in den sog. *lipid rafts*, Mikrodomänen der Zellmembran mit hoch gesättigten Fettsäuren und relativer Ordnung (Abb. 3), und den geringer geordneten *raft-like domains* vor (Sonnino et al., 2007). *Lipid rafts* enthalten erhöhte Mengen an Cholesterol, Dipalmitoylphosphatidylcholin und Sphingolipiden sowie „raftophile“ Proteine (Sezgin et al., 2017). Dort kommt es zu Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Interaktionen (Sezgin et al., 2017). Ganglioside sind dort wahrscheinlich an immunologischen und regulatorischen Prozessen beteiligt (Sezgin et al., 2017). Durch den intrazellulären Transport finden sich Ganglioside auch an den *mitochondrial-endoplasmatic reticulum contact sites (MERCs)* (Sano et al., 2009), der Kernhülle (Xie et al., 2002) und am Endolysosomalen System (Möbius et al., 1999).

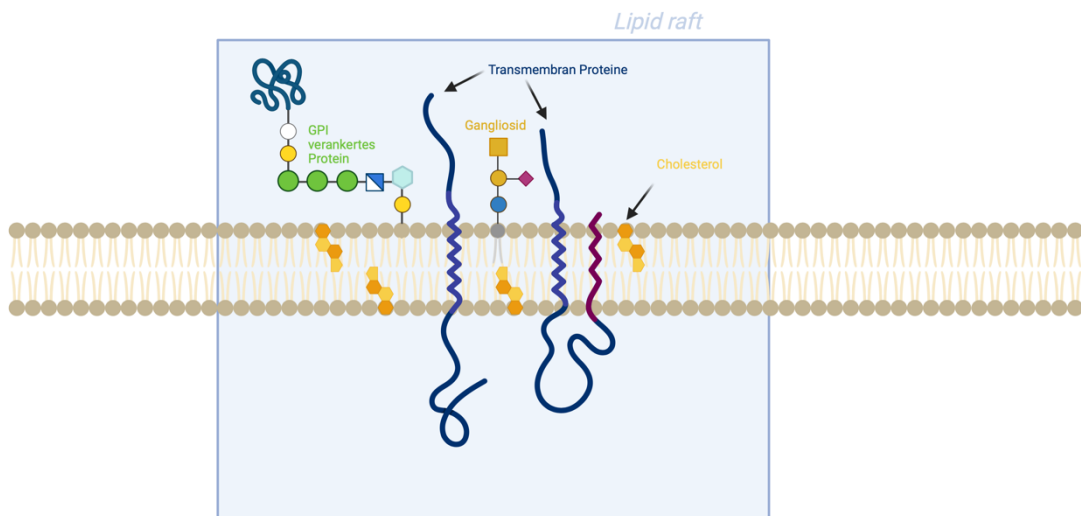


Abbildung 2: Schematische Abbildung eines *lipid rafts* in der Zellmembran. Eigene Abbildung, erstellt mittels Biorender.com

Die Funktionen der Ganglioside sind zahlreich, Gegenstand intensiver Forschungen und bis heute nicht im Ganzen verstanden. Grundsätzlich wird zwischen *Cis*- und *Trans*-Interaktionen unterschieden. *Cis*-Interaktionen finden zwischen einem Gangliosid und einem Molekül in derselben Membran statt, während *Trans*-Interaktion auf der Oberfläche von anderen Zellen oder in einem extrazellulären Umfeld stattfinden (Sonnino et al., 2007).

Die spezifischen Funktionen der einzelnen Ganglioside hängen ebenfalls von ihrem Vorkommen im Körper ab. Ganglioside wurden zwar in fast jedem Körpergewebe nachgewiesen, jedoch scheint ihr Anteil in den Membranen im Nervensystem besonders hoch zu sein (Sipione et al., 2020). Zusätzlich bestimmen ihre Oligosaccharid- sowie Neuraminsäurereste, die ihnen andere physikalisch-chemische Eigenschaften verleihen und ihr Aggregationsverhalten beeinflussen können, welche Funktion sie einnehmen können (Sonnino et al., 2007).

Die Funktionen der Ganglioside sind, wie oben beschrieben, nicht vollständig verstanden und nicht alle Ganglioside sind im gleichen Umfang erforscht.

Rezeptorinteraktion: Ganglioside sind der Lage mit Wachstumsfaktorrezeptoren sowie anderen Rezeptortypen zu interagieren. Beispielsweise können sowohl GM1 als auch GM3 an Rezeptoren binden (Sipione et al., 2020). GM3 kann mit dem epidermal growth factor receptor (EGFR) interagieren und somit das Wachstum hemmen (Yoon et al., 2006) oder den Insulinrezeptor hemmen und dadurch eine Insulinresistenz hervorrufen (Kabayama et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass GM1 an den tropomyosin receptor kinase (Trk) A (TrkA) receptor binden kann (Mutoh et al., 1995). Nach heutigem Wissensstand ist die Interaktion von GM1 eine Voraussetzung dafür, dass der nerve growth factor (NGF) mit TrkA interagieren kann (Lunghi et al., 2021). Somit können Ganglioside direkten und indirekten Einfluss auf Signalwege nehmen.

Ca²⁺-Hämostase: GM1 kann den Ca²⁺-Haushalt bei normalen und pathologischen Konzentrationen durch Ionenkanäle und Austauschproteine beeinflussen, in dem sie zum Beispiel Ca²⁺-Ionen durch ihre negative Ladung anziehen und in der Nähe des Kanals konzentrieren (Ledeer & Wu, 2015). Bei GM2/GD2-knock-out-Mäusen wurden ebenfalls eine gestörte Ca²⁺-Regulation beobachtet (Wu et al., 2001), was vermuten lässt, dass zumindest eines dieser Ganglioside ebenfalls Einfluss auf die Ca²⁺-Hämostase ausübt.

Rolle beim Zelltod: Weiterhin scheinen Ganglioside eine Rolle in der Autophagie und Apoptose zu spielen. Die Synthese des Gangliosids GD3 wird benötigt, um in Zellen mit Amyloid Beta (Copani et al., 2002) oder dem Fas-Ligand (FASL)(De Maria et al., 1997) eine Apoptose zu induzieren. Erhöhte GD3-Level wurden bereits bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen wie zum Beispiel Chorea Huntington (Desplats et al., 2007), Amyotropher Lateralsklerose (ALS) (Rapport et al., 1985) und Multipler Sklerose (MS) (Sela et al., 1982) festgestellt. Andere Ganglioside nehmen wahrscheinlich indirekt, also

über Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase (Virgolini et al., 2019) oder durch die Mediation von überlebensfördernden Stoffwechselwegen (Mocchetti, 2005) Einfluss auf die Apoptose. Dies verdeutlicht, warum die Wirkung von Gangliosiden sowohl als pro- als auch als anti-apoptotisch beschrieben wurde (Sipione et al., 2020).

Ein Mangel von GD3 oder eine Hemmung der GD3-Synthase führt außerdem zu Hemmung der Autophagie (Matarrese et al., 2014). Bei anderen Gangliosiden wurden sowohl Autophagie-stimulierende (Hwang et al., 2010) als auch -hemmende Effekte (Wei et al., 2009) nachgewiesen.

Einfluss auf Axonstrukturen, Myelin und Neuritenwachstum:

Für GM1 wurden neuritenwachstumsfördernde Effekte bei exogener Hinzugabe (Roisen et al., 1981) gezeigt. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass GD1a und GT1b Liganden für das Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG) sind, welches in vivo von myelinisierenden Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS) und von Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS) exprimiert wird (Quarles, 2007). Durch diesen Gangliosid-vermittelten Signalweg konnte ein neuroprotektiver Effekt von MAG gegenüber akuten Neurotoxinen und eine erhöhte strukturelle Axonstabilität gezeigt werden (Mehta et al., 2010). Zusätzlich können in der axonalen Membran unter anderem GT1b und GD1a durch Bindung an MAG zur Hemmung des axonalen Wachstums beitragen, was in gesunden Zellen ungewollten axonalen Auswuchs verhindern und Reparaturen bei Beschädigung regulieren kann (Vinson et al., 2001; Williams et al., 2008).

Im PNS konnte nach Axotomie eine Umwandlung von GD1a und GT1b zu GM1 durch die Neuramidase-3 gezeigt werden, im ZNS nicht. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein, warum sich das PNS, in diesem Beispiel durch das Neuritenwachstum durch GM1, regenerieren kann und das ZNS nicht (Kappagantula et al., 2014).

Rolle im alternden Menschen: 118 Gehirne gesunder Probanden zwischen 20 und 100 wurden in einer Studie von (Svennerholm et al., 1994) untersucht und es wurde eine Erhöhung der Gangliosidkonzentration in der weißen Substanz des

frontalen und temporalen Kortex vom 20. bis zum 50. Lebensjahr festgestellt. Daraufhin folgte eine leichte Erniedrigung bis zum 70. Lebensjahr, die danach deutlich beschleunigt voranschreitet. GM1 und GD1a haben proportional gesehen abgenommen, während GD1b, GM3 und GD3 proportional zugenommen haben.

Die Veränderung der Gesamtzahl von Gangliosiden und insbesondere die Abnahme im Alter könnten die veränderte Cytoarchitektur des alternden Gehirns widerspiegeln (Sipione et al., 2020).

Die proportionale Abnahme von GM1 und GD1a im Alter konnte (Huebecker et al., 2019) ebenfalls zeigen. Huebecker et al. beschreiben die Veränderung als Reduktion der komplexen Ganglioside.

GalNAcT-knockout Mäuse, deren Gendisruption zu einem Verlust der komplexen zentral-neuronalen Ganglioside GM1, GD1a, GD1b and GT1b führt, zu denen auch die beiden im vorherigen Absatz genannten gehören, zeigen eine normale Entwicklung des generellen Verhaltens und des Gehirns, jedoch eine beeinträchtigte Motorkoordination in älteren Tieren sowie bei allen GalNAcT-knockout Mäusen eine signifikant verringerte Nervenleitgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp (Chiavegatto et al., 2000; Takamiya et al., 1996).

Welche Bedeutung diese Veränderungen im Gangliosidstoffwechsel haben könnten und ob daraus eine mögliche Implikation für Menschen, insbesondere ältere Menschen abgeleitet werden kann, ist nicht abschließend geklärt.

Zusammenfassend spielen Ganglioside eine Rolle bei Rezeptorinteraktionen und können dort direkten und indirekten Einfluss nehmen, sie können die Calcium-Homöostase beeinflussen, können an den Prozessen der Autophagie und der Apoptose beteiligt sein, können die neuronale Architektur durch die Beeinflussung von Neuriten-, Myelin- und Axonstrukturen verändern und verändern sich im Alter und sind möglicherweise Marker des Alterns. Gegebenenfalls sind sie sogar an den Alterungsprozessen beteiligt, jedoch sind noch nicht alle Funktionen und Wechselwirkungen, die Ganglioside betreffen, vollkommen verstanden und es bedarf weiterer Grundlagenforschung.

1.2 Anti-Gangliosid-Antikörper

1.2.1 Pathomechanismen und Assoziation mit neurologischen Erkrankungen

1986 wurden Antikörper gegen Ganglioside mit dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und der Chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) assoziiert (Quarles et al., 1986). Seitdem wurden verschiedene Anti-Gangliosid-Antikörper (AGA) mit u.a. dem Miller-Fisher-Syndrom (MFS) (Chiba et al., 1992), der Multifokalen Motorischen Neuropathie (MMN) (Pestronk et al., 1988) und der MS (Kasai et al., 1986) beschrieben. Beim Auftreten des GBS sowie MFS konnten Assoziationen mit vorausgegangen Infektionen mit *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) mit positiven AGA-Proben gezeigt werden (Prendergast et al., 1998; Willison & O'Hanlon, 1999). Bei dem GBS wird bei einer Infektion mit *C. jejuni* ein *molecular mimicry* als primär vermuteter Pathomechanismus beschrieben, bei dem die Erreger durch die Ausbildung gangliosid-ähnlicher Lipooligosaccharid-Strukturen (LOS) eine Evasion des Immunsystems mittels Reaktion am Toll-like-receptor 4 durchführen, da das Immunsystem sie fälschlicherweise als körpereigene Ganglioside identifiziert (Finsterer, 2022). Im Verlaufe der Erkrankung bilden die Plasmazellen des Immunsystems AGAs, um die *C. jejuni* Infektion zu bekämpfen. Die AGA greifen auch die Gangliosidformationen im Myelin und in den Axonen an, was eine Komplementaktivierung und eine Infiltration von Immunzellen insbesondere Makrophagen und T-Zellen verursacht, die eine Entzündungsreaktion verursachen und die Myelinscheiden sowie in einzelnen Fällen auch das Axon selbst schädigen können. Die aus dieser Neuroinflammation hervorgehende Störung der Nerven führt zu den Symptomen des GBS. Daneben sind auch Infektionen mit *C. jejuni* ohne den Nachweis eines *molecular mimicry* bekannt, die trotzdem zu einem GBS geführt haben (Finsterer, 2022). Diesbezüglich werden alternative Mechanismen wie beispielsweise die Reaktion eines *C. jejuni* LOS mit dem Zellrezeptor Siglec-1 diskutiert (Malik et al., 2022). Ein weiterer möglicher Pathomechanismus bei GBS, das durch *Mycoplasma pneumoniae* verursacht wird, ist die anti-Galactocerebroside IgG vermittelte Immunreaktion (Cuttillo et al., 2020). Galactocerebroside gehören wie die Ganglioside zu den

komplexen Sphingolipiden (Gaspari et al., 2021). Bei MFS wird ebenfalls ein Mechanismus des *molecular mimicry* vermutet (Noioso et al., 2023).

Hinsichtlich der einzelnen AGA-Typen konnten spezifische Assoziationen von einzelnen AGAs mit bestimmten Erkrankungen gezeigt werden (Tab. 1).

Erkrankung	Assoziierte AGA	Getestete Patienten	Testverfahren	Referenzen
Akute motorische axonale Neuropathie	IgG Anti-GM1 und -GD1b	15	ELISA	(Naik et al., 2017)
Miller-Fisher-Syndrom Bickerstaff-Enzephalitis	IgG Anti-GQ1b	19, 16	ELISA, ELISA	(Chiba et al., 1993; Yuki et al., 1993)
Multifokale motorische Neuropathie	IgM Anti-GM1	2, 88	ELISA, ELISA	(Cats et al., 2010; Pestronk et al., 1988)
Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie	IgM Anti-GM1,-GM2 und -GD1b sowie Anti-GD1a	57	ELISA	(Nobile-Orazio et al., 2008)
Primär progressive Multiple Sklerose	Erhöhte T-Zell-Reaktivität gegen GM3 und GQ1b	31	-	(Pender et al., 2003)
Sekundär progressive Multiple Sklerose	IgM Anti-GM1	35	Anti-Ganglioside-Dot (Generic Assays)	(Ivanova & Zakharova, 2017)

Tabelle 1: Übersicht der mit Anti-Gangliosid-Antikörpern (AGA) assoziierten Erkrankungen

Mit der akuten inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (AIDP), welche wie die akute motorische axonale Neuropathie und die akute moto-sensorische axonale Neuropathie eine Unterform des GBS darstellt, konnten keine spezifischen AGA-Typen in Verbindung gebracht werden (Wanleenuwat et al., 2020). Dies wirft die Frage auf, ob der AIDP nicht möglicherweise ein anderer Pathomechanismus zugrunde liegt.

1.2.2 Nachweisverfahren

Die Nachweisverfahren von AGAs sind verschieden. Die Suche nach dem geeignetsten Verfahren ist Gegenstand intensiver Forschung: Neben dem Kosten-Nutzen-Verhältnis und der Sensitivität und Spezifität der Testverfahren steht insbesondere die Frage nach der diagnostischen Relevanz von AGA-Profilen im Vergleich zum Nachweis einzelner AGA und die damit einhergehende möglicherweise verbesserte Diagnostik im Mittelpunkt. Eine Reihe von kommerziellen Testkits ist auf dem Markt erhältlich. Dazu gehören unter anderem Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA), Line Dot Immunoassays und Line Immunoassays (Zhu et al., 2023).

Der ELISA kann als direkter, indirekter, kompetitiver oder Sandwich-ELISA durchgeführt werden. Zum Nachweis eines Antikörpers wird der indirekte ELISA verwendet.

Der indirekte ELISA, in diesem Fall als AGA-Such-ELISA, wird in mehreren Schritten durchgeführt: Ausgangsmaterialien sind ein mit den entsprechenden Antigenen beschichtetes Reaktionsgefäß. Diese Antigene sind beim AGA-Such-ELISA tierische Ganglioside. Weiterhin sind die Patientenprobe, wie zum Beispiel Serum oder Liquor, ein enzymgekoppelter sekundärer Antikörper gegen den in der Probe enthaltenen AGA und ein Enzymsubstrat von Nöten.

Die Probe wird in das beschichtete Reaktionsgefäß gegeben und die in der Probe enthaltenen AGA binden an die Antigene. Andere Antikörper in der Probe werden anschließend durch Waschen des Reaktionsgefäßes entfernt. Im nächsten Schritt wird der enzymgekoppelte sekundäre Antikörper hinzugegeben, welcher

an den gesuchten AGA bindet. Im Anschluss wird ein Enzymsubstrat beigefügt, welches durch das an den sekundären Antikörper gebundene Enzym in ein farbliches Produkt umgewandelt wird. Abschließend kann die dieses Produkt mithilfe eines photometrischen Detektionsverfahrens nachgewiesen und quantifiziert werden. Die daraus bestimmte Konzentration und das Volumen der Probe können nun verwendet werden, um daraus die Menge des gesuchten AGA zu berechnen (Fluhrer und Hampe, 2023).

Der Line Immunoassay und der Line Dot Immunoassay unterscheiden sich nicht in der Durchführung des Verfahrens, sondern in der Art des Teststreifens. Der Teststreifen des Line Dot Immunoassays kombiniert die Prinzipien des Line Immunoassays und des Immunodotassays. Ein Vorteil beider Verfahren im Vergleich zum herkömmlichen ELISA ist, die Möglichkeit zum Multiplexing, d.h. in einem Test kann auf mehrere zum Beispiel AGA getestet werden (siehe Anhang). Dadurch können AGA-Profile erstellt werden.

Beide Verfahren werden wie folgt durchgeführt (Vgl. Anhang): Der jeweilige Teststreifen wird in einer Inkubationsschale platziert und mit der jeweiligen Probe sowie den entsprechenden Vorbereitungs-lösungen inkubiert. Die AGA aus der Probe binden an die Antigene, die an den Teststreifen fixiert sind. Die Flüssigkeiten werden entfernt und die Teststreifen in Inkubationsschale gewaschen. Der Schale wird ein sekundärer enzymgekoppelter tierischer Antikörper hinzugefügt, welcher an die AGA bindet. Dieser wird erneut inkubiert, die Flüssigkeit entfernt und der Teststreifen samt Inkubationsschale gewaschen. Ein Enzymsubstrat wird hinzugefügt, welches von dem Enzym, das an den sekundären Antikörper gebunden ist, umgewandelt wird und somit eine Farbveränderung auf dem Teststreifen hervorruft. Die Farbintensität der jeweiligen Streifen gibt Aufschluss über die Konzentration des AGA. Der Teststreifen wird je nach Hersteller und Verfahren nun manuell oder maschinell ausgewertet. Der Nachweis ist qualitativ oder semi-quantitativ.

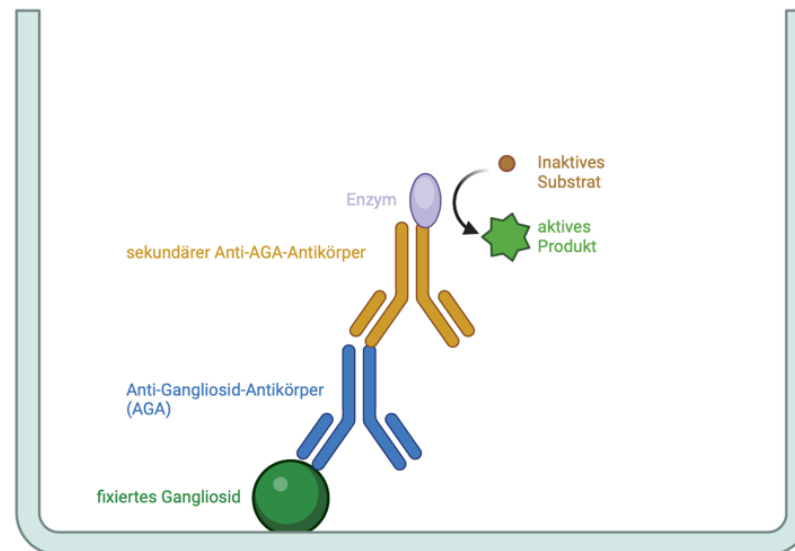


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Anti-Gangliosid-Antikörper-Nachweises mittels eines sekundären enzymgebundenen Antikörpers. Eigene Abbildung, erstellt mittels Biorender.com

1.2.3 Kreuzansprechen und Kreuzreaktivität

Kreuzreaktionen werden in der Immunologie als Antikörperbindung an mehr als ein Antigen definiert. Im Aufbau dieser Studie kann eine Kreuzreaktion nicht von einem gleichzeitigen Auftreten von zwei positiven AGA unterschieden werden, weswegen in dieser Arbeit der Begriff Kreuzansprechen verwendet wird. Dieser beinhaltet sowohl die Kreuzreaktion als auch das gleichzeitige Auftreten zweier positiver AGA innerhalb eines Tests.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser großangelegten retrospektiven Studie ist, die AGA-Testung mithilfe eines Line Dot Tests im klinischen Alltag zu untersuchen. Nahezu alle Studien zu AGA-Positivitäten wurden mit ELISA-Testung durchgeführt. Zusätzlich war die Diagnose vor der Testung in den meisten Fällen bekannt. Es soll untersucht werden, ob eine Line Dot Testung im klinischen Alltag reproduzierbar bei der Diagnostik helfen kann und wenn ja, bei welchen Erkrankungsgruppen. Zusätzlich soll die Frage beantwortet werden können, ob sowohl Serumblut als auch Liquor verwendet werden können und ob es relevante Unterschiede in der Testgenauigkeit gibt. Weiterhin wurde sich auch mit der Definierung neuer sowie der Verifizierung oder Falsifizierung bereits bekannter AGA-Profile für verschiedene Erkrankungsgruppen und deren wissenschaftliche Untermauerung durch Studien mit einer großen Probenzahl wie unserer beschäftigt. Schließlich ergibt sich durch die Nutzung der Line Dot Tests die Möglichkeit, Kreuzansprechen zwischen den verschiedenen AGA zu untersuchen und dadurch neue Erkenntnisse und Forschungsansätze zum genaueren Verständnis zu erlangen.

1.4 Erklärung zur Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in den folgenden Publikationsschriften veröffentlicht:

Giesche, N., Böhm-Gonzalez, S.T., Kleiser, B., Kowarik, M.C., Dubois, E., Stransky, E., Armbruster, M., Grimm, A., Marquetand, J., 2024. Antiganglioside antibody frequency in routine clinical care settings. Euro J of Neurology e16290. <https://doi.org/10.1111/ene.16290>

Zusätzlich wurde eine Lizenzgenehmigung zur Verwendung des gesamten Papers inklusive der Abbildungen eingeholt:

Lizenznummer: 5872031277015 (18.09.2024)

Kleiser B, Giesche N, Kowarik MC, Dubois E, Armbruster M, Grimm A, Marquetand J. Anti-sulfatide antibodies in neurological disorders: should we test? J Neurol. 2024 Sep 3. doi: 10.1007/s00415-024-12668-8. Epub ahead of print. PMID: 39225745.

Lizenz: CC BY 4.0

Link zur Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Link zur Quelle: <https://doi.org/10.1007/s00415-024-12668-8>

Im Verlaufe der Dissertationsschrift wird sich laufend auf die Veröffentlichung bezogen und dies wird nach Absprache durch die Ankündigung kenntlich gemacht und im weiteren Verlauf nicht jedes Mal wieder zitiert.

2 Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv der hier vorgelegten Studie umfasst 3560 Serum- oder Liquortests von 1342 Patientinnen und Patienten. Davon waren 509 weiblich und 833 männlich. Die Patientinnen und Patienten wurden zwischen 4. Januar 2012 und dem 23. November 2022 am Universitätsklinikum in Tübingen behandelt. Der Anteil aus Serumproben beträgt 2636 Tests und der der Liquorproben entsprechend 924 Tests der insgesamt 3560 Tests. Den Patientinnen und Patienten wurde jeweils nur einmal eine Serum- und/oder Liquorprobe entnommen. In dieser Studie sind keine Patientinnen und Patienten inkludiert, denen mehrfach Proben abgenommen wurden. Weitere Merkmale des Patientenkollektives befinden sich in Tabelle 2:

	Patienten
Anzahl gesamt	1342
♀	509
♂	833
Mittleres Alter mit SD (in Jahren)	58 ± 17,7
Min. und max. Alter (in Jahren)	<1-94

***SD=Standardabweichung**

Tabelle 2: Soziodemographie des Patientenkollektives

2.2 Ablauf der Diagnosefindung

Die Indikation für die AGA-Bestimmung wurde von den behandelnden Ärzten indiziert, jedoch lässt es sich aufgrund des retrospektiven Studiendesigns dieser Studie im Nachhinein nicht feststellen, wie diese Indikation zu Stande kam. Alle Proben wurden mittels des *Anti-Ganglioside Dot kits (GA Generic Assays GmbH)* semiquantitativ auf Präsenz von IgM- und IgG-Antikörpern gegen 11 Gangliosidtypen (GM1, GM2, GM3, GM4, GD1a, GD1b, GD2, GD3, GT1a, GT1b und GQ1b) getestet. Das semiquantitative Ergebnis wurde mittels einer Farbreaktion abgelesen. Die Konzentration des Antikörpers in der Probe entspricht der Farbtintensität des Teststreifens und wird in 5 Stufen unterteilt: „negativ“ (-), „schwach positiv“ ((+)), „einfach positiv“ (+), „doppelt positiv“ (++) und „dreifach positiv“ (+++). Eine genaue Einteilung der unterschiedlichen Abstufungen der Farbtintensitäten durch den Hersteller oder durch Dritte war nicht möglich. In dieser Studie wurden die Intensitäten „negativ“ und „schwach positiv“ als negativer Test und die Intensitäten „einfach“, „doppelt“ und „dreifach positiv“ als positiver Test gewertet und dementsprechend kodiert. Ein Test gilt als positiv, wenn er mindestens für einen AGA positiv ausfiel. Sulfatide wurden ebenfalls durch den Immunoassay mitbestimmt, jedoch wurden die Ergebnisse in diese Studie nicht miteinbezogen, da Sulfatide nicht Teil der Gangliosidgruppe sind. Da in dieser Studie einer Patientin oder einem Patienten maximal jeweils 1 Serum- und Liquorprobe entnommen wurde und diese Probe jeweils für IgG- und IgM-AGA getestet wurde, wird in dieser Arbeit zwischen Probe (Serum oder Liquor) und Test (IgG oder IgM) unterschieden.

Es wurde durch die Mitarbeiter des Labors der Universitätsklinik Tübingen eine pseudonymisierte Liste angefertigt. Diese Liste enthielt 3.588 Tests. 28 Tests wurden von vornherein ausgeschlossen, da die Pseudonyme nicht mit einem Patienten in Verbindung gebracht werden konnten oder für die entsprechenden Patienten keine einsehbare Diagnose im EDV-System hinterlegt war. Die 3.560 Tests bestehen aus 2636 Tests aus Serumproben und 924 Tests aus Liquorproben.

Den Tests wurde nun innerhalb des gesicherten Kliniknetzwerkes nach vorheriger Sichtung der neurologischen Fachliteratur, aktuellen Leitlinien und Diagnosekriterien entsprechend der verfügbaren Patientendokumente einer Diagnose (s.u.) zugeordnet. Diese wurden mit PD Dr. med Marquetand besprochen, verifiziert oder korrigiert und daraufhin anonymisiert in eine Liste mit den Ergebnissen der Tests eingetragen.

Das Design und die Verfahren dieser Studie, die gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt wurde, wurden von der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen positiv beraten (189/2023B O2).

2.3 Auswertung der Daten und Analyse

Die gesamte Auswertung der anonymisierten Tabelle wurde mithilfe von Windows Excel durchgeführt. Die AGA-Positivrate für alle Serum- und Liquortests wurde zur Übersicht bestimmt. Innerhalb der Forschergruppe wurden 14 Diagnosegruppen erarbeitet. Die Gruppen orientieren sich an mit AGA-assoziierten Erkrankungen (AaE) (s. Tab. 1), d.h. Erkrankungen, bei denen ein ähnlicher Pathomechanismus wie bei den AaE vermutet wird, Erkrankungen, die in den frühen Analysen der Daten gehäuft vorkamen sowie Gruppen für alle Erkrankungen, auf die keine der 3 vorgenannten Merkmale zutrifft. In diese Gruppen wurden die Tests mitsamt ihrer entsprechenden Diagnose aufgeteilt. Für diese 14 Diagnosegruppen wurden nun die relativen und absoluten Positivraten für jeweils alle 11 AGAs bestimmt und graphisch mithilfe einer Farbskalierung dargestellt.

Übersicht über die 14 Diagnosegruppen
Guillain-Barré-Syndrom
Akute motorische axonale Neuropathie
Miller-Fisher-Syndrom
Multifokale motorische Neuropathie
Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie
Andere autoimmune Polyneuropathien
Andere nicht-autoimmune Polyneuropathien
Multiple Sklerose
Andere autoimmune Enzephalopathien
Amyotrophe Lateralsklerose
Andere Motoneuronenerkrankungen
Andere neurologische Erkrankungen
Andere nicht-neurologische Erkrankungen
Keine nachgewiesene Erkrankung/ k.A.

Tabelle 3: Eine Übersicht aller 14 Diagnosegruppen

Im nächsten Schritt wurde das Kreuzansprechen zwischen jedem der 11 AGAs analysiert. Da in der anfänglichen Analyse der generellen Serum- und Liquortests die Positivrate der Liquortests sehr gering war, wurde auf eine Analyse des Kreuzansprechens von Liquortests verzichtet.

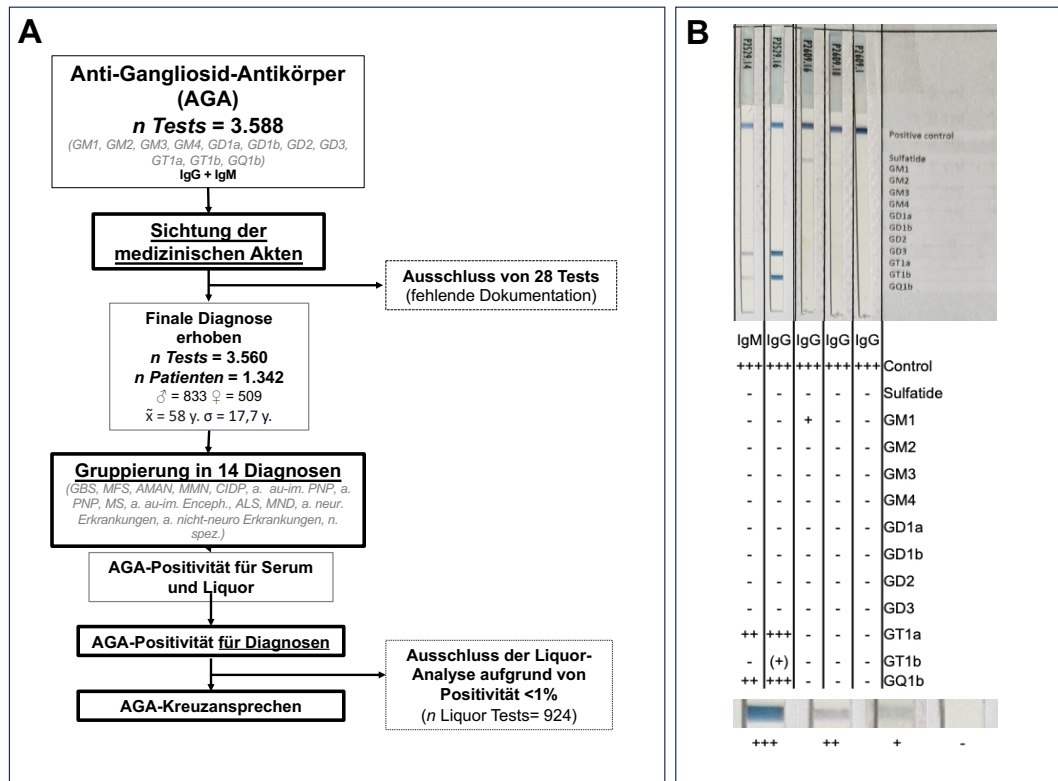


Abbildung 4: (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)):
 A: Workflow der Diagnosefindung und Auswertung B: oben: Ein Foto von 5 verschiedenen Tests; unten: eine schematische Darstellung der oben gezeigten Tests inklusive der Auswertung und Farbskalierung.

3 Ergebnisse

3.1 Soziodemografie

Das durchschnittliche Alter des Patientenkollektives betrug $58 \pm 17,7$ Jahre. Die erhobenen Daten stammen von 1342 Patienten, von denen 509 weiblich und 833 männlich sind (siehe Tab. 2).

3.2 Analyse der mit den Anti-Gangliosid-Antikörpern assoziierten Erkrankungen

Die Gesamtpositivrate aller Serum- und Liquortests lag bei 4,4%, was 158 positiven Tests aus insgesamt 3560 entspricht. Bei isolierter Betrachtung der Serumtest lag die Positivrate bei 5,8% (154/2636) und somit 1,4% über der Gesamtpositivrate, während die Positivrate der Liquortests bei 0,4% (4/924) und somit 4% unter der Gesamtpositivrate lag. Zu allen 4 positiven Liquortests gab es ein positives Serumtestäquivalent. Somit hat kein Liquortest zu einem positiven Ergebnis geführt, welches der Serumtest nicht auch angezeigt hat.

Im folgendem Teil werden die AGA besprochen, welche jeweils in Beziehung zu den 14 Diagnosegruppen in Serum- und Liquortests positiv ausfielen. Um die Relevanz der AGA zur jeweiligen Diagnosegruppe zu quantifizieren, wurde die Standardabweichung im Serum für IgG mit 15,6% und für IgM mit 8,1% berechnet und jeweils als Grenzwert festgelegt, ab dem eine Positivrate als relevant eingestuft wurde – letztlich ein Verfahren um den möglichen „natürlichen“ vorkommenden AGA-Befunden zu begegnen. Die Standardabweichung für IgG im Liquor betrug 12,4%. Für IgM AGA im Liquor gab es nur einen positiven Wert, weswegen auf die Bestimmung der Standardabweichung verzichtet wurde. Weiterhin wurden die Serumtests nicht nur hinsichtlich der Positivitäten innerhalb der Diagnosegruppen ausgewertet, sondern auch hinsichtlich des prozentualen Anteils einer jeden Diagnosegruppe an eines jeden AGA und der jeweiligen Ig-

Klasse. Hier wurden ebenfalls Standardabweichungen als Grenzwerte berechnet. Diese betragen für IgG 17,0% und für IgM 13,4%.

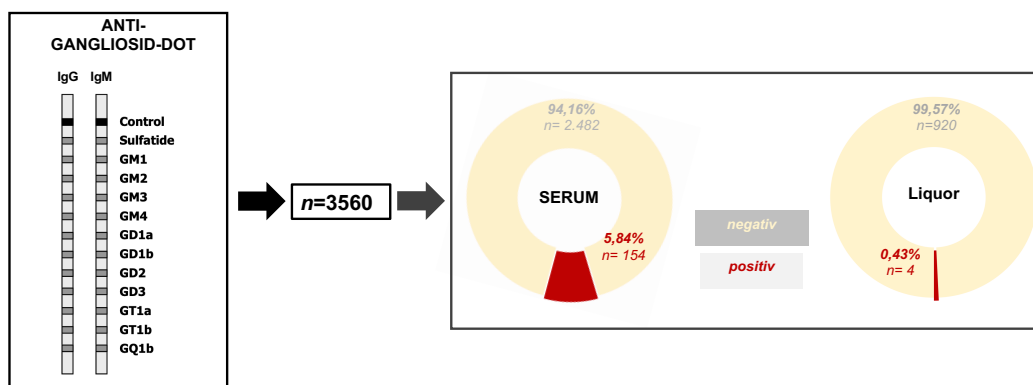


Abbildung 5: (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der linken Seite ist eine schematische Darstellung der Anti-Gangliosid-Dot-Teststreifen gezeigt. Rechts davon befindet sich die Gesamtzahl der Tests. Auf der rechten Seite sind die Zahlen der Tests für Serum und Liquor gezeigt. Aufgeteilt in positive und negative AGA-Tests mit jeweils Prozentzahlen und absoluten Zahlen.

3.2.1 Serum

Die insgesamt 3 der Akuten motorischen axonalen Neuropathie (AMAN) Proben zeigen für IgG AGA eine relevante Positivrate bei GM1 mit 33,3% (1/3), bei GD1a mit 66,7% (2/3) und bei GT1a ebenfalls mit 66,7% (2/3).

Für IgM AGA zeigte sich bei der AMAN bei GM2 mit 33,3% (1/3), bei GT1a mit 33,3% (1/3) und bei GQ1b mit 33,3% (1/3) eine relevante Positivrate.

Bei einer Probengröße von 19 für das MFS wurde für IgG AGA eine relevante Positivrate für GD1a mit 15,8% (3/19), für GD3 mit 21,1% (4/19), für GT1a mit 57,9% (11/19) und für GQ1b mit ebenfalls 57,9% (11/19) gezeigt.

Hinsichtlich der IgM AGA für die Proben mit dem MFS konnte für GM1, für GT1a und GQ1b mit jeweils 15,8% (3/19) eine relevante Positivität festgestellt werden.

Die 18 MMN-Proben zeigten nur für IgM AGA relevante Ergebnisse. Für GM1 mit 33,3% (6/18), für GM2 mit 16,7% (3/18) und für GQ1b mit 11,1% (2/18) wurden die Grenzen von 8,1% überschritten.

Ebenfalls bei den IgM AGA konnte bei den 70 Proben der CIDP ein relevante Positivität für GM1 mit 10% (7/70) gezeigt werden.

Diagnosegruppen	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b		Anzahl der Serumtests pro Diagnosegruppe
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
Guillain-Barré-Syndrom	5,2%	7,8%	1,3%	2,6%	1,3%				2,6%		5,2%	2,6%		1,3%		1,3%	1,3%	2,6%	1,3%			1,3%	77
	4	6	1	2	1				2		4	2		1		1	1	2	1			1	
AMAN	33,3%			33,3%					66,7%							66,7%	33,3%					33,3%	3
	1			1					2							2	1					1	
Miller-Fisher-Syndrom		15,8%							15,8%		5,3%	5,3%	5,3%		21,1%	57,9%	15,8%	10,5%			57,9%	15,8%	19
		3							3		1	1	1		4	11	3	2			11	3	
MMN	5,6%	33,3%		16,7%		5,6%		5,6%			5,6%						5,6%					11,1%	18
	1	6		3		1		1			1						1					2	
CIDP	4,3%	10,0%			1,4%		2,9%	1,4%	1,4%	1,4%	2,9%	1,4%	1,4%		1,4%		1,4%			2,9%			70
	3	7			1		2	1	1	1	2	1	1		1		1			2			
andere autoimmune PNP		7,1%		2,4%					2,4%		2,4%				2,4%	2,4%	2,4%	2,4%		2,4%		2,4%	42
		3		1					1		1				1	1	1	1		1		1	
andere PNP	0,6%	1,2%		0,9%		0,3%	0,3%		1,5%		0,6%		0,6%		0,3%	0,3%	0,9%	0,9%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	344
	2	4		3		1	1		5		2		2		1	1	3	3	1	1	1	1	
MS		4,2%		4,2%	4,2%				4,2%		4,2%								4,2%				24
		1		1	1				1		1								1				
andere autoimmune Enzephalopathien	3,1%				6,3%		3,1%		3,1%														32
	1				2		1		1														
ALS	1,6%	6,5%					1,6%				1,6%												62
	1	4					1				1												
andere Motoneuron-erkrankungen																							9
andere neurolog. Erkrankungen	0,8%	1,5%	0,3%	1,0%	0,3%	1,3%	0,3%	0,3%	0,3%		0,8%		0,3%	0,5%	0,3%	1,0%	0,3%	0,3%				0,3%	391
	3	6	1	4	1	5	1	1	1		3		1	2	1	4	1	1				1	
andere nicht-neurolog. Erkrankungen	0,5%	2,2%		1,1%		0,5%	1,1%		1,6%		0,5%		0,5%	0,5%	0,5%	0,5%			0,5%				186
	1	4		2		1	2		3		1		1	1	1	1			1				
Keine nachgewiesene Erkrankung/ K.a.	2,4%	4,9%		2,4%		2,4%					2,4%			2,4%									41
	1	2		1		1					1			1									

Abbildung 6: Positivraten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der rechten Y-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro Diagnosegruppe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle, nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Die Grenzwerte im Sinne der jeweiligen Standardabweichungen liegen bei IgG bei 15,6% und bei IgM bei 8,1%.

Diagnosegruppen	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b		Anzahl der Serumtests pro Diagnosegruppe
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
Gullain-Barré-Syndrom																							77
AMAN	33,3% 1		33,3% 1						66,7% 2								66,7% 2	33,3% 1				33,3% 1	3
Miller-Fisher-Syndrom		15,8% 3							15,8% 3					21,1% 4			57,9% 11	15,8% 3			57,9% 11	15,8% 3	19
MMN		33,3% 6		16,7% 3																		11,1% 2	18
CIDP		10,0% 7																					70
andere autoimmune PNP																							42
andere PNP																							344
MS																							24
andere autoimmune Enzephalopathien																							32
ALS																							62
andere Motoneuron-erkrankungen																							9
andere neurolog. Erkrankungen																							391
andere nicht-neurolog. Erkrankungen																							186
Keine nachgewiesene Erkrankung/ K.a.																							41

Abbildung 7: Positivraten über den Grenzwerten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der rechten Y-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro Diagnosegruppe. Nur relevante Positivraten über 15,6% bei IgG und 8,1% bei IgM sind abgebildet.

Die Diagnosegruppe *GBS* erreicht einen relevanten Anteil an positiven Tests in der IgG-Klasse für den GM1 AGA (22,2%; 4/18), für den GM2 AGA (50%; 1/2); den GM3 AGA (20%; 1/5); den GD1b AGA (50%; 4/8) und den GT1b AGA (28,6%; 2/7). In der IgM-Klasse erreicht die Diagnosegruppe *GBS* für den GD1b AGA (14,3%; 2/14); den GD2 AGA (16,7%; 1/6), den GD3 AGA (25%; 1/4) und den GT1b AGA (14,3%; 1/7).

In der IgG-Klasse zeigt die Diagnosegruppe *MFS* einen relevanten positiven Testanteil für den GD2 AGA (50%; 1/2), für den GD3 AGA (40%; 4/10); für den GT1a AGA (55%; 11/20), für den GT1b AGA (28,6%; 2/7) und für den GQ1b AGA (84,6%; 11/13). Außerdem erreicht die Diagnosegruppe *MFS* in der IgM-Klasse relevante Anteile für den GT1a AGA (20%; 3/15) und den GQ1b AGA (33,3%; 3/9).

Ein relevanter Anteil an positiven Tests wird von der Diagnosegruppe *MMN* in der IgM-Klasse für den GM2 AGA (16,7%; 3/18), den GM3 AGA (20%; 1/5), den GM4 Aga (25%; 1/4) und den GQ1b AGA (22,2%; 2/9) erreicht.

In der Diagnosegruppe *CIDP* zeigen sich in der IgG-Klasse für den GD2 AGA (50%; 1/2) und in der IgM-Klasse für den GM1 AGA (15,2%; 7/46), den GM3 AGA (20%; 1/5), den GM4 AGA (50%; 2/4), den GD1a AGA (100%; 1/1), den GD1b AGA (14,3%; 2/14), den GD2 AGA (16,7%; 1/6), den GD3 AGA (25%;1/4) und den GT1b AGA (28,6%; 2/7) relevante Positivitäten.

In der IgM-Klasse erreicht die Diagnosegruppe *andere autoimmune PNP* relevanten Positivraten für den GD3 AGA (25%; 1/4) und den GT1b AGA (14,3%; 1/7).

Die Diagnosegruppe *andere PNP* zeigt in der IgG-Klasse für den GD1a AGA (25%; 5/20) und in der IgM-Klasse den GM2 AGA (16,7%; 3/18), den GM3 AGA (20%; 1/5), den GD1b AGA (14,3%; 2/14), den GD2 AGA (33,3%; 2/6), den GD3 AGA (25%; 1/4), den GT1a AGA (20%; 3/15) und den GT1b AGA (14,3%; 1/7) einen relevanten Anteil an positiven Tests.

Außerdem wird eine relevante Positivität den GM3 IgG AGA von der Diagnosegruppe *MS* (20%; 1/5) und der Diagnosegruppe *andere autoimmune Enzephalopathien* (25%; 2/5) erreicht.

Die Diagnosegruppe *andere neurologische Erkrankungen* zeigt in der IgG-Klasse relevante Positivraten für den GM2 AGA (50%; 1/2), den GM3 AGA (20%; 1/5), den GM4 AGA (50%; 4/8) und den GD3 AGA (20%; 2/10) sowie in der IgM-Klasse für den GM2 AGA (22,2%; 4/18), den GM4 AGA (25%; 1/4), den GD1b AGA (21,4%; 3/14), den GD2 AGA (16,7%; 1/6), den GT1a AGA (26,7%; 4/15) und den GT1b AGA (14,3%; 1/7).

Weiterhin zeigt die Diagnosegruppe *andere nicht-neurologische Erkrankungen* ein relevanten Anteil an positiven Tests für den GM4 AGA (20%; 2/10) in der IgG-Klasse und für den GM3 AGA (20%;1/5), den GD2 AGA (16,7%;1/6) und den GT1b AGA (14,3%;1/7) in der IgM-Klasse.

Zuletzt erreicht die Diagnosegruppe *Keine nachgewiesene Erkrankung/K.A.* eine relevante Positivrate für den GM3 IgM AGA (20%;1/5).

Diagnosegruppen	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
	Guillain-Barré-Syndrom	22,2% 4	13,0% 6	50,0% 1	11,1% 2	20,0% 1				10,0% 2		50,0% 4	14,3% 2		16,7% 1		25,0% 1	5,0% 1	6,7% 1	28,6% 2	14,3% 1	
AMAN	5,6% 1			5,6% 1					10,0% 2								10,0% 2	6,7% 1				11,1% 1
Miller-Fisher-Syndrom		6,5% 3							15,0% 3		12,5% 1	7,1% 1	50,0% 1		40,0% 4		55,0% 11	20,0% 3	28,6% 2		84,6% 11	33,3% 3
MMN	5,6% 1	13,0% 6		16,7% 3		20,0% 1		25,0% 1			12,5% 1							6,7% 1				22,2% 2
CIDP	16,7% 3	15,2% 7			20,0% 1		50,0% 2	5,0% 1	100,0% 1		12,5% 1	14,3% 2	50,0% 1	16,7% 1		25,0% 1		6,7% 1		28,6% 2		
andere autoimmune PNP		6,5% 3		5,6% 1					5,0% 1		7,1% 1				10,0% 1	25,0% 1	5,0% 1	6,7% 1		14,3% 1	7,7% 1	
andere PNP	11,1% 2	8,7% 4		16,7% 3	20,0% 1	10,0% 1		25,0% 5			14,3% 2		33,3% 2	10,0% 1	25,0% 1	15,0% 3	20,0% 3	14,3% 1	14,3% 1	7,7% 1	11,1% 1	
MS		2,2% 1		5,6% 1	20,0% 1				5,0% 1		7,1% 1								14,3% 1			
andere autoimmune Enzephalopathien	5,6% 1				40,0% 2		10,0% 1		5,0% 1													
ALS	5,6% 1	8,7% 4					10,0% 1				7,1% 1											
andere Motoneuron-erkrankungen																						
andere neurolog. Erkrankungen	16,7% 3	13,0% 6	50,0% 1	22,2% 4	20,0% 1		50,0% 5	25,0% 1	5,0% 1		21,4% 3		16,7% 1	20,0% 2			5,0% 1	26,7% 4	14,3% 1	14,3% 1		11,1% 1
andere nicht-neurolog. Erkrankungen	5,6% 1	8,7% 4		11,1% 2	20,0% 1	20,0% 2		15,0% 3			7,1% 1		16,7% 1	10,0% 1		5,0% 1			14,3% 1			
Keine nachgewiesene Erkrankung! K.a.	5,6% 1	4,3% 2		5,6% 1	20,0% 1						12,5% 1				10,0% 1							
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9

Abbildung 8: Positivraten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro AGA und Ig-Klasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle, nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

Diagnosegruppen	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b		
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
Gullain-Barré-Syndrom	22,2%		50,0%		20,0%						50,0%									28,6%			
AMAN																					28,6%		
Miller-Fisher-Syndrom													50,0%		40,0%		55,0%		28,6%		84,6%		
MMN																							
CIDP													50,0%										
andere autoimmunisierte PNP																							
andere PNP									25,0%														
MS					20,0%																		
andere autoimmunisierte Enzephalopathien					40,0%																		
ALS																							
andere Motoneuron-erkrankungen																							
andere neurolog. Erkrankungen			50,0%		20,0%		50,0%								20,0%								
andere nicht-neurolog. Erkrankungen							20,0%																
Keine nachgewiesene Erkrankung/ K.a.																							
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9	

Abbildung 9: Positivraten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum für IgG (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro AGA und Ig-Klasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle, nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Nur relevante Positivraten über 17% bei IgG sind abgebildet.

Diagnosegruppen	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b		
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
	Guillain-Barré-Syndrom											14,3%	2	16,7%	1	25,0%	1			14,3%	1		
AMAN																							
Miller-Fisher-Syndrom																		20,0%	3			33,3%	3
MMN			16,7%	3	20,0%	1	25,0%	1														22,2%	2
CIDP	15,2%	7			20,0%	1	50,0%	2	100,0%	1	14,3%	2	16,7%	1	25,0%	1					28,6%	2	
andere autoimmune PNP															25,0%	1					14,3%	1	
andere PNP			16,7%	3	20,0%	1					14,3%	2	33,3%	2	25,0%	1		20,0%	3		14,3%	1	
MS																							
andere autoimmune Enzephalopathien																							
ALS																							
andere Motoneuron-erkrankungen																							
andere neurolog. Erkrankungen			22,2%	4			25,0%	1			21,4%	3	16,7%	1				26,7%	4		14,3%	1	
andere nicht-neurolog. Erkrankungen					20,0%	1							16,7%	1							14,3%	1	
Keine nachgewiesene Erkrankung/ K.a.					20,0%	1																	
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9	

Abbildung 10: Positivraten der 11 getesteten AGA in den 14 Diagnosegruppen im Serum für IgM (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 14 Diagnosegruppen und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro AGA und Ig-Klasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle, nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Nur relevante Positivraten über 13,4% bei IgM sind abgebildet.

3.2.2 Liquor

Bei Analyse der Liquorproben fällt auf, dass von 4 Proben insgesamt 3 mit dem MFS und eine mit einer anderen nicht-autoimmunen Polyneuropathie assoziiert werden konnte.

Bei den 7 MFS Proben zeigten sich relevante Positivitäten nur bei IgG AGA. Folgende AGA überschritten die Grenze von 12,4%: GD1a, GD1b und GT1b mit jeweils 14,3% (1/7) und GT1a mit 42,9% (3/7).

Hinsichtlich der anderen nicht-autoimmunen Polyneuropathie zeigte sich nur eine Assoziation bei IgG AGA: GD3 mit 0,9% (1/113). Aufgrund der solitären Anzahl an positiven Ergebnissen für Liquor IgG AGA wurde von einer Berechnung der Standardabweichung abgesehen. Dadurch konnte die Relevanz der Positivität nicht quantifiziert werden.

Diagnosegruppen	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b		Anzahl der Liquortests pro Diagnosegruppe
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
Miller-Fisher-Syndrom									14,3%	1	14,3%	1					42,9%	3	14,3%	1			7
andere PNP															0,9%	1							113

Abbildung 11: Positivitäten der 11 getesteten AGA in 2 Diagnosegruppen im Liquor (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der linken Y-Achse befinden sich die 2 Diagnosegruppen und auf der rechten Y-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Liquortests pro Diagnosegruppe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Die Grenzwerte im Sinne der jeweiligen Standardabweichungen liegen bei IgG bei 12,4%. Für IgM wurden sie nicht bestimmt, da nur ein Ergebnis über 0% existiert.

3.3 Analyse des Kreuzansprechens der Anti-Gangliosid-Antikörper

Für die Analyse des Kreuzansprechens wurden ebenfalls die Standardabweichungen jeweils für IgG- und IgM-Tests berechnet. Für IgG-Tests beträgt die Standardabweichung 10,0% und für die IgM-Tests 8,5 % bezogen auf alle positiven Tests pro AGA.

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
GM1	X		15,0%		10,0%	20,0%	21,4%	7,1%	14,3%	4,8%	18,2%	45,5%	12,5%	12,5%		14,3%		14,3%		35,7%		18,2%
GM2		4,7%	X		10,0%		14,3%				4,5%		25,0%				5,7%					9,1%
GM3	1,6%	3,1%		5,0%	X		7,1%	14,3%														
GM4	4,7%	1,6%		10,0%	10,0%	20,0%	X						12,5%		7,1%		2,9%					4,5%
GD1a	4,7%	1,6%						X		9,1%		12,5%					20,0%		28,6%	7,1%		4,5%
GD1b	6,3%	15,6%		5,0%				9,5%		X		25,0%	12,5%				2,9%	8,6%	7,1%	7,1%		4,5%
GD2	1,6%	1,6%		10,0%			7,1%	4,8%	9,1%	4,5%		X					2,9%	2,9%	7,1%			4,5%
GD3		3,1%					7,1%								X		11,4%	5,7%		7,1%	13,6%	4,5%
GT1a		7,8%		10,0%			7,1%	33,3%	4,5%	13,6%	12,5%	12,5%	28,6%	14,3%			X		28,6%	28,6%	45,5%	36,4%
GT1b		7,8%						19,0%	4,8%	4,5%	4,5%	12,5%			7,1%		11,4%	11,4%		X		4,5%
GQ1b		6,3%		10,0%			7,1%	4,8%			4,5%		12,5%	21,4%	7,1%		28,6%	22,9%		7,1%		X
POSITIVE TESTS PRO AGA	64		20		10		14		21		22		8		14		35		14		22	

Abbildung 12: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Gesamtzahl an Serumtests pro Gangliosid. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Die Grenzwerte im Sinne der jeweiligen Standardabweichungen liegen bei IgG bei 10,0% und bei IgM bei 8,5%.

Neben der Betrachtung der Kreuzansprechensraten bezogen auf die absolute Gesamtzahl der positiven Tests pro AGA wie in Abb. 10, können die Prozentzahlen sich auch auf die Gesamtzahl der positiven Tests der jeweiligen Ig-Klasse pro AGA beziehen, wie in Abb. 11 gezeigt. Dies hat den Vorteil,

genauere Ergebnisse insbesondere bei AGA, die beim Kreuzansprechen eine Asymmetrie von IgG- und IgM-Verteilung aufweisen, zu zeigen. Entsprechend den veränderten Prozentsätze wurden auch die Standardabweichungen erneut berechnet. Für IgG AGA beträgt die Standardabweichung und somit der relevante Grenzwert 21,5% und für IgM AGA 22,8%.

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
GM1	X		16,7%	40,0%	20,0%	40,0%	30,0%	25,0%	15,0%	100,0%	50,0%	71,4%	50,0%	16,7%		50,0%		33,3%		71,4%		44,4%
GM2		X	6,5%			20,0%		50,0%				7,1%		33,3%				13,3%				22,2%
GM3	5,6%	4,3%		X			10,0%	50,0%														
GM4	16,7%	2,2%		11,1%	20,0%	40,0%	X						16,7%		25,0%		6,7%					11,1%
GD1a	16,7%	2,2%							X	25,0%		50,0%				35,0%		57,1%	14,3%			7,7%
GD1b	22,2%	21,7%		5,6%					10,0%		X	100,0%	16,7%		5,0%	20,0%	14,3%	14,3%				11,1%
GD2	5,6%	2,2%		11,1%			25,0%	5,0%		25,0%	7,1%		X		5,0%	6,7%	14,3%					11,1%
GD3		4,3%					25,0%							X	20,0%	13,3%		14,3%			23,1%	11,1%
GT1a		10,9%		11,1%			25,0%	35,0%		12,5%	21,4%	50,0%	16,7%	40,0%	50,0%		X	57,1%	57,1%	76,9%	88,9%	
GT1b		10,9%						20,0%	100,0%	12,5%	7,1%	50,0%			25,0%	20,0%	26,7%		X			7,7%
GQ1b		8,7%		11,1%			25,0%	5,0%			7,1%		16,7%	30,0%	25,0%	50,0%	53,3%	14,3%				X
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9

Abbildung 13: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum (Übersetzt und verändert nach Giesche et al. (2024)): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Die Grenzwerte im Sinne der jeweiligen Standardabweichungen liegen bei IgG bei 21,5% und bei IgM bei 22,8%.

3.3.1 IgG-Tests

GD2-Tests zeigten ein Kreuzansprechen mit den meisten, nämlich 5 anderen AGA (GM1(50%; 1/2) , GD1a (50%; 1/2), GD1b (100%; 2/2), GT1a (50%; 1/2) und GT1b (50%; 1/2)). Darauf folgt GD1b mit 3 weiteren AGA (GM1 (50%; 4/8), GD1a (25%; 2/8) und GD2 (25%; 2/8).

Der höchste Prozentwert zeigte sich zwischen GD2 und GD1b mit 100%. Danach folgt GQ1b und GT1a mit 76,9%.

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b		
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
GM1	X						30,0% 3				50,0% 4	50,0% 1											
GM2			X																				
GM3					X																		
GM4							X																
GD1a								X		25,0% 2	50,0% 1				35,0% 7	57,1% 4							
GD1b	22,2% 4										X	100,0% 2											
GD2										25,0% 2		X											
GD3														X									23,1% 3
GT1a								35,0% 7				50,0% 1	40,0% 4		X	57,1% 4							76,9% 10
GT1b											50,0% 1							X					
GQ1b														30,0% 3	50,0% 10								X
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9	

Abbildung 14: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum: Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Nur relevante Positivraten gleich oder größer 21,5% bei IgG sind abgebildet.

3.3.2 IgM-Tests

GM4 zeigte bei den IgM-Tests Kreuzansprechen mit den meisten anderen AGA, in diesem Falle 7: GM1 (25%; 1/4), GM2 (50%; 2/4), GM3 (50%, 2/4), GD2 (25%, 1/4), GD3(25%, 1/4), GT1a (25%, 1/4) sowie GQ1b (25%, 1/4).

An zweiter Stelle folgt GD3 mit 5 weiteren AGA: mit GM1 (50%, 2/4), GM4 (25%; 1/4), GT1a (50%; 2/4), GT1b (25%; 1/4) und GQ1b (25%; 1/4).

Der höchste Prozentwert zeigte sich zwischen GD1a und GM1 sowie GT1b mit 100%. Danach folgt GQ1b und GT1a mit 88,9% und GD1b sowie GT1b jeweils mit GM1 mit 71,4%.

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
GM1	X				40,0%	25,0%			100,0%	71,4%					50,0%		33,3%		71,4%			44,4%
GM2		X					50,0%						33,3%									
GM3			X				50,0%															
GM4				X											25,0%							
GD1a								X														
GD1b										X												
GD2							25,0%						X									
GD3							25,0%							X								
GT1a							25,0%								50,0%	X			57,1%			88,9%
GT1b									100,0%						25,0%		26,7%	X				
GQ1b							25,0%								25,0%		53,3%					X
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9

Abbildung 15: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum: Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate. Nur relevante Positivraten gleich oder größer 22,8% bei IgM sind abgebildet.

3.3.3 In verschiedenen Diagnosegruppengruppen

Im folgenden Unterkapitel sind Abbildungen im Sinne von Abb. 13 dargestellt. Allerdings sind die folgenden Abbildungen auf die jeweiligen Diagnosegruppe gerechnet und zeigen somit eine Kreuzansprechen innerhalb einer Diagnosegruppe. Teilweise ist die Anzahl an Tests pro AGA und Ig-Klasse sehr gering, sodass von einer Grenzwertbestimmung im Sinne einer Standardabweichung abgesehen wurde, um das schon spezifische Bild nicht

weiter einzuschränken. Darunter befinden jeweils sich die Abbildungen zur Diagnosegruppe bezogen auf die Gesamtzahl an Tests pro AGA und Ig-Klasse der gesamten Stichprobe.

Guillain-Barré-Syndrom:

Innerhalb der Diagnosegruppe GBS zeigten folgende AGA ein Kreuzansprechen von 100%: Der GD2 IgM AGA mit dem GM2 AGA (1/1), der GD3 IgM AGA mit dem GM1 AGA (1/1), dem GT1a AGA (1/1) und dem GQ1b AGA (1/1), der GT1a IgG AGA mit dem GT1b AGA (1/1), der GT1a IgM AGA mit dem GM1 AGA (1/1), dem GD3 AGA (1/1) und dem GQ1b AGA (1/1), der GT1b IgM AGA mit dem GM1 AGA (1/1) und der GQ1b IgM AGA mit dem GM1 AGA (1/1), dem GD3 AGA (1/1) und dem GT1a AGA (1/1).

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b		
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
GM1	X								50,0% 1		25,0% 1	50,0% 1				100,0% 1		100,0% 1		100,0% 1		100,0% 1	
GM2			X										100,0% 1										
GM3					X																		
GM4							X																
GD1a	25,0% 1								X		25,0% 1												
GD1b	25,0% 1	16,7% 1							50,0% 1		X												
GD2				50,0% 1									X										
GD3		16,7% 1													X			100,0% 1				100,0% 1	
GT1a		16,7% 1														100,0% 1		X		50,0% 1		100,0% 1	
GT1b		16,7% 1															100,0% 1		X				
GQ1b		16,7% 1														100,0% 1		100,0% 1				X	
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	4	6	1	2	1	0	0	0	2	0	4	2	0	1	0	1	1	1	1	2	1	0	1

Abbildung 16: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Guillain-Barré-Syndrom (GBS): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der Diagnosegruppe GBS. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

Beim GD3 IgM AGA erreicht die GBS Diagnosegruppe 25% aller Kreuzansprechen mit dem GM1 AGA (1/4), dem GT1a AGA (1/4) und dem GQ1b AGA (1/4).

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
GM1	X								5,0% 1		12,5% 1	7,1% 1				25,0% 1		6,7% 1		14,3% 1		11,1% 1
GM2			X											16,7% 1								
GM3					X																	
GM4							X															
GD1a	5,6% 1								X		12,5% 1											
GD1b	5,6% 1	2,2% 1							5,0% 1		X											
GD2				5,6% 1									X									
GD3		2,2% 1													X			6,7% 1				11,1% 1
GT1a		2,2% 1														25,0% 1		X		14,3% 1		11,1% 1
GT1b		2,2% 1															5,0% 1		X			
GQ1b		2,2% 1														25,0% 1			6,7% 1			X
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9

Abbildung 17: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Guillain-Barré-Syndrom (GBS): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der gesamten Stichprobe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

Miller Fisher Syndrom:

100%ige Kreuzansprechensraten wurden innerhalb der Diagnosegruppe MFS bei GD1b IgG AGA Tests mit GD1a (1/1), GD2 (1/1), GT1a(1/1) und GT1b (1/1), bei dem GD1b IgM AGA mit dem GM1 AGA (1/1), dem GT1a AGA (1/1) und dem GQ1b AGA (1/1), bei dem GD2 IgG AGA mit dem GD1a AGA (1/1), dem GD1b AGA (1/1), dem GT1a AGA (1/1) und dem GT1b AGA (1/1), bei dem GT1a IgM AGA mit dem GQ1b AGA (3/3), bei dem GT1b IgG AGA mit dem GD1a AGA (2/2)

und dem GT1a AGA (2/2) und bei dem GQ1b AGA mit dem GT1a AGA (3/3) ermittelt.

Die GQ1b und GT1a IgG AGA erreichen jeweils miteinander 82% (9/11) Kreuzansprechen. Der GD3 IgG AGA zeigt mit dem GT1a und GQ1b AGA jeweils 75% (3/4) Kreuzansprechen. Ein Kreuzansprechen von 67% zeigt der GM1 IgM AGA mit dem GT1a (2/3) und dem GQ1b AGA (2/3), der GD1a IgG AGA mit dem GT1a (2/3) und dem GT1b AGA (2/3) sowie der GT1a und der GQ1b IgM AGA jeweils mit dem GM1 AGA (2/2).

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b		
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	
GM1											100%	1						67%	2			67%	2
GM2																							
GM3																							
GM4																							
GD1a										100%	1	100%	1					18%	2	100%	2		
GD1b		33%							33%	1	100%	1	100%					9%	1	33%	1	50%	1
GD2									33%	1	100%	1						9%	1	50%	1		
GD3																		27%	1				27%
GT1a		67%							67%	2	100%	1	100%	1	75%	3				100%	2	82%	9
GT1b									67%	2	100%	1	100%	1				18%	2				
GQ1b		67%									100%	1			75%	3		82%	9	100%	3		
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	1	1	1	0	4	0	11	3	2	0	11	3	

Abbildung 18: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Miller-Fisher-Syndrom (MFS): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumentests pro Gangliosid und Antikörperklasse der Diagnosegruppe MFS . Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

In Bezug auf die gesamte Stichprobe erreichen die Tests der MFS Diagnosegruppe insgesamt 69% des gesamten Kreuzansprechen von GQ1b IgG

AGA Tests mit GT1a (9/13), 50% bei GD2 mit GD1a (2/2), GD1b (2/2), GT1a (2/2) und GT1b (2/2) sowie 45% bei GT1a IgG mit GQ1b.

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
GM1											7%	1					13%	2			22%	2
GM2																						
GM3																						
GM4																						
GD1a										13%	1	50%	1				10%	2	29%	2		
GD1b	2%	1						5%	1				50%	1			5%	1	7%	1	14%	1
GD2								5%	1	13%	1						5%	1	14%	1		11%
GD3																	15%	3				23%
GT1a	4%	2						10%	2	13%	1	7%	1	50%	1	30%	3			29%	2	69%
GT1b								10%	2	13%	1	50%	1				10%	2				33%
GQ1b	4%	2									7%	1			30%	3	45%	9	20%	3		
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9

Abbildung 19: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Miller-Fisher-Syndrom (MFS): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumentests pro Gangliosid und Antikörperklasse der gesamten Stichprobe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

Multifokale motorische Neuropathie:

Innerhalb der Diagnosegruppe *MMN* zeigten mehrere AGA ein Kreuzansprechen von 100%: Der GM1 IgG AGA mit dem GD1b AGA (1/1), der GM3 IgG AGA mit dem GM1 (1/1), dem GM2 (1/1) und dem GM4 AGA (1/1), der GM4 IgG AGA mit dem GM1 (1/1), dem GM2 (1/1) und dem GM3 AGA (1/1) und der GD1b IgG AGA mit dem GM1 AGA (1/1) sowie der GT1a IgM AGA mit dem GQ1b AGA (1/1).

66,7% Kreuzansprechen erreichte der GM2 IgM AGA mit dem GM1 AGA (2/3) und 50% der GQ1b IgM AGA mit dem GM1 (1/2) und GT1a (1/2) AGA.

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b			
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM		
GM1			66,7%	2	100%	1	100%	1			100%	1										50,0%	1	
GM2	33,3%	2			100%	1	100%	1																
GM3	16,7%	1	33,3%	1			100%	1																
GM4	16,7%	1	33,3%	1	100%	1																		
GD1a																								
GD1b	100%	1																						
GD2																								
GD3																								
GT1a																							50,0%	1
GT1b																								
GQ1b	16,7%	1																100%	1					
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	1	6	0	3	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	

Abbildung 20: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Multifokale motorische Neuropathie (MMN): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der Diagnosegruppe MMN. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

Mit der gesamten Stichprobe verglichen erreicht die Diagnosegruppe *MMN* beim GM4 IgM lediglich 25% aller Kreuzansprechen für die GM1, GM2 und GM3 AGA (je 1/4) und nur 20% beim GM3 IgM AGA mit dem GM1, dem GM2 und GM4 AGA (je 1/5).

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b			
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM		
GM1			11%	2	20%	1	25%	1			13%	1										11%	1	
GM2	4%	2			20%	1	25%	1																
GM3	2%	1	6%	1			25%	1																
GM4	2%	1	6%	1	20%	1																		
GD1a																								
GD1b	6%	1																						
GD2																								
GD3																								
GT1a																							11%	1
GT1b																								
GQ1b	2%	1																7%	1					
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9		

Abbildung 21: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Multifokale motorische Neuropathie (MMN): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der gesamten Stichprobe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie:

In der Diagnosegruppe der *CIDP* konnte ein Kreuzansprechen von 100% für den GM3 IgM AGA mit dem GM4 AGA (1/1), für den GD1a IgM AGA mit dem GM1 (1/1) und dem GT1b AGA (1/1), für den GD1b IgG AGA mit dem GM1 AGA (1/1) und dem GD2 AGA (1/1), für den GD1b IgM AGA mit dem GM1 AGA (2/2), für den GD2 IgG AGA mit dem GM1 (1/1) und den GD1b AGA (1/1), für den GD3 IgM AgA mit dem GM4 AGA (1/1) und für den GT1a IgM AGA mit GT1b AGA (1/1) gezeigt werden.

50%iges Kreuzansprechen zeigte der GM4 IgM AGA mit dem GM3 AGA (1/2) und dem GD3 AGA (1/2) sowie GT1b IgM mit dem GM1 AGA (1/2), dem GD1a AGA (1/2) und dem GT1a AGA (1/2).

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
GM1									100%	100%	100%	100%								50,0%		
GM2																						
GM3							50,0%															
GM4						100%									100%							
GD1a		14,3%																			50,0%	
GD1b	33,3%	28,6%											100%									
GD2	33,3%									100%												
GD3							50,0%															
GT1a																					50,0%	
GT1b		14,3%								100%									100%			
GQ1b																						
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	3	7	0	0	0	1	0	2	1	1	1	2	1	1	0	1	0	1	0	2	0	0

Abbildung 22: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der Diagnosegruppe CIDP . Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

Bei dem GD1a IgM AGA erreicht die Diagnosegruppe CIDP 100% Kreuzansprechen mit dem GM1 AGA (1/1) und mit dem GT1b AGA (1/1) in der gesamten Stichprobe. Weiterhin erreicht sie 50% Kreuzansprechen der gesamten Stichprobe für den GD2 IgG AGA mit dem GM1 AGA sowie dem GD1b AGA.

AGA	GM1		GM2		GM3		GM4		GD1a		GD1b		GD2		GD3		GT1a		GT1b		GQ1b	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
GM1									100%	13%	14%	50%								14%		
GM2									1	1	2	1								1		
GM3							25%															
GM4						20%									25%							
GD1a		2,2%																			14%	
GD1b		1	5,6%	4,3%																	1	
GD2		1	5,6%								13%		50%									
GD3							25%				1											
GT1a																					14%	
GT1b		2,2%																		7%		
GQ1b		1																				
Positive Tests pro AGA und Ig-Klasse	18	46	2	18	5	5	10	4	20	1	8	14	2	6	10	4	20	15	7	7	13	9

Abbildung 23: Kreuzansprechen der 11 getesteten AGA untereinander im Serum innerhalb der Diagnosegruppe Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP): Auf der oberen X-Achse befinden die 11 getesteten Ganglioside jeweils unterteilt in IgG- und IgM-Tests. Auf der Y-Achse befinden sich die entsprechenden Ganglioside und auf der unteren X-Achse befindet sich die absolute Zahl an Serumtests pro Gangliosid und Antikörperklasse der gesamten Stichprobe. Die Ergebnisse sind farbskaliert. Helle nicht-ausgefüllte Felder entsprechen einem negativen Ergebnis. Je roter ein Feld ist, desto höher ist die prozentuale Positivrate.

4 Diskussion

4.1 Übersicht

In dieser retrospektiven 10-jährigen Studie wurden Daten zu AGA von 3560 Tests von 1342 Patientinnen und Patienten in Blutserum und Liquor hinsichtlich ihrer allgemeinen Positivität, ihrer Positivität bezogen auf die Probenart sowie in Bezug auf 14 Erkrankungsgruppen untersucht. Anschließend wurde das Kreuzansprechen der AGA untereinander untersucht. Die Erhebung der Daten erfolgte im regulären Betrieb der Universitätsklinik Tübingen, weswegen von einer großen Nähe zur klinischen Realität ausgegangen werden kann. Zusammengefasst bestehen folgende Hauptergebnisse:

- Die Gesamtpositivrate der AGA war sowohl bei Patientinnen und Patienten mit neurologischen und nicht-neurologischen Erkrankungen niedrig. 4 neurologische Erkrankungsgruppen ließen sich allerdings mit hohen Positivraten verschiedener AGA assoziieren: AMAN, MFS, MMN und CIDP. Zu der weiteren Bestätigung dieser Assoziationen sowie der Bestimmung der jeweiligen Spezifität und Sensitivität bedarf es Folgestudien.
- Die Positivrate der Liquorproben lag <1% und somit noch bedeutend unter der der Serumproben (5,8%). Außerdem gab es zu jedem positiven Liquortest einen positiven Serumtest. Somit ist die Verwendungsbeziehungsweise die Gewinnung von Liquorproben im Risiko-Nutzen-Verhältnis im Vergleich zu Serumblutproben deutlich schlechter und somit am ehesten als obsolet einzustufen.
- Die höchsten Positivraten des Kreuzansprechens bei beiden Ig-Typen haben insbesondere 2 AGA involviert: GM1 (GM1–GD1b und GM1–GT1b) und GT1a (GT1a–GD1a und GT1a–GQ1b). Dies könnte aufgrund ihrer

strukturellen Ähnlichkeit mit den jeweiligen AGA, mit denen sie reagiert haben, auf eine biochemische Verbindung hinweisen.

In der folgenden Diskussion wird insbesondere auf die Fragen aus der Zielsetzung eingegangen (siehe 1.3).

4.2 Niedrige Gesamtpositivitäten

Die Gesamtpositivrate für alle Tests unabhängig von Diagnosegruppe oder Probenart war mit 4,4% sehr gering. Diese Studie ist in ihrem Design die erste, die 14 Diagnosegruppen umfasst, im alltäglichen klinischen Arbeiten durchgeführt wurde, einen Line-Dot-Test verwendet und über 10 Jahre eine so große Zahl von Patienten miteinbezogen hat. Vorherige Studien zu AGA sind in der Regel auf einige wenige Diagnosen beschränkt (Cats et al., 2010; Chiba et al., 1993; Ivanova & Zakharova, 2017; Lleixà et al., 2021; Naik et al., 2017; Simone et al., 1993; Stevens et al., 1992, 1993). Zusätzlich wurde bei diesen Studien erst eine klinische Diagnose gestellt und dann eine AGA-Testung vorgenommen, während in dieser Studie bereits auf klinischen Verdacht und als Screening eine Testung erfolgte. Aufgrund des retrospektiven Designs dieser Studie ließen sich die genauen Indikationen, die die behandelnden Ärztinnen und Ärzte zum Zeitpunkt der Probenentnahme stellten, nicht im Einzelnen nachvollziehen. Die Betrachtung der Daten und medizinischen Dokumentation legt jedoch nahe, dass die AGA wahrscheinlich nicht selten als ein Screeningtest durchgeführt wurde. Die Testung wurde häufig zu Beginn der Symptomatik vorgenommen, als die Symptomatik noch möglicherweise unspezifisch war.

Ein weiterer großer Unterschied zu vorherigen Studien ist die Verwendung von einem Line-Dot-Tests, während die große Mehrzahl in früheren Studien eine ELISA-Testung durchgeführt hat. Aufgrund dieses Umstandes besteht der Großteil der im Folgenden aufgeführten Literaturvergleiche aus Studien, in denen mit ELISA-Verfahren getestet wurde.

Bei der ELISA-Testung von Lleixà *et al.*, 2021 wurden 100 Patientinnen und Patienten mit GBS, aufgeteilt in die Subtypen wie AMAN und MFS mit 90 Patientinnen und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen und einer gesunden Vergleichsgruppe verglichen. Mit 27% Positivität für GM1 IgG AGA bei GBS inklusive aller Subtypen lag der Wert bei Lleixà *et al.* deutlich höher als derjenige, der in dieser Studie gemessen wurde und bei 5,2% für GM1 IgG lag. Selbst bei Miteinbezug der Gruppen AMAN und MFS in der hier präsentierten Studie bleibt der Wert mit 5,1% in einem ähnlichen Bereich. Lleixà *et al.* berichtet bei GD1b und GQ1b IgG AGA außerdem von Positivitäten von 30% und 21%, welche auch bei Zusammenfassung der GBS-, AMAN- und MFS-Gruppen in dieser Studie mit 5,1% für GD1b IgG und 11% für GQ1b IgG nicht erreicht werden. Zusätzlich wird die Positivität für GQ1b IgG AGA in der Subgruppe MFS von Lleixà *et al.* mit 80% angegeben, welche in dieser Studie mit 57,9% ebenfalls nicht erreicht wird. Die Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen AGA in den verschiedenen Gruppen zwischen dieser Studie und der von Lleixà *et al.* lassen sich nicht in Gänze bestimmen. Ein möglicher Grund ist die unterschiedliche prozentuale Zusammensetzung der GBS-Gruppen aus den Subtypen. Dies allein würde allerdings nicht die Diskrepanz zwischen den MFS-Gruppen erklären. Ein weiterer möglicher Grund sind die verschiedenen Testverfahren mit ELISA auf der einen Seite und dem Line Dot Verfahren auf der anderen Seite. Ebenso könnte der Zeitpunkt der Abnahme eine Rolle gespielt sowie die regionalen Unterschiede der Subtypen beziehungsweise der Erreger, die ein *molecular mimicry* herbeigeführt haben könnten. Weitere Studien werden benötigt, um die genauen Gründe der Diskrepanzen zu eruieren und weitere Schlüsse hinsichtlich der Anwendbarkeit der Testverfahren für verschiedene Patientenkollektive zu ziehen. Dennoch stimmen die Ergebnisse der Studie mit den Empfehlungen der European Academy of Neurology (Van Doorn *et al.*, 2023) überein, die nicht dazu rät, Patienten mit Verdacht auf GBS auf AGA zu testen. Ebenfalls sollte auf GQ1b AGA getestet werden, wenn die Verdachtsdiagnose MFS im Raum steht. Zusätzlich dazu könnte eine Testung von anti-GD3 IgG, anti-GD1a IgG, anti-GM1 IgM und anti-GT1a IgG/IgM dazu beitragen, ein AGA-Profil für MFS zu erhalten.

Das MFS ist mit hoher GQ1b AGA Positivität assoziiert. Neben Lleixà et al. (s.o.) haben Ito *et al.*, 2008 ebenfalls eine hohe Positivität von 83% für GQ1b IgG AGA bei 466 MFS Patientinnen und Patienten mittels ELISA ermitteln können. Wie oben erwähnt, lag bei der hier vorgestellten Untersuchung die Positivität bei 57,9%. Auch hier kann Teil der Erklärung für den Unterschied der Werte wieder das unterschiedliche Testverfahren sein oder auch eine unterschiedliche Verteilung der Serotypen des MFS. Vor diesem Hintergrund schlugen Shahrizaila and Yuki, 2013 die Definition des „Anti-GQ1b antibody syndrome“ vor. Dieses Syndrom schließt sowohl MFS als auch Bickerstaff-Enzephalitis Erkrankungen mit ein, die sich ein immunologisches AGA-Profil teilen. Dieses ist durch die Präsenz von GQ1b AGA definiert und würde zu einer Gruppierung der Erkrankungen durch sowohl Symptomatik als auch Antikörpertestung führen. Die hier gezeigte Studie zeigt, dass eine Testung mittels Line Dot in der Routinediagnostik dafür eingesetzt werden könnte. Um Sensitivität und Spezifität der Testung sowie den klinischen Nutzen einer neuen Unterteilung in Hinblick auf bessere Diagnostik oder Behandlungsmethoden abschätzen zu können, bedarf es allerdings weiterer intensiver Forschung.

GQ1b-AGA-positive Tests sind häufig ebenfalls für GT1a-AGA-Tests positiv (Chiba et al., 1992, 1993; Yuki et al., 1993). In dieser Studie betrug die Positivität für sowohl GQ1b-AGA IgG als auch für GT1a-AGA IgG jeweils 57,9%. Bei GQ1b-AGA IgM und GT1a-AGA IgM betrug sie jeweils 15,8%. Eine mögliche Erklärung sind die ähnlichen Strukturen beider Ganglioside.

Weiterhin wurden Assoziationen von positiven GD3, GD1b und GT1b AGA Patientinnen und Patienten mit MFS in früheren Studien beobachtet (Nagashima et al., 2004; Willison, 2001; Willison & O’Hanlon, 1999). In dieser Studie wurden erhöhte Positivitäten für GD3 IgG AGA (21,1%) beobachtet, für GD1b und GT1b waren die Werte jedoch nicht über der Grenze. Stattdessen wurden erhöhte Positivitäten von GM1 IgM und GD1a IgG mit jeweils 15,8% beobachtet. Ito *et al.*, 2008 schlugen vor, dass verschiedene MFS-Proben verschiedene AGA-Profile aufweisen könnten, da sich die mikrobiellen Erreger des *molecular mimicry* unterscheiden könnten. Diese Studie könnte Hinweise darauf liefern, jedoch kann sie die Hypothese aufgrund des Studiendesigns, in dem nicht auf mikrobielle

Erreger getestet wurde, nicht verifizieren. Es werden weitere Studien benötigt, die die notwendigen mikrobiologischen und AGA-Testungen durchführen.

Die Assoziation zwischen MMN und einem positiven GM1 IgM AGA im Serum wurden in mehreren Studien gezeigt, die zum Großteil mit ELISA-Testung durchgeführt wurden (Cats et al., 2010; Nobile-Orazio, 2001; Pestronk et al., 1988). Die Positivraten dieser Studien bewegten sich zwischen 43% und 64%. In dieser Studie wurden mittels Line Dot Testung eine Positivität von 33,3% im Serum ermittelt. Die Zahl an Patienten war mit 18 Patientinnen und Patienten relativ gering. Cats *et al.*, 2010 haben 88 Patientinnen und Patienten mit MMN mittels ELISA untersucht und neben der Positivität von 43% für IgM GM1-AGA außerdem eine Positivraten von 6% und 9% für IgM GM2- und GD1b-AGA festgestellt. In der hier präsentierten Studie befinden sich die Werte in einem höherem Bereich für das IgM GM2-AGA mit 16,7% und einem leicht niedrigerem Bereich für das IgM GD1b-AGA mit 5,6%. Diese Diskrepanzen könnten entweder auf die unterschiedliche Größe des Patientenkollektives oder auf die unterschiedlichen Testmethoden zurückzuführen sein. Nichtsdestotrotz konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Line Dot Testung zum AGA-Nachweis in Patientinnen und Patienten mit MMN verwendet werden kann.

Uncini, Notturmo und Capasso, 2013 haben die Vermutung aufgestellt, dass AMAN und MMN die gleiche Pathogenese zugrunde liege, da beide Erkrankungen mit GM2- und GQ1b-AGA assoziiert wurden. Obwohl in dieser Studie die Positivraten bei beiden Erkrankungen sowohl für das IgM GM2- als GQ1b-AGA als relevant positiv betrachtet werden, unterscheiden sich die Werte jedoch deutlich mit 33,3% (AMAN) gegenüber 16,7% (MMN) für den IgM GM2-AGA und 33,3% (AMAN) und 11,1% (MMN) für den IgM GQ1b-AGA. Dies könnte in der geringen Probenzahl der AMAN-Gruppe begründet sein. Dennoch unterstützen diese Ergebnisse die Vermutung von Uncini et al. nicht.

Die Assoziation zwischen AGA und der CIDP bis heute nicht eindeutig. Nobile-Orazio *et al.*, 2008 untersuchten 539 Patientinnen und Patienten, davon 57 mit der Diagnose CIDP, mittels ELISA und fanden Positivraten für IgM GM1-, GM2-, GD1a- und GD1b-AGA von 10,5%, 1,7%, 1,7% und 3,4%. In dieser Studie zeigte der IgM GM1-AGA eine Positivrate von 10% für die Diagnosegruppe CIDP, die

sich damit etwas über dem Grenzwert für IgM von 8,1% befindet. Die Werte für die IgM GM2-, GD1a- und GD1b-AGA sind jeweils in einem sehr ähnlichen Bereich. Möglicherweise ist der in dieser Studie errechnete Grenzwert auch auf die Ergebnisse von Nobile-Orazio et al. anwendbar.

Trotzdem ist die breite diagnostische Anwendung der IgM GM1-AGA-Testung bei Verdacht auf CIDP wahrscheinlich nicht sinnvoll, wenn nur jeder 10. Patient einen positiven Wert zeigt. Dies deckt sich auch mit der Richtlinie der European Academy of Neurology (Van Den Bergh et al., 2021), die keine Routinetestung von AGA bei der CIDP-Diagnostik empfiehlt. Gegebenenfalls könnte eine Testung in besonders diagnostisch anspruchsvollen oder unklaren Fällen sinnvoll sein.

4.3 Anti-Gangliosid-Antikörper im Liquor

Die Ergebnisse dieser Studie hinsichtlich der Testung von AGA im Liquor mittels Line Dot zeigte, dass diese kritisch zu betrachten sind. Zum einen lag die Positivität aller Liquortests lediglich bei 0,43% (n=4/924) und war damit über den Faktor 10 geringer als bei den Serumtests, zum anderen existierte zu allen positiven Tests aus Liquor ein positives Äquivalent in dem dazugehörigen Serumtest.

Der Literaturvergleich gestaltete sich als herausfordernd, da es nur wenige Studien zu der Frage nach AGA-Testung im Liquor gibt und die vorhandenen Studien häufig lediglich Probengrößen unter 100 umfassen.

In einer etwas größeren Studie haben beispielsweise Mata *et al.*, 2006 unter anderem 73 Patienten mit GBS (AIDP und AMAN) auf AGA in Serum und Liquor getestet. Es wurden keine Anzeichen einer intrathekalen Synthese von AGA in den GBS-Patientinnen und -Patienten beobachtet. Dies deckt sich mit den

Ergebnissen der hier präsentierten Studie, in der die Positivität der AGA im Liquor von GBS-Patienten bei 0% lag.

Im Gegensatz dazu berichten Simone *et al.*, 1993 davon, dass in den von ihnen getesteten Liquorproben von 23 Patientinnen und Patienten mit GBS und 10 mit CIDP die GM1 AGA Positivität höher war, als in den dazugehörigen Serumproben. Dies steht in direktem Kontrast zu den hier präsentierten Ergebnissen sowie denen von Mata *et al.*. Sowohl Mata *et al.* als auch Simone *et al.* nutzen eine ELISA-Testung. Somit scheint eine unterschiedliche Testmethode als ausschlaggebender Faktor als unwahrscheinlich. Ein Unterschied ist allerdings der Abnahmezeitpunkt. Während in dieser Studie sowie bei Mata *et al.* die Proben in den Anfangsstadien abgenommen wurden, sind die Proben von Simone *et al.*, die die erhöhten GM1 AGA Spiegel zeigen, zu einem späteren Zeitpunkt abgenommen worden. Die Autoren berichten, dass der höchste Liquor AGA Spiegel ein Monat nach dem Erkrankungsbeginn gemessen wurde, während der höchste Serum AGA Spiegel sein Maximum früher erreicht habe. Simone *et al.* vermuten, dass die Erhöhung des AGA Spiegels nicht durch intrathekale Synthese zustande kommt, sondern Einschwemmung aus dem peripheren Blut. Mata *et al.* vermuteten in ihrem Paper bereits, dass das GBS die Blut-Liquor-Schranke schwächen könnte. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Simone *et al.*. In dieser Studie wurde bestätigt, dass die Line Dot in der Anfangsphase der aller Erkrankungen außer MFS zu keinen relevanten Positivitäten führt. Allerdings könnte die Line Dot Testung analog zu Simone *et al.* in einer späteren Phase der Erkrankungen möglicherweise als Verlaufparameter genutzt werden. Zur weiteren Klärung dieser Fragestellung sind allerdings Folgestudien nötig, die Patienten über die Initialphase der Erkrankung hinaus begleiten und im Verlaufe mehrere Liquor- und Serumproben sammeln.

Bei Betrachtung der Positivitäten der Liquortests in dieser Studie zeigte nur die Diagnosegruppe MFS relevante Ergebnisse. Der IgG GT1a AGA zeigte eine Positivität von 42,9% und die IgG GD1a, GD1b und GT1b AGA zeigten eine Positivität von 14,3%. Im Gegensatz dazu konnten Spatola *et al.*, 2016 eine 20%ige Positivität bei einer Patientengruppe von 10 für GQ1b zeigen. GQ1b

AGA waren in der hier präsentierten Studie im Liquor zu 0% positiv. Auf der einen Seite könnte dies durch ein Kreuzansprechen der Testantikörper verursacht sein, da die Rate des Kreuzansprechens zwischen z.B. GQ1b IgG und GT1a IgG mit 45,5% sehr hoch ist. Auf der anderen Seite könnte es auch in den unterschiedlichen Abnahmezeitpunkten oder an den unterschiedlichen Testmethoden begründet sein. Spatola et al. haben mit ELISA getestet. Gegebenenfalls ist der Line Dot Test, der in dieser Studie verwendet wurde, auch nicht ideal geeignet, um Liquor auf AGA zu testen. Ein spezifischer Line Dot Liquortest ist allerdings nicht bekannt.

4.4 Kreuzansprechen

Das Kreuzansprechen ist ein neues Konzept im Bereich der Forschung über AGA. Es ist eine Betrachtung für die gleichzeitige Positivität mehrerer AGA in einem Test. Es ist eine klinische Bezeichnung, da Kreuzansprechen immer angewendet werden kann, auch wenn nicht klar ist, ob es sich um eine Kreuzreaktion oder eine gleichzeitige Reaktion zweier AGA auf einen Test handelt. Dementsprechend existiert zu diesem definierten Begriff auch noch keine Literatur, obwohl er aus der klinischen Perspektive sehr praktikabel ist.

In dieser Studie zeigte sich Kreuzansprechen in jedem 2. bis 3. Test. Insbesondere bei Betrachtung der höchsten prozentualen Kreuzansprechen fällt auf, dass eine enge Strukturverwandheit zwischen den Gangliosiden besteht, gegen die die AGA gerichtet sind.

71,4% aller GT1b positiven IgM AGA Tests zeigten ebenfalls ein positives Ergebnis für GM1 und somit per definitionem ein Kreuzansprechen. Die beiden Zielganglioside unterscheiden sich lediglich in 2 N-Acetylneuraminsäureresten (Vgl. Abb. 1). Bei GD1b, dessen IgM AGA Test ein Kreuzansprechen mit GM1 IgM von ebenfalls 71,4% zeigt, liegt der Unterschied lediglich in einem N-Acetylneuraminsäurerest (Vgl. Abb. 1). Genauso verhält es sich mit GD1a und

GM1 (IgM: 100%), GD1a und GT1b (IgM:100%) und GQ1b und GT1a (IgG 76,9%; IgM 88,9%).

GD2 und GD1b zeigen ebenfalls ein Kreuzansprechen der AGA von 100%, unterscheiden sich allerdings um 1 Galactosemolekül (Vgl. Abb. 1).

Ein Kreuzansprechen von mehr als 30% wurde nur bei AGA gegen Ganglioside beobachtet, die sich in maximal 2 N-Acetylneuraminsäureresten oder einem Galctosemolekül unterscheiden. AGA gegen Ganglioside mit größeren Strukturunterschieden zeigten keine so hohen Raten des Kreuzansprechens. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die AGA im Sinne einer Kreuzreaktion reagiert haben könnten.

Unklar bleibt allerdings, warum die AGA anderer Ganglioside, die ähnlich nahe strukturverwandt sind, kein Kreuzansprechen zeigen. Außerdem bleibt auch unklar, warum manchmal die IgG- und manchmal die IgM-Klasse ein solches Kreuzansprechen zeigen, sich jedoch kein Muster erkennen lässt. Um diese Fragen zu klären und die Bedeutung hinter dem Kreuzansprechen zu klären, bedarf es weiterer Studien.

4.5 Stärken und Limitationen

Die hier präsentierte Studie und die damit einhergehende Arbeit hat Stärken und Schwächen. Zu den Stärken kann man folgendes zählen: 1. Die Daten wurden über einen langen Zeitraum gesammelt, 2. die Test- und Patientenzahl ist groß, 3. die hierverwendete Testmethode des Line Dots wurde in vorherigen Studien extrem selten verwendet, hat jedoch durch die Möglichkeit der gleichzeitigen Testung mehrerer Antikörper einen praktischen Vorteil zum herkömmlichen ELISA und 4. hat eine intensive Auswertung der AGA und Diagnosegruppen unter verschiedensten Aspekten stattgefunden.

Die Zahl von 3560 Serum- oder Liquortests von 1342 Patienten ist verhältnismäßig groß und bietet einen breiten Einblick in das neurologische Patientenkliment einer großen Universitätsklinik. Zusätzlich hat der Großteil der relevanten, großen AGA Studien das ELISA-Testverfahren verwendet. Eine so diverse Einteilung von Diagnosegruppen in einer derartig großen Studie ist ebenfalls nicht bekannt, da sich die meisten Studien auf ein bis drei Erkrankungen festlegten. Hier wurde ein Blick auf die Anwendung von Line Dots bei einer großen, diversen Patientenzahl geworfen. Zusätzlich haben entsprechend des Studiendesigns die behandelnden Ärzte in der jeweiligen individuellen Situation entscheiden können, ob sie eine Testung vornehmen. Dies ist sehr nah an jeder klinischen Realität und kann sowohl der Forschung als auch den Klinikern neue, reale Einblicke hinsichtlich der Anwendung von Line Dot Tests im medizinischen Alltag geben.

Das Studiendesign birgt ebenfalls alle Limitationen, die mit einer retrospektiven Studie verbunden sind. Die Hauptlimitation war die beschränkte Dokumentation des weiteren Krankheitsverlaufes und anderer Informationen, die eine Miteinbeziehung zusätzlicher Aspekte in die Analyse ermöglichen hätte können.

Weiterhin variierten die Diagnosegruppen in ihrer Größe. Sowohl die unterschiedlichen Größen als auch die zum Teil kleinen absoluten Gruppengrößen schränken die Aussagekraft mancher Teilergebnisse ein. Eine Angleichung der Gruppengrößen wäre allerdings mit einer großen Umstellung des Studiendesigns verbunden gewesen. Dies hätte andere Teilergebnisse, die einen größeren Erkenntnisgewinn erbracht haben, allerdings nicht verwertbar gemacht, weswegen diese Veränderungen von Anfang an abgelehnt wurden.

4.6 Conclusio

Bei Betrachtung der alltäglichen Versorgung an einer großen Klinik wurden die Serum Line Dot Tests bedeutend häufiger durchgeführt als Liquor Line Dot Tests.

Die Serumtests wiesen eine 10fach höhere Positivrate auf, waren für die meisten Diagnosegruppen wie GBS jedoch nicht relevant positiv genug. Für AMAN, MFS, MMN und CIDP zeigten sich relevante Positivraten, die zu einer verbesserten Diagnostik beitragen könnten. Liquortests sind höchstwahrscheinlich obsolet, da sie in keinem Fall einen diagnostischen Mehrwert gegenüber den entsprechenden Serumtests zeigen konnten und mit einem deutlich erhöhten Risiko bei der Probengewinnung verbunden sind.

Ein Kreuzansprechen trat bei ungefähr 40% aller Serumtests auf. Es zeigten sich Häufungen von AGA gegen strukturverwandte Ganglioside. Aufgrund des Studiendesigns ist allerdings nur eine Beschreibung und keine Differenzierung zwischen möglichen Kreuzreaktivitäten und gleichzeitigen Positivwerten möglich. Um in diese Differenzierung durchzuführen und die daraus folgenden Schlüsse zur Einschätzung der hier präsentierten Daten zu ziehen, sind weitere Studien dringend notwendig.

5 Zusammenfassung

Anti-Gangliosid-Antikörper (AGA) wurden in der Vergangenheit mit der Ätiopathogenese von verschiedenen neurologischen Erkrankungen, unter anderem dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) und dem Miller-Fisher-Syndrom (MFS), in Verbindung gebracht. Große Studien, die nahe an der klinischen Realität designt wurden und ein Line Dot Testverfahren verwenden, gibt es jedoch nicht. Außerdem wurden Kreuzansprechen (die gleichzeitige Positivität mehrerer AGA in einem Test) bisher ebenfalls nur oberflächlich untersucht.

In der hier präsentierten Arbeit wurden 3560 Immunglobulin(Ig) G- und M-Tests von Liquor- und/oder Serumproben von 1342 Patientinnen und Patienten aus 10 Jahren untersucht. Diese Tests wurden mit dem Generic Assays Anti-Ganglioside Dot Kit getestet und anschließend retrospektiv auf ihre AGA-Positivität in 14 Diagnosegruppen und auf ihr Kreuzansprechen analysiert.

Von 3560 Test erreichten die Serumtests eine Positivität von 5,8% (158/2636) und die Liquortests 0,4% (4/924).

Für IgG Serumtests zeigten MFS (GD3, GD1a, GT1a und GQ1b) und die akute motorische axonale Neuropathie (AMAN) (GM1, GD1a und GT1a) eine Positivrate über 15,6%, die der Standardabweichung entspricht. Für IgM Serumtests konnten Positivraten von über der Standardabweichung von 8,1 % für AMAN (GM2, GT1a und GQ1b), MFS (GM1, GT1a und GQ1b), die multifokale motorische Neuropathie (MMN) (GM1, GM2 und GQ1b) und die chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) (GM1) gezeigt werden. Ein Kreuzansprechen wurde bei 39,6% aller positiven Serumtests gezeigt.

Zusammenfassend führt die Testung von AGA im klinischen Alltag selten zu positiven Ergebnissen. Im Serum ist die Positivrate bereits niedrig und im Liquor noch geringer. Lediglich die Diagnosegruppen AMAN, MFS, MMN und CIDP konnten höhere relevante Positivraten erreichen.

Ein Kreuzansprechen fand häufig statt, jedoch sind die Daten zu unspezifisch, um direkte Schlüsse daraus ziehen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- Carter, H. E., Glick, F. J., Norris, W. P., & Phillips, G. E. (1947). BIOCHEMISTRY OF THE SPHINGOLIPIDES. *Journal of Biological Chemistry*, 170(1), 285–294.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)34955-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)34955-4)
- Cats, E. A., Jacobs, B. C., Yuki, N., Tio-Gillen, A. P., Piepers, S., Franssen, H., van Asseldonk, J.-T., van den Berg, L. H., & van der Pol, W.-L. (2010). Multifocal motor neuropathy: Association of anti-GM1 IgM antibodies with clinical features. *Neurology*, 75(22), 1961–1967.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ff94c2>
- Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R. J., & Schnaar, R. L. (2000). A Functional Role for Complex Gangliosides: Motor Deficits in GM2/GD2 Synthase Knockout Mice. *Experimental Neurology*, 166(2), 227–234.
<https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7504>
- Chiba, A., Kusunoki, S., Obata, H., Machinami, R., & Kanazawa, I. (1993). Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre syndrome: Clinical and immunohistochemical studies. *Neurology*, 43(10), 1911–1911.
<https://doi.org/10.1212/WNL.43.10.1911>
- Chiba, A., Kusunoki, S., Shimizu, T., & Kanazawa, I. (1992). Serum IgG antibody to ganglioside GQ1b is a possible marker of Miller Fisher syndrome. *Annals of Neurology*, 31(6), 677–679. <https://doi.org/10.1002/ana.410310619>
- Copani, A., Melchiorri, D., Caricasole, A., Martini, F., Sale, P., Carnevale, R., Gradini, R., Sortino, M. A., Lenti, L., De Maria, R., & Nicoletti, F. (2002). β -Amyloid-Induced Synthesis of the Ganglioside Gd3 Is a Requisite for Cell Cycle Reactivation and Apoptosis in Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 22(10), 3963–3968.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-10-03963.2002>
- Cuttillo, G., Saariaho, A.-H., & Meri, S. (2020). Physiology of gangliosides and the role of antiganglioside antibodies in human diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(4), 313–322. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0388-9>
- De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomassini, B., Zeuner, A., Rippo, M. R., & Testi, R. (1997). Requirement for GD3 Ganglioside in CD95- and Ceramide-Induced Apoptosis. *Science*, 277(5332), 1652–1655.
<https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1652>
- Desplats, P. A., Denny, C. A., Kass, K. E., Gilmartin, T., Head, S. R., Sutcliffe, J. G., Seyfried, T. N., & Thomas, E. A. (2007). Glycolipid and ganglioside metabolism imbalances in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 27(3), 265–277.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.05.003>
- Finsterer, J. (2022). Triggers of Guillain–Barré Syndrome: *Campylobacter jejuni* Predominates. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14222.
<https://doi.org/10.3390/ijms232214222>
- Fluhrer, R., Hampe, W., Averbek, B., Dankwardt, A., Duszenko, M., Kindler, S., Kreienkamp, H.-J., Kouz, K., Unterleitner, C., & Wild-Bode, C. (2023). *Biochemie und Molekularbiologie hoch2* (2. Auflage) S. 182-183. Elsevier.

- Gaspari, E., Koehorst, J. J., Frey, J., Martins Dos Santos, V. A. P., & Suarez-Diez, M. (2021). Galactocerebroside biosynthesis pathways of *Mycoplasma* species: An antigen triggering Guillain–Barré–Stohl syndrome. *Microbial Biotechnology*, *14*(3), 1201–1211. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13794>
- Giesche, N., Böhm-Gonzalez, S. T., Kleiser, B., Kowarik, M. C., Dubois, E., Stransky, E., Armbruster, M., Grimm, A., & Marquetand, J. (2024). Antiganglioside antibody frequency in routine clinical care settings. *European Journal of Neurology*, e16290. <https://doi.org/10.1111/ene.16290>
- Gottschalk, A. (1955). Structural Relationship between Sialic Acid, Neuraminic Acid and 2-Carboxy-Pyrrole. *Nature*, *176*(4488), 881–882. <https://doi.org/10.1038/176881a0>
- Huebecker, M., Moloney, E. B., Van Der Spoel, A. C., Priestman, D. A., Isacson, O., Hallett, P. J., & Platt, F. M. (2019). Reduced sphingolipid hydrolase activities, substrate accumulation and ganglioside decline in Parkinson’s disease. *Molecular Neurodegeneration*, *14*(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0339-z>
- Hwang, J., Lee, S., Lee, J. T., Kwon, T. K., Kim, D. R., Kim, H., Park, H., & Suk, K. (2010). Gangliosides induce autophagic cell death in astrocytes. *British Journal of Pharmacology*, *159*(3), 586–603. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00563.x>
- Ito, M., Kuwabara, S., Odaka, M., Misawa, S., Koga, M., Hirata, K., & Yuki*, N. (2008). Bickerstaff’s brainstem encephalitis and Fisher syndrome form a continuous spectrum: Clinical analysis of 581 cases. *Journal of Neurology*, *255*(5), 674–682. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-0775-0>
- Ivanova, M. V., & Zakharova, M. N. (2017). Antibodies against Myelin Lipids in Multiple Sclerosis. *Human Physiology*, *43*(8), 875–880. <https://doi.org/10.1134/S0362119717080023>
- Kabayama, K., Sato, T., Saito, K., Loberto, N., Prinetti, A., Sonnino, S., Kinjo, M., Igarashi, Y., & Inokuchi, J. (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(34), 13678–13683. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703650104>
- Kappagantula, S., Andrews, M. R., Cheah, M., Abad-Rodriguez, J., Dotti, C. G., & Fawcett, J. W. (2014). Neu3 Sialidase-Mediated Ganglioside Conversion Is Necessary for Axon Regeneration and Is Blocked in CNS Axons. *The Journal of Neuroscience*, *34*(7), 2477–2492. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4432-13.2014>
- Kasai, N., Pachner, A. R., & Yu, R. K. (1986). Anti-glycolipid antibodies and their immune complexes in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, *75*(1), 33–42. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(86\)90048-1](https://doi.org/10.1016/0022-510X(86)90048-1)
- Klenk, E. (1935). Über die Natur der Phosphatide und anderer Lipoide des Gehirns und der Leber bei der Niemann-Pickschen Krankheit. [12. Mitteilung über Phosphatide.]. *Hoppe-Seyler’s Zeitschrift Für Physiologische Chemie*, *235*(1–2), 24–36. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1935.235.1-2.24>

- Kuhn, R., & Wiegandt, H. (1963). Die Konstitution der Ganglio-N-tetraose und des Gangliosids G₁. *Chemische Berichte*, *96*(3), 866–880.
<https://doi.org/10.1002/cber.19630960329>
- Ledeer, R. W., & Wu, G. (2015). The multi-tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(7), 407–418.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.04.005>
- Lleixà, C., Martín-Aguilar, L., Pascual-Goñi, E., Franco, T., Caballero, M., De Luna, N., Gallardo, E., Suárez-Calvet, X., Martínez-Martínez, L., Diaz-Manera, J., Rojas-García, R., Cortés-Vicente, E., Turón, J., Casanovas, C., Homedes, C., Gutiérrez-Gutiérrez, G., Jimeno-Montero, M. C., Berciano, J., Sedano-Tous, M. J., ... Querol, L. (2021). Autoantibody screening in Guillain–Barré syndrome. *Journal of Neuroinflammation*, *18*(1), 251. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02301-0>
- Lunghi, G., Fazzari, M., Di Biase, E., Mauri, L., Chiricozzi, E., & Sonnino, S. (2021). The structure of gangliosides hides a code for determining neuronal functions. *FEBS Open Bio*, *2211-5463*.13197. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13197>
- Malik, A., Brudvig, J. M., Gadsden, B. J., Ethridge, A. D., & Mansfield, L. S. (2022). *Campylobacter jejuni* induces autoimmune peripheral neuropathy via Sialoadhesin and Interleukin-4 axes. *Gut Microbes*, *14*(1), 2064706.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2064706>
- Mata, S., Galli, E., Amantini, A., Pinto, F., Sorbi, S., & Lolli, F. (2006). Anti-ganglioside antibodies and elevated CSF IgG levels in Guillain-Barre syndrome. *European Journal of Neurology*, *13*(2), 153–160. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01161.x>
- Matarrese, P., Garofalo, T., Manganelli, V., Gambardella, L., Marconi, M., Grasso, M., Tinari, A., Misasi, R., Malorni, W., & Sorice, M. (2014). Evidence for the involvement of GD3 ganglioside in autophagosome formation and maturation. *Autophagy*, *10*(5), 750–765. <https://doi.org/10.4161/auto.27959>
- Mehta, N. R., Nguyen, T., Bullen, J. W., Griffin, J. W., & Schnaar, R. L. (2010). Myelin-Associated Glycoprotein (MAG) Protects Neurons from Acute Toxicity Using a Ganglioside-Dependent Mechanism. *ACS Chemical Neuroscience*, *1*(3), 215–222. <https://doi.org/10.1021/cn900029p>
- Möbius, W., Herzog, V., Sandhoff, K., & Schwarzmann, G. (1999). Intracellular Distribution of a Biotin-labeled Ganglioside, GM1, by Immunoelectron Microscopy After Endocytosis in Fibroblasts. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *47*(8), 1005–1014.
<https://doi.org/10.1177/002215549904700804>
- Mocchetti, I. (2005). Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*(19–20), 2283–2294.
<https://doi.org/10.1007/s00018-005-5188-y>
- Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., & Fujiki, N. (1995). Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(11), 5087–5091.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.5087>

- Nagashima, T., Koga, M., Odaka, M., Hirata, K., & Yuki, N. (2004). Clinical correlates of serum anti-GT1a IgG antibodies. *Journal of the Neurological Sciences*, *219*(1–2), 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2004.01.005>
- Naik, Gs., Meena, Ak., Reddy, Ba. K., Mridula, R., Jabeen, S., & Borgohain, R. (2017). Anti-ganglioside antibodies profile in Guillain-Barré syndrome: Correlation with clinical features, electrophysiological pattern, and outcome. *Neurology India*, *65*(5), 1001. https://doi.org/10.4103/neuroindia.NI_1226_15
- Nobile-Orazio, E. (2001). Multifocal motor neuropathy. *Journal of Neuroimmunology*, *115*(1–2), 4–18. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00266-1)
- Nobile-Orazio, E., Gallia, F., Terenghi, F., Allaria, S., Giannotta, C., & Carpo, M. (2008). How useful are anti-neural IgM antibodies in the diagnosis of chronic immune-mediated neuropathies? *Journal of the Neurological Sciences*, *266*(1–2), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.09.020>
- Noioso, C. M., Bevilacqua, L., Acerra, G. M., Della Valle, P., Serio, M., Vinciguerra, C., Piscosquito, G., Toriello, A., Barone, P., & Iovino, A. (2023). Miller Fisher syndrome: An updated narrative review. *Frontiers in Neurology*, *14*, 1250774. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1250774>
- Pender, M. P., Csurhes, P. A., Wolfe, N. P., Hooper, K. D., Good, M. F., McCombe, P. A., & Greer, J. M. (2003). Increased circulating T cell reactivity to GM3 and GQ1b gangliosides in primary progressive multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience*, *10*(1), 63–66. [https://doi.org/10.1016/S0967-5868\(02\)00270-9](https://doi.org/10.1016/S0967-5868(02)00270-9)
- Pestronk, A., Cornblath, D. R., Ilyas, A. A., Baba, H., Quarles, R. H., Griffin, J. W., Alderson, K., & Adams, R. N. (1988). A treatable multifocal motor neuropathy with antibodies to GM1 ganglioside. *Annals of Neurology*, *24*(1), 73–78. <https://doi.org/10.1002/ana.410240113>
- Prendergast, M. M., Lastovica, A. J., & Moran, A. P. (1998). Lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* O:41 Strains Associated with Guillain-Barré Syndrome Exhibit Mimicry of GM₁ Ganglioside. *Infection and Immunity*, *66*(8), 3649–3655. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.8.3649-3655.1998>
- Quarles, R. H. (2007). Myelin-associated glycoprotein (MAG): Past, present and beyond. *Journal of Neurochemistry*, *100*(6), 1431–1448. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04319.x>
- Quarles, R. H., Ilyas, A. A., & Willison, H. J. (1986). Antibodies to glycolipids in demyelinating diseases of the human peripheral nervous system. *Chemistry and Physics of Lipids*, *42*(1–3), 235–248. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(86\)90055-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(86)90055-1)
- Rapport, M. M., Donnenfeld, H., Brunner, W., Hungund, B., & Bartfeld, H. (1985). Ganglioside patterns in amyotrophic lateral sclerosis brain regions. *Annals of Neurology*, *18*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1002/ana.410180111>
- Roisin, F. J., Bartfeld, H., Nagele, R., & Yorke, G. (1981). Ganglioside Stimulation of Axonal Sprouting in Vitro. *Science*, *214*(4520), 577–578. <https://doi.org/10.1126/science.7291999>
- Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiach, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M., & d’Azzo, A. (2009). GM1-Ganglioside Accumulation at the Mitochondria-Associated ER Membranes Links ER Stress to Ca²⁺-Dependent Mitochondrial

- Apoptosis. *Molecular Cell*, 36(3), 500–511.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.10.021>
- Sela, B.-A., Konat, G., & Offner, H. (1982). Elevated ganglioside concentration in serum and peripheral blood lymphocytes from multiple sclerosis patients in remission. *Journal of the Neurological Sciences*, 54(1), 143–148.
[https://doi.org/10.1016/0022-510X\(82\)90226-X](https://doi.org/10.1016/0022-510X(82)90226-X)
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), 361–374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
- Shahrizaila, N., & Yuki, N. (2013). Bickerstaff brainstem encephalitis and Fisher syndrome: Anti-GQ1b antibody syndrome. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 84(5), 576–583. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302824>
- Simone, I. L., Annunziata, P., Maimone, D., Liguori, M., Leante, R., & Livrea, P. (1993). Serum and CSF anti-GM1 antibodies in patients with Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Journal of the Neurological Sciences*, 114(1), 49–55. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(93\)90048-4](https://doi.org/10.1016/0022-510X(93)90048-4)
- Sipione, S., Monyror, J., Galleguillos, D., Steinberg, N., & Kadam, V. (2020). Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 572965.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.572965>
- Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V., & Prinetti, A. (2007). Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*, 17(1), 1R-13R.
<https://doi.org/10.1093/glycob/cwl052>
- Spatola, M., Du Pasquier, R., Schlupe, M., & Regeniter, A. (2016). Serum and CSF GQ1b antibodies in isolated ophthalmologic syndromes. *Neurology*, 86(19), 1780–1784. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002558>
- Stevens, A., Weller, M., & Wiethölter, H. (1992). CSF and serum ganglioside antibody patterns in MS. *Acta Neurologica Scandinavica*, 86(5), 485–489.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1992.tb05129.x>
- Stevens, A., Weller, M., & Wietholter, H. (1993). A characteristic ganglioside antibody pattern in the CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 56(4), 361–364.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.56.4.361>
- Svennerholm, L. (1980). Ganglioside Designation. In L. Svennerholm, P. Mandel, H. Dreyfus, & P.-F. Urban (Eds.), *Structure and Function of Gangliosides* (Vol. 125, pp. 11–11). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7844-0_2
- Svennerholm, L., Boström, K., Jungbjer, B., & Olsson, L. (1994). Membrane Lipids of Adult Human Brain: Lipid Composition of Frontal and Temporal Lobe in Subjects of Age 20 to 100 Years. *Journal of Neurochemistry*, 63(5), 1802–1811.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63051802.x>
- Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K., & Aizawa, S. (1996). Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their

- nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10662–10667. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10662>
- Uncini, A., Notturmo, F., & Capasso, M. (2013). *Natura Non Facit Saltus* in Anti-Ganglioside Antibody-Mediated Neuropathies. *Muscle & Nerve*, 48(4), 484–487. <https://doi.org/10.1002/mus.23881>
- Van Den Bergh, P. Y. K., Van Doorn, P. A., Hadden, R. D. M., Avau, B., Vankrunkelsven, P., Allen, J. A., Attarian, S., Blomkwist-Markens, P. H., Cornblath, D. R., Eftimov, F., Goedee, H. S., Harbo, T., Kuwabara, S., Lewis, R. A., Lunn, M. P., Nobile-Orazio, E., Querol, L., Rajabally, Y. A., Sommer, C., & Topaloglu, H. A. (2021). European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society guideline on diagnosis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Report of a joint Task Force—Second revision. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 26(3), 242–268. <https://doi.org/10.1111/jns.12455>
- Van Doorn, P. A., Van Den Bergh, P. Y. K., Hadden, R. D. M., Avau, B., Vankrunkelsven, P., Attarian, S., Blomkwist-Markens, P. H., Cornblath, D. R., Goedee, H. S., Harbo, T., Jacobs, B. C., Kusunoki, S., Lehmann, H. C., Lewis, R. A., Lunn, M. P., Nobile-Orazio, E., Querol, L., Rajabally, Y. A., Umapathi, T., ... Willison, H. J. (2023). European Academy of Neurology/Peripheral Nerve Society Guideline on diagnosis and treatment of GUILLAIN–BARRÉ syndrome. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 28(4), 535–563. <https://doi.org/10.1111/jns.12594>
- Vinson, M., Strijbos, P. J. L. M., Rowles, A., Facci, L., Moore, S. E., Simmons, D. L., & Walsh, F. S. (2001). Myelin-associated Glycoprotein Interacts with Ganglioside GT1b. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20280–20285. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100345200>
- Virgolini, M. J., Feliziani, C., Cambiasso, M. J., Lopez, P. H., & Bollo, M. (2019). Neurite atrophy and apoptosis mediated by PERK signaling after accumulation of GM2-ganglioside. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(2), 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.014>
- Wanleenuwat, P., Iwanowski, P., & Kozubski, W. (2020). Antiganglioside antibodies in neurological diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 408, 116576. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.116576>
- Wei, J., Fujita, M., Nakai, M., Waragai, M., Sekigawa, A., Sugama, S., Takenouchi, T., Masliah, E., & Hashimoto, M. (2009). Protective Role of Endogenous Gangliosides for Lysosomal Pathology in a Cellular Model of Synucleinopathies. *The American Journal of Pathology*, 174(5), 1891–1909. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080680>
- Williams, G., Wood, A., Williams, E.-J., Gao, Y., Mercado, M. L., Katz, A., Joseph-McCarthy, D., Bates, B., Ling, H.-P., Aulabaugh, A., Zaccardi, J., Xie, Y., Pangalos, M. N., Walsh, F. S., & Doherty, P. (2008). Ganglioside Inhibition of Neurite Outgrowth Requires Nogo Receptor Function. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16641–16652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802067200>
- Willison, H. J. (2001). Fine specificity of anti-GQ1b antibodies and clinical features. *Journal of the Neurological Sciences*, 185(1), 1–2. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(01\)00465-8](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(01)00465-8)

- Willison, H. J., & O'Hanlon, G. M. (1999). The immunopathogenesis of Miller Fisher syndrome. *Journal of Neuroimmunology*, *100*(1–2), 3–12. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00213-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00213-1)
- Wu, G., Xie, X., Lu, Z.-H., & Ledeen, R. W. (2001). Cerebellar neurons lacking complex gangliosides degenerate in the presence of depolarizing levels of potassium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(1), 307–312. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.1.307>
- Xie, X., Wu, G., Lu, Z., & Ledeen, R. W. (2002). Potentiation of a sodium–calcium exchanger in the nuclear envelope by nuclear GM1 ganglioside. *Journal of Neurochemistry*, *81*(6), 1185–1195. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00917.x>
- Yoon, S.-J., Nakayama, K., Hikita, T., Handa, K., & Hakomori, S. (2006). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(50), 18987–18991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609281103>
- Yu, R. K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., & Yanagisawa, M. (2011). Structures, Biosynthesis, and Functions of Gangliosides-an Overview. *Journal of Oleo Science*, *60*(10), 537–544. <https://doi.org/10.5650/jos.60.537>
- Yuki, N., Sato, S., Tsuji, S., Ohsawa, T., & Miyatake, T. (1993). Frequent presence of anti-GQ1b antibody in Fisher's syndrome. *Neurology*, *43*(2), 414–414. <https://doi.org/10.1212/WNL.43.2.414>
- Zhu, W., Li, K., Cui, T., & Yan, Y. (2023). Detection of anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barré syndrome. *Annals of Translational Medicine*, *11*(7), 289–289. <https://doi.org/10.21037/atm-20-2285>

7 Anhang

Gebrauchsanweisung des Anti-Ganglioside Dot kits (GA Generic Assays GmbH) (Mit freundlicher Genehmigung der GA Generic Assays GmbH vom 19.09.2024):



Instructions For Use

Valid as of 28.09.2022

Anti-Gangliosid Dot

REF 5003

Line immunoassay for the determination of IgG and / or IgM antibodies against gangliosides in human serum



GA Generic Assays GmbH
Ludwig-Erhard-Ring 3
15827 Blankenfelde-Mahlow OT Dahlewitz
Germany

Phone.: +49 33708 9286 0
Fax: +49 33708 4417 25

info@genericassays.com
www.genericassays.com



20 x 12



1 Intended Purpose

The Anti-Gangliosid Dot is a qualitative line immunoassay for the determination of IgG or IgM antibodies against gangliosides in human serum.

The Anti-Gangliosid Dot is intended as an aid in the diagnosis of peripheral neurological disorders in conjunction with other clinical and laboratory findings.

The immunoassay is designed for manual professional *in vitro* diagnostic use.

2 Diagnostic Relevance

Inflammatory neuropathies of the peripheral nervous system are characterized by numerous clinical symptoms ranging from slight weariness and uncharacteristic indisposition to neuromuscular disorders and functional deficiency like respiratory paralysis and cardiac arrest. Recently autoantibodies to gangliosides have been identified in patients suffering from disorders of the peripheral nervous system. Gangliosides belong to the group of acid glycolipids containing a lipid (ceramide), oligosaccharide and sialic acid. Gangliosides are components of cell membranes and especially found in the central and peripheral nervous system. Ganglioside-like structures also appear on the surface of microorganisms. Inflammatory neuropathies often occur following an infection with *Campylobacter jejuni*, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, *Mycoplasma pneumoniae* or Haemophilus influenzae. Antibodies to ganglioside structures of the microorganisms may cross-react to gangliosides of the myelin sheath or neurofibre and induce inflammation processes with subsequent demyelination.

3 Test Principle

Line immunoassays are frequently used for the determination of specific antibodies directed against multiple antigens. The test strips are coated with various antigens in consistent intervals. If antibodies are present in the patient's sample, they bind to the respective antigens. A secondary antibody conjugated with the enzyme horseradish peroxidase detects the generated immune complexes. A colorless substrate is converted into a colored, insoluble product. The signal intensity of the precipitated reaction product is proportional to the antibody activity in the sample.

4 Test Components

Component	Description
Test strips A Ag 20 20 pieces	20 test strips (ready-to-use), each strip coated with highly purified - GM1, - GM2, - GM3, - GM4, - GD1a, - GD1b, - GD2, - GD3, - GT1a, - GT1b, - GQ1b, - Sulfatide, as well as positive control
Negative control N CONTROL - 1 x 0.1 mL, green cap	Colored dilution of human serum (ready-to-use; contains sodium azide) The antibody activity is indicated on the quality control certificate.
Positive control P CONTROL + 1 x 0.07 mL, red cap	Colored dilution of human serum (ready-to-use; contains sodium azide) The antibody activity is indicated on the quality control certificate.
Buffer B BUF 10x 1 x 15 mL, white cap	Concentrated solution (10x)
Conjugate IgG C CONJ G 1 x 1.2 mL, red cap	Solution of polyclonal anti-human IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (contains Kathon CG)
Conjugate IgM D CONJ M 1 x 1.2 mL, green cap	Solution of polyclonal anti-human IgM antibody conjugated to horseradish peroxidase (contains Kathon CG)
Substrate E SOLN TMB 1 x 11 mL, blue cap	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (ready-to-use)
Incubation tray 2 pieces	Incubation tray for 12 test strips
Interpretation template 1 piece	Interpretation template for gluing of processed strips
Lot-specific interpretation card 1 piece	For demonstrating antigen positions and cut-off intensity
QC Certificate 1 piece	-
Instructions for Use 1 piece	-

5 Materials required but not provided

- Common laboratory equipment
- Precision pipettes (5 – 1000 µL) and disposable tips
- Graduated cylinders (100 – 1000 mL)
- Refrigerator or a cold room
- Rocking or horizontal plate shaker
- Plastic pincers
- Adsorbent paper or paper towel
- Distilled or de-ionized water

6 Storage and Stability

Upon receipt, all test components must be stored at 2 °C to 8 °C, preferably in the original kit box. If stored properly in their original containers, all components are stable until their expiry date. All components are stable for at least 2 months after opening when stored properly at 2 °C to 8 °C.

7 General Information

This product is for *in vitro* diagnostic use only. The instructions for use must be carefully read before use. They are valid only for the present product with the given composition and must be strictly followed to ensure reliable test results. Deviations can lead to erroneous test results. Components must not be exchanged by test reagents of different lots or of other manufacturers.

Contamination of reagents must be avoided by use of aseptic techniques when removing aliquots from the vials. After use, reagent vials must be tightly closed with their corresponding caps.

Cross-contamination of samples or reagents can lead to inconsistent test results and must be avoided by use of consistent pipetting techniques.

Exposure of reagents to strong light must be avoided throughout the entire test procedure and storage.

Insufficient washing will result in poor precision and elevated measurement signals. After each washing step any residual fluid has to be removed completely.

8 Preparation

8.1 Preparation of Reagents

All liquid components must be mixed gently to ensure homogeneity. The first incubation and washing steps (sample and conjugate incubation) are performed at 2 °C to 8 °C with cooled reagents (sample diluent, washing solution, conjugate). The second wash step (after incubation of the conjugate) must be performed at room temperature (RT: 18 °C to 25 °C). Therefore, the reagents (washing solution, substrate) must be brought to room temperature before use.

8.1.1 Test Strips

The test strips are provided within a plastic tube. Unused test strips should always be stored refrigerated and protected from moisture within the original tube.

8.1.2 Controls

The positive and the negative controls are ready-to-use and must not be diluted any further. Controls must be used in each test run. Laboratories can also validate their own control samples and use them alternatively.

8.1.3 Buffer

The buffer is concentrated and must be diluted 1:10 with distilled water before use (e. g. 10 mL + 90 mL). A sufficient amount of washing solution must be prepared. The diluted buffer solution can be stored at 2 °C to 8 °C up to 30 days.

8.1.4 Conjugate

The conjugate is ready-to-use, final dilution of the concentrated conjugate to working concentration is done during the test.

8.1.5 Substrate

The substrate is ready-to-use. Exposure of the substrate solution to strong light should be avoided.

8.2 Preparation of Samples

8.2.1 Sample Material

The use of freshly collected serum from blood taken by venipuncture is recommended. The use of icteric, lipemic, hemolytic or bacterially contaminated samples should be avoided. Insoluble substances must be removed from the sample by centrifugation. Samples must not be thermally inactivated.

8.2.2 Sample Storage

Samples may be kept at 2 °C to 8 °C up to three days. Long-term storage requires -20 °C. Repeated freezing and thawing should be avoided. For multiple use, samples should be aliquoted and kept at -20 °C.

9 Test Performance

9.1 Procedure

Touch test strips with a plastic pincer only. The entire procedure has to be performed in incubation trays on a rocking or horizontal plate shaker. After each addition of solution to the wells, agitate the incubation tray manually to ensure strips are completely immersed and to remove any air bubbles which may be trapped under the strip. The indicated incubation times and temperatures must be adhered to and significant time shifts during pipetting samples and reagents must be avoided.

Step	Description
1. Addition of buffer solution and test strips	Add 1.0 mL cold buffer solution into the respective wells of the incubation tray. Place the strips with the reactive side down onto the liquid surface. Avoid remaining air bubbles below the strips.
2. Addition of samples and controls	Add 10 µL of undiluted samples and controls to the respective wells
3. Incubation	Incubate the strips for 120 min. at 2 °C to 8 °C while shaking
4. Wash cycle	Decant or aspirate the solution carefully and wash once for 5 min. with 1.0 mL cold buffer solution at 2 °C to 8 °C while shaking. Decant the solution carefully. Remaining liquid has to be removed with an absorbent paper.
5. Addition of buffer solution	Add 1.0 mL cold buffer solution into each well.
6. Addition of conjugate	Add 50 µL IgG or IgM conjugate to each well, in case of IgG/IgM screening test add 50 µL of IgG and IgM conjugate each
7. Incubation	Incubate the strips for 60 min. at 2 °C to 8 °C while shaking
8. Wash cycle	Decant or aspirate the solution carefully and wash once for 5 min. with 1.0 mL buffer solution at RT while shaking. Decant the solution carefully. Remaining liquid has to be removed with an absorbent paper.
9. Addition of substrate	Add 0.5 mL ready-to-use substrate to each well
10. Incubation	Incubate the strips for 10 – 12 min. at RT while shaking

11. Wash	Decant or aspirate the solution carefully and wash once for 2 min. with 1.0 mL buffer solution at RT while shaking.
12. Wash	Decant or aspirate the solution carefully and wash once for 2 min. with 1.0 mL aqua dest. at RT while shaking to stop the reaction.
13. Drying	Collect the strips from the wells and dry on absorbent paper for approximately 30 min.
14. Analysis	Glue the dried strips onto the interpretation template and evaluate using the interpretation card.

9.2 Automation

Automated processing of the immunoassays must be performed analogous to manual use and validated by the user.

10 Test Evaluation

10.1 Metrological Traceability

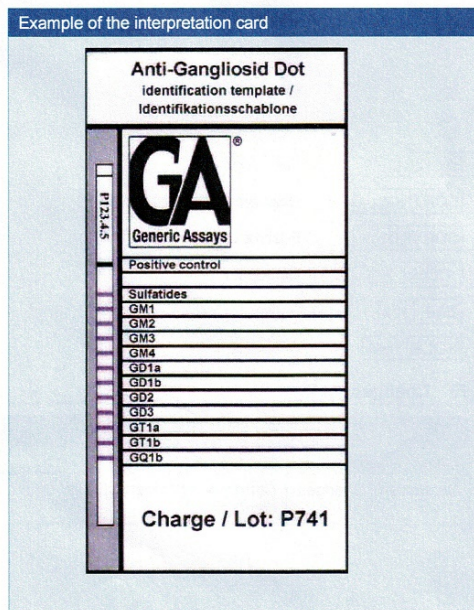
The immunoassay is calibrated using internal reference samples.

10.2 Evaluation

The qualitative evaluation of is performed by comparison of the antigen specific signal intensities of the patient's sample with the corresponding antigen lines on the interpretation card. The line intensities shown on the interpretation card serve as cut off controls for qualitative evaluation.

The test strips are coated with antigens. The color intensity is proportional to the specific antibody activity in the sample. A sample is considered to be positive for a specific antigen, if the coloration of the antigen line shows a more intense coloration than the corresponding antigen line on the evaluation template. A sample is considered to be negative for a specific antigen, if the coloration of the antigen line shows a less intense or equal coloration compared to the corresponding antigen line on the evaluation template.

Example of the interpretation card



PM-IFU-LB-13589

10.3 Criteria of Validity

Test runs are only valid if the following criteria of validity are fulfilled:

- The positive control line must show intensive coloration.

The coloration of these controls ensures that the test has been performed correctly. If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

10.4 Troubleshooting

In case of an invalid test run, the expiry dates and storage conditions, incubation times and temperatures, and precise calibration of all instruments used should be verified. If no reason for an invalid test run could be identified, please contact the supplier or manufacturer of the product.

10.5 Reference Ranges

As a result of different seroprevalences in individual regions, each laboratory should verify the reference ranges by own analysis and adapt, if necessary.

10.6 Interpretation of Test Results

A positive test result indicates the presence of specific antibodies. A negative result indicates the absence of specific antibodies, but does not exclude the possibility of an autoimmune reaction. In case of a borderline test result, a reliable evaluation is not possible.

The following ganglioside antibody activities have been observed in patients with neuropathies of the peripheral nervous system:

Disease	Antigen	Antibody Class
Guillain-Barré Syndrome	GM1, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GQ1b	IgG (IgM)
Miller-Fisher Syndrome	GQ1b, GT1a	IgG
Multifocale Musculare Neuropathy	GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b	IgM
Chronic Inflammable Demyelinated Polyneuropathy	GM2, GM3, GD1a, GD1b	IgM
Chronic-Atactic Neuropathy (CANOMAD)	GM3, GD1b, GD2, GD3, GT1b, GQ1b	IgM
Acute Atactic-Sensoric Neuropathy	GD1b, GD3	IgG
Acute Musculare Axonal Neuropathy	GM1, GD1a	IgG
IgM Paraproteinemia, Demyelinating Neuropathy	Sulfatide	IgM (IgG)

10.7 Limitations of the Method

The interpretation of test results must always be considered in combination with the clinical picture of the patient. The diagnosis should not be based on the results of a sole diagnostic method. All clinical and laboratory findings should be evaluated to state a diagnosis. For confirmation, further investigations should be carried out.

11 Performance Characteristics

11.1 Analytical Performance Characteristics

11.1.1 Precision

The precision of test results was assessed by the determination of the intra- and interassay variation by the analysis of multiple samples with different antibody activities. No differences in the qualitative evaluation have been observed.

Page 3 of 4

11.2 Diagnostic Performance Characteristics

11.2.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity

Total sensitivity and specificity were assessed by the analysis of 33 samples from patients suffering from autoimmune peripheral neuropathies (confirmed positive for anti-ganglioside antibodies by reference methodologies) and 130 non-selected samples from healthy blood donors.

	Sensitivity	Specificity
IgG anti-gangliosides	> 99 %	97.7 %
IgM anti-gangliosides	> 99 %	94.6 %

12 Warnings and Precautions

The product is designed exclusively for *in vitro* diagnostic use by qualified, authorized and trained personnel. All test components and human samples should be handled with care as potentially hazardous. Good laboratory practices (GLP) and all relevant regulations should be adhered to.

In case the product is damaged or product information including labelling is wrong or incorrect, please contact the manufacturer or supplier.

This product contains preparations of human and / or animal origin. Any material derived from human body fluids or organs used for the preparation of components were tested and found negative for HBsAg (Hepatitis B-Virus-surface Antigen) and anti-HIV as well as anti-HCV antibodies. However, all components and all patient samples should be handled as potentially hazardous in accordance with national laws and appropriate guidelines on biological safety.

As the product contains potentially hazardous materials, the following precautions should be followed: Do not smoke, eat or drink while handling kit material or samples. Avoid direct contact to kit material or samples by wearing protective gloves laboratory coat and safety glasses. Never pipette material by mouth. Wipe up spills promptly and wash the affected surface thoroughly with a decontaminant. Wash hands thoroughly after use.

Some of the reagents contain Kathon CG (< 1.0 %) as a preservative, may cause skin sensitization (H317) and must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa (P280, P333+P313).

Some of the reagents contain sodium azide (< 0.1 %) as a preservative and must not be swallowed or allowed to come into contact with skin or mucosa. The possible formation of heavy metal azides in the drainage has to be prevented by sufficient rinsing with water.

The information in the safety data sheet on possible hazards, first aid measures, measures in the event of the unintentional release of large quantities, handling and storage, personal protective equipment, information on disposal as well as information on toxicology must be observed.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the member state in which the user and/or the patient is established.

13 Disposal

For decontamination and disposal the recommendations of the CDC as well as the relevant local and national environmental guidelines and regulations should be adhered to. Samples, potentially contaminated materials and infectious waste must be decontaminated, e.g. by autoclaving for 20 min. at 121 °C.

14 References

- Willison HJ, Yuki N: Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain*, 2002, 125, 2591 – 625.

- Khalili-Shirazi A, Gregson N, Gray I, Rees J, Winer J, Hughes R: Antiganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome after a recent cytomegalovirus infection. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1999, 66, 376 – 9.






















- Schwerer B, Neisser A, Bernheimer H: Distinct immunoglobulin class and immunoglobulin G subclass patterns against ganglioside GQ1b in Miller Fisher syndrome following different types of infection. *Infect. Immun.* 1999, 67, 2414 – 21.

- Alaniz ME, Lardone RD, Yudowski SL, Farace MI, Nore GA: Normally occurring human anti-GM1 immunoglobulin M antibodies and the immune response to bacteria. *Infect. Immun.* 2004, 72, 2148 - 51.

- Caudie C, Quittard Pinon A, Bouhour F, Vial C, Garnier L, Fabien N. Comparison of commercial tests for detecting multiple anti-ganglioside autoantibodies in patients with well-characterized immune-mediated peripheral neuropathies. *Clin Lab.* 2013;59(11-12):1277-87.

- Klehmet J, Märtschenz S, Ruprecht K, Wunderlich B, Büttner T, Hiemann R, Roggenbuck D, Meisel A. Analysis of anti-ganglioside antibodies by a line immunoassay in patients with chronic-inflammatory demyelinating polyneuropathies (CIDP). *Clin. Chem. Lab. Med.* 2018, 56, 919 – 26.

15 Symbols

	Manufacturer
	CE marking of conformity
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Catalogue number
	Unique device identifier
	Batch code
	Temperature limit
	Use-by date
	Consult instructions for use
	Contains sufficient for <n> tests
	Do not re-use
	Caution
	Warning
	Biological risk
	Keep away from sunlight
	Test strips
	Negative control
	Positive control
	Conjugate
	Buffer
	Substrate

16 Changes

Changes in current Instructions for Use	
Current Version	009/09.2022
Summary of Changes	Correction of preservative in component B

8 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Universitätsklinikum Tübingen in der Neurologie mit Schwerpunkt Epileptologie unter Betreuung von PD Dr. Marquetand durchgeführt. Kooperation bestand zum Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung und zum MEG-Zentrum.

Die Idee dieser Studie entstand durch PD Dr. Justus Marquetand. Die weitere Konzeption der Studie wurde von PD Dr. Justus Marquetand erarbeitet und das Studienprotokoll wurde von mir in Zusammenarbeit mit PD Dr. Justus Marquetand erstellt. Die Versuche und Daten-Recherche wurden (nach Einarbeitung durch PD Dr. Justus Marquetand) von mir eigenständig durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte (nach Anleitung durch PD Dr. Justus Marquetand) durch mich. Betreut wurde die Doktorarbeit von PD Dr. Justus Marquetand.

Die Veröffentlichung wurde von mir verfasst und von PD Dr. Justus Marquetand korrigiert. Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 08.10.2024

9 Publikation

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikationen veröffentlicht:

Giesche, N., Böhm-Gonzalez, S.T., Kleiser, B., Kowarik, M.C., Dubois, E., Stransky, E., Armbruster, M., Grimm, A., Marquetand, J., 2024. Antiganglioside antibody frequency in routine clinical care settings. Euro J of Neurology e16290. <https://doi.org/10.1111/ene.16290>

Zusätzlich wurde eine Lizenzgenehmigung zur Verwendung des gesamten Papers inklusive der Abbildungen eingeholt:

Lizenznummer: 5872031277015 18.09.2024

Kleiser B, Giesche N, Kowarik MC, Dubois E, Armbruster M, Grimm A, Marquetand J. Anti-sulfatide antibodies in neurological disorders: should we test? J Neurol. 2024 Sep 3. doi: 10.1007/s00415-024-12668-8. Epub ahead of print. PMID: 39225745.

Lizenz: CC BY 4.0

Link zur Lizenz: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Link zur Quelle: <https://doi.org/10.1007/s00415-024-12668-8>

10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater PD. Dr. Justus Marquetand bedanken, der mir diese Arbeit ermöglicht hat, mich die gesamte Zeit unterstützt hat, immer offen für Fragen war, immer das richtige Verhältnis von Motivation und Verständnis kannte und letztendlich in jedweder Hinsicht den Anforderungen eines Doktorvaters und Betreuers mehr als gerecht wurde. Vielen Dank!

Ich möchte auch allen Menschen danken, die mich an der Eberhard Karls Universität unterstützt haben, insbesondere den Mitautoren meines Papers!

Für Unterkunft und Freundschaft danke ich dem Tübinger Wingolf!

Für die wissenschaftliche Beratung danke ich Dr. Katharina Brosch!

Für die Unterstützung in jeder Lebenslage auf dem Weg hierhin und so viel mehr danke ich meinen Eltern, Dr. Gisela und Michael Giesche, und meinen Großeltern, Irmgard und Erhard Neumann sowie meiner Patentante Dr. Christine Wern.