



Autoanticorpi anti-CASPR2

Sinonimi

Contactin-**as**sociated **p**rotein-**2**; CNTP2

Indicazioni

- ▶ Neuromiotomia
- ▶ Sindrome di Morvan
- ▶ Encefalite limbica
- ▶ Convulsioni localizzate della faccia e del braccio, epilessia
- ▶ Disordini paraneoplastici autoimmuni del movimento
- ▶ Iperexcitabilità neuromuscolare, miastenia grave
- ▶ Sintomi neurologici paraneoplastici associati al timoma o al microcitoma

vedi

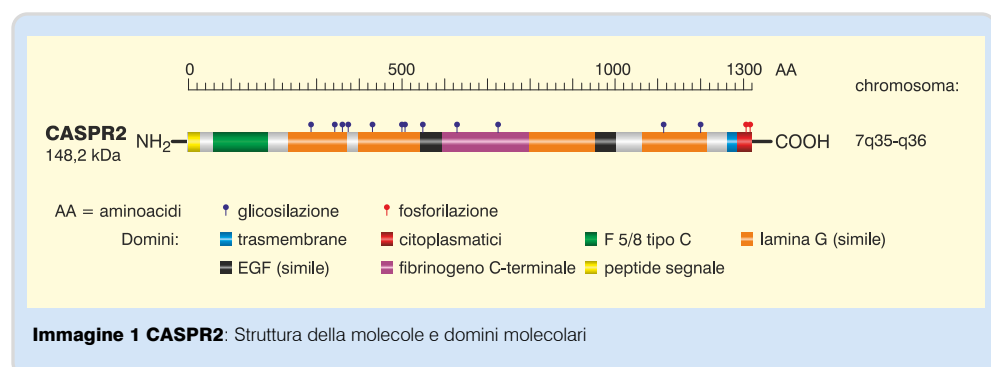
- ▶ Autoanticorpi nelle sindromi neurologiche paraneoplastiche
- ▶ Autoanticorpi nelle malattie della giunzione neuromuscolare
- ▶ Autoanticorpi in neuropatie periferiche

Immunopatologia

La maggioranza degli autoanticorpi diretti contro i canali voltaggio dipendenti del potassio (VGKC, voltage gated potassium channels) dimostrabili mediante il saggio di radioimmuno-precipitazione (Hart et al. 1997), non punta, come è stato supposto prima, alle proteine che formano le subunità dei canali di tipo Shaker Kv 1.1/1.2/1.6 legate a ¹²⁵I- α -dendrotoxina (¹²⁵I- α -Dtx). I loro reali bersagli antigenici sono invece proteine associate ai canali VGKC come la leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI1), la Tag1/contactin 2 e la contactin-associated protein-2 (CASPR2). LGI1 è una proteina secretoria espressa su membrane neuronali e non neuronali; la proteina CASPR2 è una proteina essenziale per l'aggregazione corretta (il clustering) dei VGKC in vivo (Irani et al. 2010; Lai et al. 2010). Pare che esistano ancora anticorpi specifici per altre proteine legate ai complessi di VGKC. Si trovano anticorpi in grado di precipitare complessi di VGKC che non reagiscono con nessuno degli antigeni finora conosciuti (Irani et al. 2010; Su-leiman et al. 2011).

Antigeni

La contactin-associated protein-2 (CASPR2, immagine 1), un omologo della neurexina IV della Drosophila (Nrx-IV), è una proteina transmembrana con un piccolo dominio intracitoplasmatico e un grande dominio extracellulare. Il gene codificante (CNTNAP2), uno dei più grandi del genoma umano, è coinvolto in numerose malattie neurologiche (sindrome di Gilles de la Tourette, schizofrenia, epilessia, autismo, ADHA [sindrome da deficit di attenzione e iperattività e ritardo mentale]).



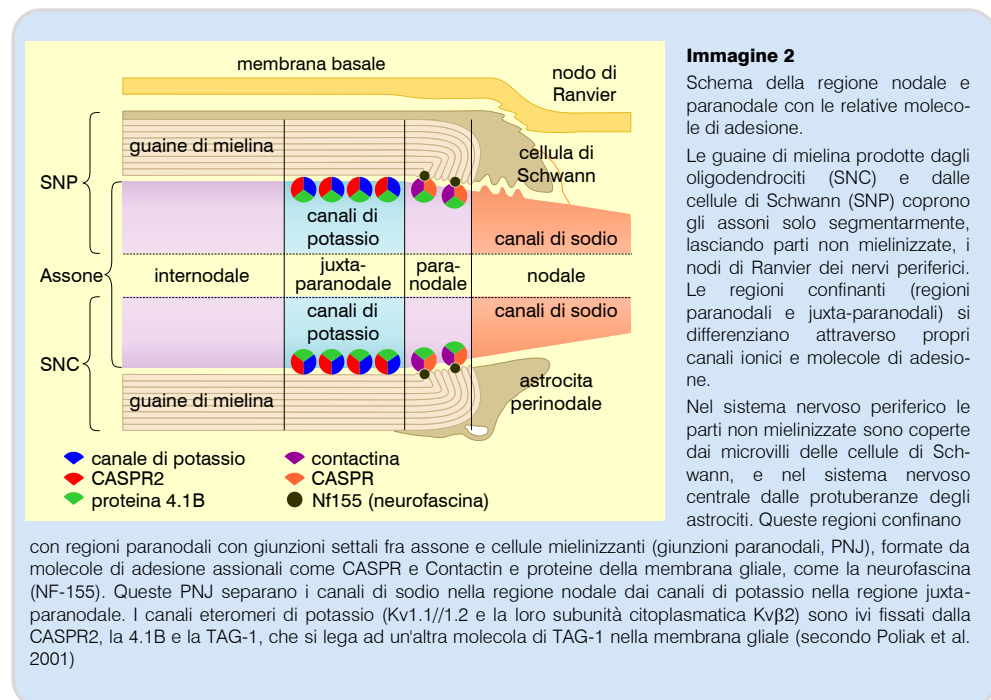
CASPR2 e CASPR regolano la formazione dei domini assonali particolari intorno ai nodi di Ranvier. CASPR è essenziale per la formazione di una barriera membrana nelle giunzioni paranodali, CASPR2 invece serve all'impalcatura membrana per l'assemblaggio e l'ormeggio dei canali Kv1 nella regione juxta-paranodale (immagine 2). Tutte e due, CASPR2 e CASPR, interagiscono con la proteina 4.1B, che probabilmente lega i complessi di adesione paranodali e



Autoanticorpi anti-CASPR2

juxta-paranodali al citoscheletro assonale. La proteina 4.1B è irrinunciabile per l'accumulazione della CASPR2 e dei canali Kv1 nella membrana assonale juxta-paranodale.

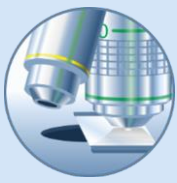
CASPR2 è espressa nell'ippocampo, nello strato molecolare e nello strato granulare del cervello, e insieme con VGKC di tipo Shaker Kv1.1/1.2 nelle regioni juxta-paranodali dei nervi periferici. Il dominio intracitoplasmatico della CASPR2 contiene dei motivi delle sequenze che trasmettono il legame a proteine del tipo 4.1 (4.1B), cioè mediatori per l'attaccamento delle molecole di adesione, dei canali ionici o dei recettori a citoscheletro di actina e di spectrina. In queste parti della proteina si trovano anche i domini proteici PDZ, cioè domini globulari presenti in diverse proteine dove svolgono funzioni importanti nel riconoscimento e nell'assemblaggio di complessi proteici (PDZ, PSD-95/SAP90, Dlg, ZO-1 proteina). Si ipotizza che tali interazioni siano importanti per il legame della CASPR2 alle proteine dei canali di potassio e per la formazione dei complessi della CASPR2 con la TGA-1. CASPR2, la proteina 4.1B e TGA-1, una mo-



lecola di adesione rassomigliante a immunoglobulina, costituiscono nelle regioni juxta-paranodali dei nodi di Ranvier (immagine 2) il corretto assemblaggio dei VGKC (di tipo Shaker Kv1.1/1.2, vedi autoanticorpi anti-VGKC, Pollak et al. 1999, 2001, 2003; Traka et al. 2003; Horeh et al. 2008, 2010, Bel et al. 2009). La distribuzione dei canali ionici diversi su certi domini della membrana nelle parti dei nodi di Ranvier serve alla corrente eccitatoria veloce e effettiva nei nervi mielinizzati.

Autoanticorpi

Circa il 20 % dei pazienti con autoanticorpi precipitanti complessi di ¹²⁵I-α-Dtx VGKC dimostrano anticorpi specifici per la CASPR2. Ci sono delle buone correlazioni tra le quantità dei complessi di ¹²⁵I-α-Dtx VGKC precipitati e i titoli anticorpali specifici per la CASPR2 (Irani et al. 2010). Anticorpi anti-CASPR2 possono presentarsi insieme agli anticorpi contro altri antigeni dei canali di potassio (anti-LGI1, anti-contactin-2/Tag-1, anti-Kv1.1/1.2) (Irani et al. 2010, Lokaides et al. 2012). Le ricerche sin qui fatte si limitano agli anticorpi isotipo IgG. Non esistono dati sulla partecipazione di altri tipi o sottoclassi di immunoglobuline.



Autoanticorpi anti-CASPR2

Sintomi clinici

Autoanticorpi anti-CASPR2 sono stati riscontrati più che altro in pazienti con la neuromiotonia e con la sindrome di Morvan, meno frequentemente in pazienti con encefalite limbica, che dimostravano più spesso autoanticorpi anti-LGI1. La neuromiotonia e la sindrome di Morvan spesso erano accompagnate da tumori maligni (tabella 1). Circa un terzo dei pazienti anti-CASPR2 positivi sviluppano tumori (timoma, e in un caso carcinoma dell'endometrio; Irani et al. 2010; Vincent e Irani 2010). Un'altra indagine su otto pazienti positivi a anti-CASPR2 ha riscontrato in sette casi sintomi della encefalopatia con crisi epilettica, in cinque una neuropatia o un'ipereccitabilità dei nervi periferici (PNH), in un caso associato con miastenia grave; non è stata rilevata un'associazione con tumori (Lancaster et al. 2011). Di solito pazienti privi di tumore hanno reagito bene ad una terapia immunomodulatoria.

Tabella 1 Sintomi dei pazienti positivi per anti-CASPR2

Malattie	[%]
Neuromiotonia	34
Sindrome di Morvan o neuromiotonia (casi dubbi)	52
Sindrome di Morvan	16
Insomnia	32
Tumori maligni (timoma)	32
Encefalite limbica	37
Epilessia	11
Amnesia	52
Confusione / Disorientamento	42
Convulsioni	52
Anomalie del MEG del lobo temporale	26
Iponatriemia	10

Immunopatologia

Le cause dello sviluppo degli anticorpi contro la CASPR2 e contro le altre proteine che si trovano nei complessi VGKC non sono attualmente chiare. Non è stata finora dimostrata la presenza di una stimolazione della risposta immunologica attraverso una espressione ectopica di CASPR2, per esempio nei tumori maligni così come nelle neuropatie paraneoplastiche. Non si sa se gli anticorpi contro CSAPR2 siano responsabili in modo diretto o indiretto dello sviluppo di sintomi neurologici. Dato che la maggior parte della proteina CSAPR2 si trova in posizione extracellulare, è da supporre che essa sia accessibile agli anticorpi nei nervi e nei neuroni dell'ippocampo anche in vivo. Perciò è possibile che gli anticorpi anti-CASPR2 disturbino il normale processo di formazione del complesso CASPR2/Kv.1.1/1.2 negli assoni dei nervi periferici e per questo provocano i sintomi della neuromiotonia, dolori neuropatici e disfunzioni del sistema nervoso autonomo. I risultati parzialmente buoni della terapia immunosoppressiva confermerebbero l'immunopatologia sopra descritta, soprattutto se le terapie classiche antiepilettiche rimangono senza successo. Tutto questo, però, non spiega i disturbi del sonno, un sintomo importante della sindrome di Morvan. Sorprendente è la coincidenza, non rara, dei disturbi autoimmuni e dei difetti genetici che si manifestano sulle stesse molecole bersaglio. Mutazioni del gene *CNTNAP2*, codificante per la CASPR2, sono associate con epilessia, disturbi



Autoanticorpi anti-CASPR2

del ragionamento cognitivo e la riduzione delle funzioni dei nervi periferici (Kumar e Christian 2009).

Metodi della ricerca In virtù della precipitazione delle proteine dei complessi di VGKC legati a ^{125}I - α -Dtx, ottenuti da estratti di cervello, si è supposto che i bersagli degli anticorpi anti-VGKC, comparabili agli anticorpi anti-recettore dell'acetilcolina, siano le proteine che formano il poro del canale (Kleopa et al. 2006). Qualche osservazione invece ha sollevato dubbi riguardo a queste supposizioni, perché i sieri dei pazienti precipitavano soltanto raramente proteine dei canali legate a ^{125}I - α -Dtx purificate, o proteine marcate con ^{35}S -metionina, ottenute mediante trascrizione e traslazione in vitro (osservazioni proprie).

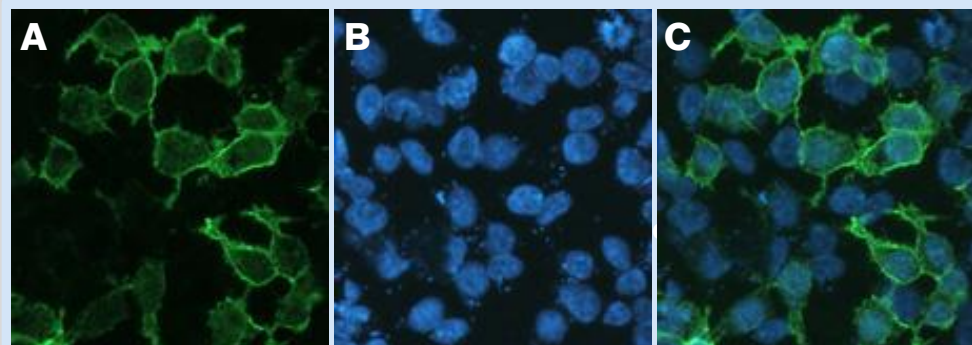


Immagine 3

Ricerca di anti-CASPR2 con immunofluorescenza indiretta. Cellule HEK293 (**H**uman **E**mbrionic **K**idney), trasfettate con un plasmide contenente CASPR2, sono state incubate con il siero di un paziente positivo a anti-CASPR2.

A Le cellule che esprimono CASPR2 mostrano una fluorescenza evidente mentre le cellule che non esprimono CASPR2 non mostrano alcuna fluorescenza. In **B** sono messi in evidenza i nuclei delle cellule con DAPI. In **C** sono mescolate insieme le due fluorescenze A e B. La presenza di anti-CASPR2 legato alle cellule è messa in evidenza con anticorpi anti-IgG umana, coniugati con isotiocianati.
Ingrandimento dell'obiettivo 40 volte.

Durante l'estrazione delicata mediante digitonina di tessuti neuronali per ottenere le proteine del tipo Shaker (Kv1.1/1.2), dei canali VGKC, le proteine CASPR2, LGI1 e TAG-1 restavano associate nei complessi. Perciò gli anticorpi anti-CASPR2 precipitano non solo il loro bersaglio (CASPR2) ma anche il complesso in toto, cioè le proteine associate come le proteine di tipo Shaker Kv1.1/1.2 legate alla ^{125}I - α -Dtx (detti anticorpi anti-complessi di VGKC). Dopo un trattamento degli estratti con detergenti più forti, come il dodecilsolfato di sodio, le proteine associate si dissociano dai complessi e gli anticorpi anti-CASPR2 non sono più in grado di precipitarle (Irani et al. 2010)

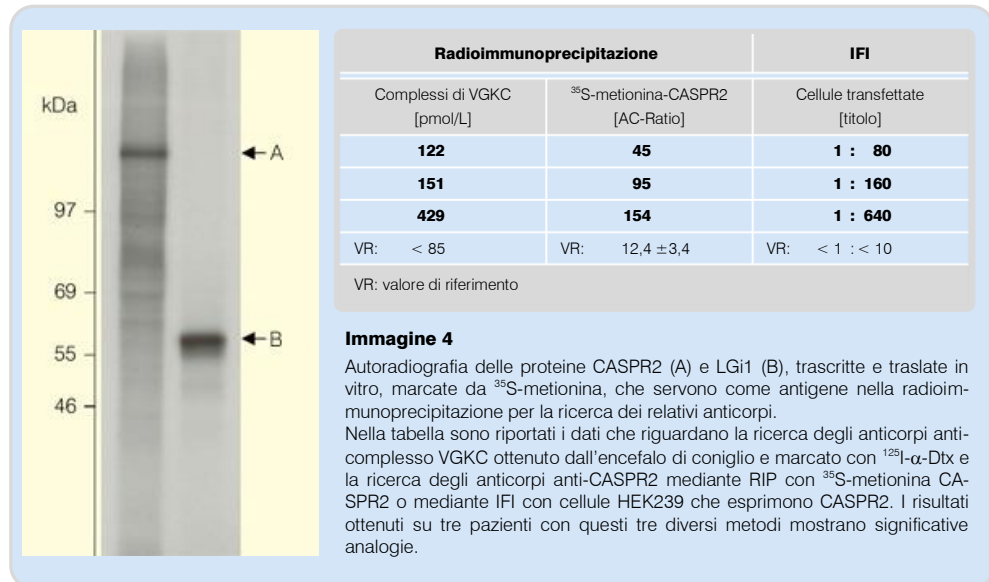
Gli autoanticorpi anti-CASPR2 si rendono visibili con una preparazione di nervi tesi (teased nerves). Mostrano una colorazione delle regioni juxta-paranodali dei nodi di Ranvier. Anche ricerche immunistochemiche dell'ippocampo nelle sezioni di encefalo di topi o ratti o ricerche immunistochemiche di neuroni dell'ippocampo coltivati possono confermare il sospetto della loro presenza. Questi metodi però non sono specifici e devono essere confermati da ulteriori ricerche.

Per la ricerca specifica degli autoanticorpi anti-CASPR2 adesso esistono due metodi: l'immunofluorescenza indiretta (IFI, immagine 3), con cellule HEK293 trasfettate e esprimenti l'antigene (Irani et al. 2010), o un test sviluppato nel nostro laboratorio mediante immunoprecipitazione di CASPR2 marcata con ^{35}S -metionina, ottenuta mediante trascrizione e traslazione in vitro (immagine 4). Queste ricerche specifiche non possono sostituire completamente la ricer-



Autoanticorpi anti-CASPR2

ca mediante precipitazione dei complessi VGKC, perché non in tutti i casi di precipitazione positiva si possono trovare anticorpi anti-CASPR2 o anticorpi contro le altre proteine conosciute (anti-LGI1, anti-TAG1) (Shuleiman et al. 2011 a, b).



Bibliografia

- Hart IK, Waters C, Vincent A, Newland C, Beeson D, Pongs O, Morris C, Newsom-Davis J. Autoantibodies detected to expressed K⁺ channels are implicated in neuromyotonia. *Ann Neurol* (1997); 41: 238 - 246
- Horresh I, Poliak S, Grant S, Bredt D, Rasband MN, Peles E: Multiple molecular interactions determine the clustering of Caspr2 and Kv1 channels in myelinated axons. *J Neurosci* (2008); 28: 14213 - 14222
- Horresh I, Bar V, Kissil JL, Peles E: Organization of myelinated axons by Caspr and Caspr2 requires the cytoskeletal adapter protein 4.1B. *J Neurosci* (2010); 30: 2480 - 2489
- Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, Peles E, Buckley C, Lang B, Vincent A: Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* (2010); 133: 2734 - 2748
- Irani SR, Bien CG, Lang B: Autoimmune epilepsies. *Curr Opin Neurol*; 24: 146 - 153 (2011)
- Kleopa KA, Elman LB, Lang B, Vincent A, Scherer SS: Neuromyotonia and limbic encephalitis sera target mature Shaker-type K⁺ channels: subunit specificity correlates with clinical manifestations. *Brain* (2006); 129: 1570 - 1584
- Kumar RA, Christian SL. Genetics of autism spectrum disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* (2009); 9: 188 - 197
- Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, Cowell JK, Dalmau J: Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* (2010); 8: 776 - 785
- Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, Wilson C, Jacobs D, Lai M, Walker RW, Graus F, Bataller L, Illa I, Markx S, Strauss KA, Peles E, Scherer SS, Dalmau J: Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol* (2011); 69: 303 - 311



Autoanticorpi anti-CASPR2

Loukaides P, Schiza N, Pettingill P, Palazis L, Vounou E, Vincent A, Kleopa KA: Morvan's syndrome associated with antibodies to multiple components of the voltage-gated potassium channel complex. *J Neurol Sci* (2012); 312: 52 - 56

Panzer J, Dalmau J: Movement disorders in paraneoplastic and autoimmune disease. *Curr Opin Neurol* (2011); 24: 346 - 353

Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E: Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron* (1999); 24: 1037 - 1047

Poliak S, Gollan L, Salomon D, Berglund EO, Ohara R, Ranscht B, Elior Peles E: Localization of Caspr2 in myelinated nerves depends on axon-glia interactions and the generation of barriers along the axon. *J Neuroscience* (2001); 21: 7568 - 7575

Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, Stewart CL, Xu X, Chiu SY, Shrager P, Furley AJW, Peles E: Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol* (2003); 162: 1149 - 1160

Suleiman J, Brenner T, Gill D, Troedson C, Sinclair AJ, Brilot F, Vincent A, Lang B, Dale RC: Immune-mediated steroid-responsive epileptic spasms and epileptic encephalopathy associated with VGKC-complex antibodies. *Dev Med Child Neurol* (2011 a); 53: 1058 - 1060

Suleiman J, Brenner T, Gill D, Brilot F, Antony J, Vincent A, Lang B, Dale RC: VGKC antibodies in pediatric encephalitis presenting with status epilepticus. *Neurology* (2011 b); 76: 1252 - 1255

Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D: Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol* (2003); 162: 1161 - 1172

Vincent A, Irani SR: Caspr2 antibodies in patients with thymomas. *J Thorac Oncol* (2010); 5: (10 Suppl 4): S277- S280